

«Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

На правах рукописи

Хохлачева Александра Алексеевна

**КЕФИРНЫЕ ГРИБКИ КАК АССОЦИАТИВНАЯ КУЛЬТУРА
МИКРООРГАНИЗМОВ**

03.01.06 – Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Градова Н.Б.

Москва – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

	ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
	ВВЕДЕНИЕ	5
1.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1	Ассоциативные культуры микроорганизмов и закономерности их функционирования	9
1.2	Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов	15
1.3.	Кефиран – экзополисахарид кефирных грибков	45
2.	ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	72
3.1.	Исследование микробного профиля кефирных грибков, культивируемых на нативном молоке (КГЛас+)	72
3.1.1.	Характеристика, исследование микробного профиля кефирных грибков и их «закваски»	72
3.1.2.	Физиолого-биохимические свойства микробных компонентов кефирного грибка	82
3.2.	Определение функциональной активности и микробного профиля кефирных грибков (КГЛас-), длительное время культивируемых на молоке, не содержащем лактозу	88
3.2.1.	Сравнительная оценка функциональной активности кефирных грибков КГЛас- и КГЛас+	89
3.2.2.	Микробный профиль кефирных грибков, длительное время культивируемых на безлактозном молоке (КГЛас-)	96
3.3.	Трофическая цепь ассоциативной культуры кефирных грибков	101
3.4.	Кефирные грибки как продуценты экзополисахаридов	103
3.4.1.	Скрининг полисахаридсинтезирующих молочнокислых бактерий компонентов кефирных грибков и исследование влияния источников углерода на синтез экзополисахаридов	105

3.4.2.	Структурные исследования экзополисахаридов из кефирных грибков и синтезированных чистыми культурами методом ИК-спектроскопии	110
3.4.3.	Исследование динамики роста <i>L.lactis</i> и <i>L.mesenteroides</i> и синтеза экзополисахаридов	113
3.4.4.	Исследование свойств ЭПС, синтезированных чистой культурой <i>L. mesenteroides</i> и выделенных из кефирных грибков	119
	ВЫВОДЫ	122
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	128
	ПРИЛОЖЕНИЯ	148

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

КГС – кефирные грибки, применяемые при производстве кефира на молочных предприятиях г. Ставрополя;

КГГ – кефирные грибки, применяемые при производстве кефира на молочных предприятиях г. Гагарина;

КГМ – лиофилизированные кефирные грибки, используемые на предприятиях г. Москвы;

КГВ – лиофилизированные кефирные грибки, используемые на предприятиях г. Владикавказа;

DGGE – денатурирующий градиентный гель электрофорез;

lac+ – нативное молоко;

lac- – безлактозное молоко (молоко, в котором лактоза гидролизована на глюкозу и галактозу);

lac± – молоко со сниженным содержанием лактозы (обработанное ферментным препаратом галактозим);

МС – молочная сыворотка;

РВ – редуцирующие вещества;

КЖ – культуральная жидкость;

КЛac+ – кефирные грибки, культивируемые на нативном молоке;

КЛac- – кефирные грибки, культивируемые на безлактозном молоке;

ДЭ – дрожжевой экстракт;

МКБ – молочнокислые бактерии;

ЭПС – экзополисахариды;

Спектр НПВО – спектр нарушенного полного внутреннего отражения;

ДМСО – диметилсульфоксид.

ВВЕДЕНИЕ

Доминирующей, наиболее устойчивой и метаболически активной формой существования микроорганизмов в природе и ряде техногенных систем, являются эволюционно сложившиеся структурно оформленные микробные сообщества [Свирижев, Логофет, 1978, Заварзин, 2003]. Исследование закономерностей формирования и функционирования таких микробных сообществ имеет общебиологическое значение в связи с изучением механизмов функционирования подобных систем, а также является приоритетным направлением при решении проблем управления качеством пищевых продуктов, в технологии получения которых используются культуры микроорганизмов, вовлечения в хозяйственный оборот вторичных ресурсов, увеличения глубины переработки сырья, повышения экологичности технологических решений [Олескин, Самуилов, 1994; Свирижев, Логофет, 1978; Заварзин, 2003; Стоянова, 2008; Каллистова и др., 2014; Артюхова, 2006; Котова, 2013].

В последние годы выявлено участие ряда тонких механизмов, основанных на химической, звуковой коммуникации микроорганизмов в объединении их в сообщества [Хмель, 2006; Журина и др., 2013; Панкрушина, 2002]. Однако важнейшая роль в превращении сообщества микроорганизмов в систему действующую, как определенное единое целое, принадлежит трофическим взаимоотношениям [Сетров, 1971; Заварзин, 2003].

Одной из структурно оформленных стабильно функционирующих, эволюционно сложившихся ассоциативных культур, длительное время используемых в промышленных условиях, являются кефирные грибки (кефирные зерна), микробный состав и взаимоотношения микробных компонентов которых, являются предметом изучения в течение многих лет. В результате были выявлены основные трофические потоки в сообществе при поступлении в систему основного ресурса лактозы: - молочнокислые бактерии гомо- и гетероферментативные, которые осуществляют молочнокислое брожение при использовании лактозы, - дрожжи, использующие молочную кислоту для

спиртового брожения и - уксуснокислые бактерии, окисляющие этанол [Феофилова, 1958; Фильчакова, 2005].

При исследовании микробного состава кефирных грибков авторами при использовании классических микробиологических методов исследования, основанных на выделении чистых культур при рассеве растертых грибков на твердые среды, описан различный микробный состав кефирных грибков, используемых на разных молочных предприятиях. В кефирных грибах описано присутствие более 20 разных видов молочнокислых бактерий, около 20 видов дрожжей как использующих для брожения лактозу, так и не использующих ее [Lopitz-Otsoa et al., 2006; Farnworth, 2006].

На основании этих данных можно было бы предположить, что кефирные грибки представляют систему, характеризующуюся различным микробным составом, но выполняющую одинаковые функции, сохраняющую неизменными пути превращений исходного субстрата. Однако имеющиеся литературные данные не дают основания для подтверждения этого положения. Так остаются не выясненными закономерности взаимоотношений между разнообразием присутствующих молочнокислых бактерий в кефирных грибах. Показанное рядом авторов присутствие в грибах лактозосбраживающих дрожжей не дает возможности определить микроорганизмы-продуценты данной системы. Отсутствует единое мнение о продуцентах экзополисахаридов, структурирующих ассоциативную культуру кефирных грибков. Отсутствуют данные, позволяющие разработать концептуальную модель (включающую исследование микробного состава и трофических взаимоотношений компонентов [Свирижев, Логофет, 1978]) сложившегося консорциума кефирных грибков. Что расширит общие представления о структуре консорциума микроорганизмов, а также является необходимой для создания новых экспериментальных сообществ и разработки способов управления стабильностью кефирных грибков и качеством получаемых продуктов.

Целью работы является разработка концептуальной модели ассоциативной культуры микроорганизмов кефирных грибков (кефирных зерен) и определение их биотехнологического потенциала.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие **задачи**:

- исследовать микробный профиль кефирных зерен, используемых на разных молочных предприятиях;
- изучить трофические взаимоотношения между микробными компонентами сообщества и определить продуцентов данной системы;
- определить биотехнологический потенциал кефирных зерен, как продуцентов экзополисахаридов (ЭПС) кефирана.

Научная новизна.

На основании впервые проведенных систематических исследований микробного профиля кефирных грибков и их функциональной активности разработана концептуальная модель микробного сообщества кефирных грибков и определены в качестве продуцента этой системы молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus sp.*

Показана идентичность состава доминирующих форм молочнокислых бактерий кефирных зерен, используемых на разных молочных предприятиях, при использовании молекулярно-генетических методов (без выделения чистых культур).

Определены новые закономерности формирования структуры сообществ микроорганизмов, обеспечивающие их стабильность и функциональную активность. Показана регулирующая роль индуцибельного фермента β -галактозидазы молочнокислых бактерий в обеспечении стабильности микробного сообщества при изменении углеводного питания. Выявлено присутствие двух физиологических групп молочнокислых бактерий кефирных грибков, отличающихся способностью к синтезу фермента β -галактозидаза: - синтезирующие β -галактозидазу и осуществляющие молочнокислое брожение при использовании лактозы; и вторая группа - не синтезирующие β -галактозидазу

и осуществляющие молочнокислое брожение при использовании глюкозы. Впервые показано отсутствие различий в микробном профиле и функциональной активности кефирных зерен, культивируемых в течение длительного времени (более 4-х лет) на безлактозном молоке по сравнению с нативным молоком, содержащем лактозу.

Выявлена способность разных видов молочнокислых бактерий синтезировать водорастворимые экзополисахариды по своей структуре идентичные ЭПС кефирану, но различающие по молекулярной массе.

Практическая значимость.

Разработана концептуальная модель микробного сообщества кефирных грибков, что является основой для разработки алгоритма направленного создания ассоциативной культуры кефирных грибков и управления их функционированием.

Показана возможность получения биологически активного пробиотического продукта при культивировании кефирных зерен без изменения их микробного профиля и функциональной активности на безлактозном молоке (содержащем продукты гидролиза лактозы), перспективного для диетического питания.

Разработан лабораторный режим получения до 3.5 г/л экзополисахаридов кефирана при культивировании *Leuconostoc mesenteroides* как на молочной сыворотке с добавлением сахарозы, так и на синтетической среде MRS с сахарозой (заявка на патент 2015112611 РФ, МПК С12 Р 19/04). Обоснованы направления практического использования полученных полисахаридов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ассоциативные культуры микроорганизмов и закономерности их функционирования

В природе естественной формой существования микроорганизмов является форма сообществ и ассоциативных культур, которые ограничены пленкой, слизистыми чехлами, полисахаридными слоями, объединяющими и удерживающими разные микроорганизмы в морфологически оформленном сообществе, что обеспечивает им большую устойчивость к заражению посторонней микрофлорой, к фаголизису, возможность взаимной стимуляции роста, химической коммуникации за счет биостимуляторов различной природы, действия сигнальных метаболитов. Пространственное распределение видов обусловлено разным притоком питательных веществ в систему, в ее края и глубину, а также физическим взаимодействием клеток, их когезией.

Микробные сообщества бывают двух видов: природные и спонтанные ассоциации [Заварзин, 2003].

- *Природные сложные микробные сообщества* функционируют в естественной среде обитания (разложение материалов растительного опада, лесной подстилки; ассоциации аэробов и анаэробов в почве, биоценоз загрязненных почв, циано-бактериальные маты и т.п.). Состав сообществ зависит от почвенно-климатических условий, от характера и концентрации поступающих ресурсов.

- *Спонтанные ассоциации* формируются как в природных, так и техногенных условиях: при конверсии целлюлозосодержащих материалов при силосовании; при компостировании; метаногенные сообщества при культивировании облигатных метанооксиляющих микроорганизмов на природном газе, содержащем аналоги метана $C_2 - C_4$; активный ил при биологической очистке сточных вод; эволюционно сложившиеся ассоциативные культуры кефирных грибков, развивающиеся на молоке; чайные грибки, развивающиеся на сахарозе, и т.д. Микробный профиль консорциумов зависит от характера поступающего субстрата и условий окружающей среды.

Исследования механизма формирования структурированных микробных ассоциаций является основой для разработки способов целенаправленного создания и управления ассоциативными культурами микроорганизмов, что является приоритетным направлением при решении проблемы вовлечения в хозяйственный оборот вторичных ресурсов, увеличения глубины переработки сырья, снижения энергоемкости и повышения экологичности производства.

В настоящее время накоплено достаточно результатов, свидетельствующих о том, что микроорганизмы в природных и техногенных системах развиваются не как независимых друг от друга клетки, способные к автономному росту, а находятся в постоянном взаимодействии, напоминая при этом многоклеточный организм и характеризуются сложными процессами, протекающими внутри сообщества [Артюхова, 2006]. Характерным признаком таких систем является кооперация отдельных клеток, деятельность которых направлена на достижение одного результата, например, образование молочной кислоты, что свойственно для кефирных грибков. [Заварзин, 2003; Сетров, 1971; Свирежев, Логофет, 1978].

Удельная скорость роста монокультур определяет степень их взаимозависимости в ассоциации и стабильность количественного соотношения. [Харченко, 1993]

Ассоциативные культуры микроорганизмов могут состоять из популяций, являющихся представителями как одного рода, так и разных родов микроорганизмов, относящихся как к про-, так и к эукариотам.

Важнейшую роль в превращении сообщества микроорганизмов в систему, действующую как единое целое, выполняют трофические взаимоотношения микроорганизмов. В настоящее время выявлены ряд других механизмов взаимодействия клеток: образование специфических антибиотических веществ, взаимодействия, основанные на химической и звуковой коммуникации [Хмель, 2006; Журина и др., 2013; Панкрушина, 2002; Стоянова, 2008].

Примером коммуникативных взаимодействий бактерий в сообществе является «Quorum sensing» (QS) – особый тип регуляции экспрессии генов, зависящий от плотности популяции. В QS участвуют два обязательных

компонента: аутоиндуктор (АИ) – низкомолекулярный регулятор, легко диффундирующий через клеточную стенку, и взаимодействующий с аутоиндуктором рецепторный регуляторный белок. При высоких плотностях популяции бактерий аутоиндукторы накапливаются в культуре. Достигнув определенной концентрации (пороговой концентрации), АИ, взаимодействуя с рецепторными белками, активирует их. «Quorum sensing» действует как механизм, определяющий регуляцию скоординированного поведения бактерий на уровне популяции: биолюминесценция, формирование биопленок, синтез антибиотиков, вирулентность патогенных и фитопатогенных бактерий (синтез факторов вирулентности), синтез внеклеточных ферментов, синтез ЭПС и т.д. [Хмель, 2006].

Выявлен также вид межклеточной коммуникации через испускаемые и воспринимаемые клетками акустические сигналы («биозвук»), посредством которых клетки взаимодействуют друг с другом [Панкрушина, 2002].

Разделение метаболических функций, их распределение среди популяций микроорганизмов является компенсацией отсутствия эффективных механизмов деградации ресурса у отдельного вида. Метаболические взаимодействия кооперированных сообществ основаны на переносе метаболитов между партнерами: один – продуцирует, другой – метаболизирует.

Микробные сообщества состоят из взаимодействующих между собой функционально различных микроорганизмов, подчиняющихся закономерностям системы. Организация таких сообществ подчиняется задаче обеспечить наибольшую устойчивость в рамках естественного отбора [Заварзин, 2003].

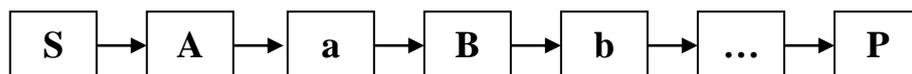
Главное правило в организации трофических взаимоотношений в микробном сообществе является полнота использования энергии химических реакций, полное использование энергии поступающего органического вещества. В сообществе в зависимости от внешних условий может быть множество различных путей использования органического вещества, но все они должны обеспечить возможность существования организмов, осуществляющих отдельные стадии превращения. То есть, трофические взаимоотношения в микробном

сообществе определяются специализацией разных организмов по используемым субстратам и образуемым продуктам [Заварзин, 2003].

Основным в микробном сообществе является цикл органического углерода.

Наиболее характерной организацией деструктивной ветви микробного сообщества является ступенчатая организация. Заварзиным Г.А. описано несколько возможных структур в организации сообществ:

1) Простая трофическая цепь, основанная на метабиотических отношениях.

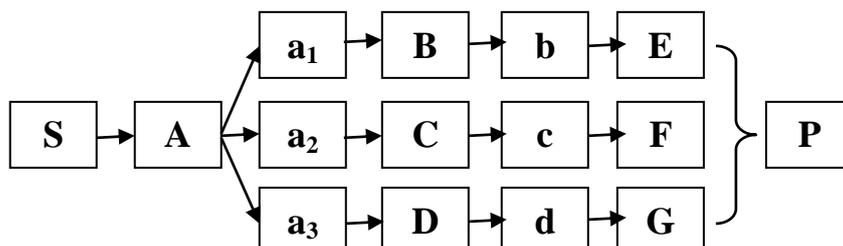


где S – субстрат, P – конечный продукт метаболизма, A – продуцент, a – метаболит, образуемый продуцентом, и т.д.

Сообщество как целое соответствует требованиям термодинамики и в данных конкретных условиях обеспечивает необходимой энергией всех ее компонентов. На каждом этапе выход энергии является достаточным для синтеза АТФ и поддержания популяции на соответствующем уровне. Выход энергии суммы реакций зависит от донора электронов и реакций, связанных с окислением.

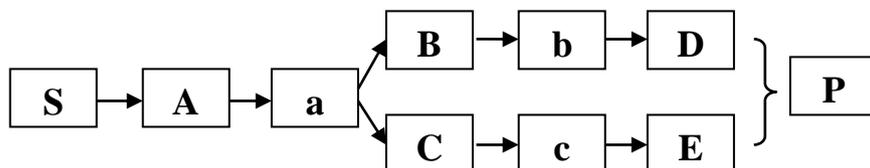
Первый этап в редуционном сообществе осуществляют первичные продуценты. Если субстратом является нерастворимые органические вещества, то первичным продуцентом являются микроорганизмы гидролитики, заселяющие поверхность субстрата и продуцирующие экзоферменты. Растворимые же органические субстраты могут использоваться любыми группами организмов, наиболее активно их усваивающих.

2) Продуцент образует разные продукты метаболизма, которые используются разными организмами (смешенное брожение, гидролиз лактозы молочнокислыми бактериями, образование мономеров при воздействии на природные полимеры, биологическая очистка сточных вод).



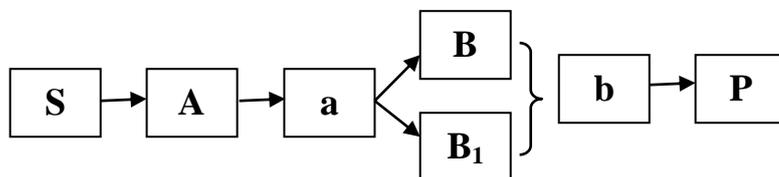
Между организмами, использующими разные субстраты, могут возникать кооперативные взаимоотношения или конкурентные, касающиеся второстепенных факторов.

3) Разные виды, образующие разные метаболиты, потребляют общий субстрат (метаболит, образованный продуцентом).



Виды, принадлежащие одному трофическому уровню, могут находиться либо в состоянии конкуренции, либо в коалиции его использования. Конкуренцию выигрывает тот компонент системы, чьи аутоэкологические характеристики при данных условиях обеспечивают его большую активность роста.

4) Продуцент образует метаболит, который используется разными физиологически и функционально сходными организмами, образующими одинаковые метаболиты. Организмы B и B₁ конкурируют за общий субстрат.



В соответствии с правилом «конкурентного исключения» Гаузе потребление одних и тех же субстратов может осуществляться только видами с перекрывающимися экологическими нишами. Среди них могут доминировать только те, кинетические характеристики которых более соответствуют условиям, складывающимся в сообществе.

Помимо трофических взаимодействий ряд свойств микроорганизмов могут регулировать отношения в сообществе:

- способность микроорганизмов к адгезии и сорбции, разное сродство к субстрату (по мере истощения субстрата происходит смена одних видов видами с большим сродством к субстрату); потребность в факторах роста и др.;

- антагонистические свойства (активный антагонизм), паразитизм (фаголизис);

- внутренний транспорт и скорость передачи сигнала между компонентами, молекулярная диффузия [Заварзин, 2003].

На основании анализа литературы можно сформулировать несколько основных положений, характеризующих возможную взаимосвязь микроорганизмов в ассоциативных культурах [Сетров, 1971; Свирежев, Логофет, 1978; Заварзин, 2003]:

- ассоциативные системы образуются на основе связей между ее составляющими, и степень целостности и организованности системы определяется тем, насколько свойства компонентов системы направлены на поддержание функции целого. При этом разные ассоциативные структуры имеют общность свойств в той степени, в какой степени одинаковы их функции;

- основой объединяющей микроорганизмы в сообщество, действующее как единое целое, являются трофические связи;

- главным правилом организации трофической системы микробного сообщества является полнота использования энергии химических реакций;

- потребление одних и тех же ресурсов может осуществляться между видами с перекрывающимися экологическими нишами; экологическая ниша определяет место и роль данного вида в структуре конкурентных сообществ (принцип конкурентного исключения Гаузе);

- виды, принадлежащие одному трофическому уровню, находятся либо в состоянии конкуренции за ресурсы, либо в коалиции в их использовании и образуют горизонтальную структуру сообщества;

- при использовании одного субстрата конкуренцию выигрывает тот компонент системы, чьи аутоэкологические характеристики при данных условиях обеспечивают его наибольшую активность роста;

- между компонентами, использующими разные субстраты, конкуренция касается второстепенных факторов;

- по мере истощения субстрата происходит смена доминирующих видов видами с большим сродством к субстрату;
- адаптивная динамика сообщества основана на изменении количественного соотношении входящих в него видов;
- саморегуляция организма осуществляется благодаря большому разнообразию подсистем разного уровня, находящихся в информационном взаимодействии, определяющей которого является система генов. Генетическая регуляция сообщества зависит не только от наличия метаболита, но и от его концентрации, которая включает синтез соответствующего белка – фермента;
- роль удерживания разнородных организмов и объединения их в морфологически оформленное сообщество выполняет гликокаликс, слизистые чехлы и полисахаридные слои, которые выполняют также защитную функцию и обладают протекторными свойствами;
- пространственное распределение видов, их гомеоморфная дифференциация обусловлена разным притоком питательных веществ в систему, в ее края и глубину, а также физическим взаимодействием клеток, их когезией.

Выявленные основные закономерности формирования и функционирования ассоциативных культур являются основой для исследования ассоциативной культуры кефирных грибков.

1.2. Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов

Одним из эволюционно сложившихся, морфологически оформленных, стабильно функционирующих микробных сообществ являются кефирные грибки, которые в течение многих столетий использовались народами Кавказа, а в последние 70–80 лет и в европейских странах для производства кефира, который занимает особое место в создании потенциала продуктов, обладающих пробиотическими свойствами. Потребление кефира улучшает усвоение белков и уменьшает гликемический индекс [Urdaneta et al., 2007], стимулирует иммунную систему, обладает противобактериальным, противоопухолевым действием,

улучшает пищеварение [Otes, Cagindi, 2003; Farnworth, 2006]. Кефир обладает противовоспалительным и противоаллергическим действиями [Rodrigues et al., 2005; Lee M.-Y. et al., 2007], что является терапевтическим потенциалом для лечения аллергической бронхиальной астмы.

Кефир как кисломолочный продукт комбинированного брожения, состоящий из молочнокислых бактерий и дрожжей и содержащий в легкоусвояемой форме иммунные белковые фракции молока, может служить лечебно-диетическим средством при заболеваниях различного рода, связанных с малокровием, при хронических процессах дыхательных органов, заболеваниях пищеварительной системы, включая дисбактериоз [Бондаренко, 2004; Зигангирова, 2006].

Микроорганизмы кефирных грибков проявляют антагонизм по отношению к *C.albicans*, к мицелиальным грибам родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Cunnunghamella*, причем ингибирующее действие на рост грибов оказывают не только микроорганизмы кефира, но и их метаболиты, образуемые в процессе культивирования [Тихомирова, Иванова, 2011; 2013].

Технология получения кефира включает несколько стадий: активизация кефирных грибков, их культивирование на молоке, культуральная жидкость которых является грибковой и далее производственной кефирной закваской для производства кефира [ГОСТ Р 52093 – 2003].

Кефирные грибки используются как нативные, поддерживаемые на молоке, так и лиофильно высушенные. Активизацию сухих кефирных грибков проводят в обезжиренном пастеризованном молоке (2–3 пересева). Для получения грибковой закваски кефирные грибки культивируют в пастеризованном молоке в течение 24 часов. Образующая культуральная жидкость после отделения кефирных грибков (грибковая закваска), содержащая не только основные продукты молочнокислого и спиртового брожения, но и микроорганизмы, десорбированные из кефирных грибков, используется для получения производственной закваски, которая в свою очередь используется для получения кефира.

Кефир является сложным продуктом, содержащим кроме продуктов молочнокислого и спиртового брожения живые клетки молочнокислых бактерий, дрожжи и продукты их метаболизма. Основные направления трофических взаимоотношений: молочнокислое брожение осуществляется молочнокислыми бактериями с образованием молочной кислоты; дрожжи используют молочную кислоту для спиртового брожения, при этом образуется этиловый спирт и углекислый газ; уксуснокислые бактерии используют этанол [Феофилова, 1958; Фильчакова, 2005].

Характеристика кефирных грибков (зерен). Кефирные зерна представляют собой компактные образования неправильной, овальной формы. Поверхность кефирных грибков складчатая или бугристая, по форме напоминающие цветную капусту, консистенция упругая, цвет белый с желтоватым оттенком, вкус кислый, специфический. Их размер варьируется от нескольких миллиметров до 2–4 см. Матрица кефирного зерна, состоящая из белков и полисахарида, содержит бактерии и дрожжи [Королева, 2000; Abraham, de Antoni, 1999; Garrote et al., 2001; Otes, Cagindi, 2003; Фильчакова, 2004; Otes, Cagindi, 2003].

Кефирные грибки напоминают живой организм: они растут, делятся и в результате деления образуются совершенно идентичные по своей структуре и свойствам зерна. На практике новые грибки получают в результате роста и размножения ранее существовавших [Королева, 2000].

Приблизительный химический состав кефирных зерен: вода 80–90%, белки 3–6,5%, жиры 0,2–0,3%, полисахариды 6–12% [Abraham, de Antoni, 1999; Garrote et al., 2001; Farnworth, Mainville, 2008; Ларина, 2000]. Изучение белков кефирных гранул при использовании SDS-PAGE на акриламидном геле показало, что основные белки гранул имеют больший молекулярный вес, чем белки молока и не являются продуктами протеолиза [Abraham, de Antoni, 1999].

Увеличение веса кефирных зерен происходит в основном за счет синтеза белков и полисахаридов, в то время как микрофлора, присутствующая в зернах,

составляет всего 0.9% от сухого веса кефирного грибка. Удельная скорость роста общей массы кефирных грибков составляет около $0.04\text{--}0.1 \text{ сут}^{-1}$ [Abraham, de Antoni, 1999; Garrote et al., 2001; Rimada, Abrham, 2001; Schoevers, Britz, 2003]. При подборе оптимальных условий для увеличения прироста биомассы кефирных грибков (температура 25°C , перемешивание 80 об/мин, добавление в молоко лактозы, тиамина, солей, витаминов) удельную скорость роста кефирных грибков удавалось повысить до $0.3\text{--}0.45 \text{ сут}^{-1}$ [Zajsek et al., 2013], а в некоторых случаях при использовании синтетических сред и до 0.8 сут^{-1} [Harta et al., 2004].

При *микроскопировании микротомных срезов кефирного грибка* обнаруживались тесные переплетения палочковидных нитей, которые образуют строуму грибка, удерживающую остальные группы микроорганизмов [Королева, 2000].

Согласно данным электронной микроскопии микробиота кефирных зерен представлена дрожжевыми клетками лимоннообразной и вытянутой формы, которые находятся в тесном соседстве с кокками и короткими и длинными палочками (*p.Lactobacillus*). Короткие палочки, предположительно *Lactobacillus kefir*, расположены ближе к поверхности грибка, а длинные и изогнутые тонкие палочки, такие как *Lactobacillus kefiranofaciens*, по всему объему грибка и концентрация их увеличивается к центру [Arihara et al., 1990; Wang et al., 2012; Jianzhong et al., 2009]. Кокки преимущественно располагаются на поверхности дрожжевых клеток, в то время как палочки находятся в пространстве между дрожжевыми клетками. Дрожжи концентрируются как в центре кефирного грибка, так и по поверхности. Плотность расположения микробных клеток во внутренней части грибка ниже, чем на поверхности [Lopitz-Otsoa et al., 2006; Farnworth, Mainville, 2008; Jianzhong et al., 2009]. Предполагается, что распределение микроорганизмов на поверхности и внутри зерен зависит от их отношения к кислороду [Ларина, 2000], а также связано с различиями значений pH. Внутри зерен очень низкое значение pH, которое ингибирует рост лактококков [Farnworth, Mainville, 2008].

В связи со слабой адгезирующей способностью *L.lactis*, многими авторами при использовании электронной микроскопии не обнаруживалось присутствие кокков в составе кефирных грибков, не смотря на то, что *L.lactis* определяли как один из доминирующих видов в тех же грибках при использовании других методов [Jianzhong et al., 2009].

Е.П. Феофиловой было показано, что со стромой грибка наиболее прочно связаны дрожжи, которые сохранялись вместе с микробами стромы при тщательном отмывании поверхностной микрофлоры кефирного грибка и воздействии на нее спиртом, что может объяснять трудности, связанные с выделением дрожжевого компонента из кефирных грибков [Феофилова, 1958].

Микробный состав кефирных грибков. Ключ к установлению механизма формирования и функционирования ассоциативной культуры кефирного грибка лежит в установлении его микробиологического состава и их трофических взаимоотношений.

Из анализа литературных данных следует, что, несмотря на некоторые отличия в количественных соотношениях в кефирных грибках присутствуют практически постоянно четыре основные группы микроорганизмов: молочнокислые палочки, молочнокислые кокки, дрожжи и уксуснокислые бактерии.

В работах авторов, исследующих кефирные грибки, используемые при производстве кефира в разных регионах, приводятся разные данные, характеризующие микробный состав кефирных грибков.

В качестве доминирующих в составе кефирных грибков рядом авторов [Фильчакова, 2005; Елинов, Ларина 1999; Зипаев, 2008] определялись мезофильные молочнокислые палочки *p.Lactobacillus*, количество которых от общей микрофлоры составляло около 70–90%. Количество мезофильных молочнокислых стрептококков составляло около 8%, уксуснокислых бактерий – 0.05%, дрожжей – 0.5–3%.

По данным других авторов доминирующими в кефирных грибках являлись дрожжи, которые составляли 60% от всей микрофлоры грибков, 36% составляли *p.Lactobacillus* и 3% – *p.Lactococcus* [Abraham, de Antoni, 1999].

При использовании электронной микроскопии [Molska et al., 1980] было определено, что в коммерческих кефирных зернах, используемых в Польше, содержалось 66% молочнокислых палочек, 16% стрептококков и 18% дрожжей.

В работах Симовой (2002г) в качестве доминирующей микрофлоры в консорциуме кефирных грибков определялись *Lactococcus lactis*, которые составляли 58–70% от общей микрофлоры грибков.

Можно предполагать, что различные результаты полученные авторами связаны с тем, что *L.lactis* слабо адгезируется на поверхности кефирного грибка и практически полностью выходит в культуральную жидкость, что влияет на достоверность полученных результатов [Farnworth, Mainville, 2008].

Большие различия в определении видовой принадлежности доминирующих видов описано разными авторами. Доминирующими в зернах тибетского риса определены *L.acidophilus* (40%) и *L.casei* (40%) и чуть меньше *L.diviergens* (15%) [Ларина, 2000]. Бактерии *Lb.plantarum*, *Lb.paracasei*, *Lb.acidophilus*, *Lb.delbrueckii* и *Lb.kefiranofaciens* определены как доминирующие в кефирных грибках в работе [Lopitz-Otsoa et al., 2006].

А в работе [Зипаев и др., 2008] молочнокислые бактерии *Lb.plantarum* были выделены из кефирных грибков только при добавлении дрожжевого экстракта в среду культивирования и не были изолированы из гранул с небольшим периодом активации, а также и из кефирных грибков, длительно используемых в производстве кефира. В составе кефирных грибков отмечено присутствие мицелиального гриба *Geotrichum candidum* только на ранних этапах производства кефира, на основании чего авторы предположили, что этот гриб участвует в образовании кефирных грибков, образуя строму на поверхности гранул, и не влияет на характеристики грибков [Зипаев и др., 2008].

По литературным данным в кефирных грибках разными авторами описано большое количество разных видов молочнокислых бактерий (табл. 1.1).

Микробный бактериальный состав кефирных грибков

Бактерии	Литературные источники
Лактококки	
<i>Lactococcus lactis</i>	Garrote et al., 2001; Зипаев и др., 2008; Angulo et al., 1993; Pintado et al., 1996; Simova et al., 2002; Witthuhn et al., 2004, 2005; Farnworth, Mainville, 2008; Frengova et al., 2002; Yüksekdağ et al., 2004
<i>Lactococcus cremoris</i>	Yüksekdağ et al., 2004
<i>Streptococcus lactis</i>	Козырева, 2011
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Simova et al., 2002; Frengova et al., 2002; Yüksekdağ et al., 2004
<i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	Angulo et al., 1993
<i>Streptococcus durans</i>	Yüksekdağ et al., 2004
Лактобациллы	
<i>Lactobacillus kefir</i>	Garrote et al., 2001; Yaman, 2004; Angulo et al., 1993; Pintado et al., 1996; Bosch et al., 2006; Farnworth, Mainville, 2008
<i>Lactobacillus parakefir</i>	Garrote et al., 2001; Takizawa et al., 1994; Bosch et al., 2006
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Yaman, 2004; Lopitz-Otsoa et al., 2006; Fujisawa et al., 1988; Farnworth, Mainville, 2008;
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Garrote et al., 2001; Lopitz-Otsoa et al., 2006; Зипаев и др., 2008; Bosch et al., 2006
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lopitz-Otsoa et al., 2006; Елинов, Ларина, 1999; Козырева, 2011; Angulo et al., 1993
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	Takizawa et al., 1994
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Yaman, 2004; Lopitz-Otsoa et al., 2006; Simova et al., 2002; Frengova et al., 2002
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	Witthuhn et al., 2004, 2005
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lin et al., 1999; Simova et al., 2002; Frengova et al., 2002
<i>Lactobacillus brevis</i>	La Riviere et al., 1967; Елинов, Ларина, 1999; Зипаев и др., 2008; Angulo et al., 1993; Simova et al., 2002; Witthuhn et al., 2004, 2005; Frengova et al., 2002
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Зипаев и др., 2008; Angulo et al., 1993; Witthuhn et al., 2004, 2005
<i>Lactobacillus casei</i> subsp.	Елинов, Ларина, 1999

<i>casei</i>	
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Елинов, Ларина, 1999
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>tolerans</i>	Angulo et al., 1993
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>pseudoplanctarum</i>	Angulo et al., 1993; Simova et al., 2002
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>casei</i>	Yaman, 2004; Lopitz-Otsoa et al., 2006
<i>Lactobacillus divergens</i>	Елинов, Ларина, 1999
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Witthuhn et al., 2004, 2005
<i>Lactobacillus galinarum</i> ,	Козырева, 2011
<i>Lactobacillus viridescens</i>	Angulo et al., 1993
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Angulo et al., 1993
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Angulo et al., 1993
<i>Lb. confuses</i>	Yaman, 2004
Leuconostocs	
<i>Leuconostoc spp.</i>	Angulo et al., 1993
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Garrote et al., 2001; Зипаев и др., 2008; Lin et al., 1999; Witthuhn et al., 2004, 2005; Farnworth, Mainville, 2008
<i>Leuconostoc lactis</i>	Witthuhn et al., 2004, 2005
Enterococci	
<i>Enterococcus hirae</i>	Козырева, 2011
<i>Enterococcus durans</i>	Козырева, 2011
Уксуснокислые бактерии	
<i>Acetobacter spp.</i>	Angulo et al., 1993; Garrote et al., 2001
Другие бактерии	
<i>Cryptococcus humicolus</i> ,	Зипаев и др., 2008
<i>Pediococcus spp.</i>	Angulo et al., 1993
<i>Micrococcus spp.</i>	Angulo et al., 1993
<i>Bacillus spp.</i>	Angulo et al., 1993
<i>Escherichia coli</i>	Angulo et al., 1993

Длительное время исследователями игнорировалось возможное присутствие в кефирных грибках термофильных молочнокислых палочек, поскольку продукт производят при сравнительно низких температурах [Хамнаева, 1987].

Однако еще С.А. Королевым было описано присутствие в составе кефирных грибков термофильных молочнокислых палочек *Bact. casei*, которые играют

большую роль в ассоциации молочнокислых микроорганизмов в кефирной закваске при нарушении режимов культивирования кефирных грибков [Королев, 1974]. Но количество термофильных палочек в грибах при нормальных режимах культивирования определялось не более 10^3 КОЕ/г [Фильчакова, 2005]. Вероятно, небольшая концентрация этих бактерий является причиной того, что их довольно сложно выделить из кефирных грибков и рядом авторов они рассматриваются как посторонняя микрофлора.

Несмотря на то, что исследования состава кефирных зерен ведутся в течение длительного времени, до сих пор остается не достаточно ясным вопрос о дрожжевом компоненте грибков. Анализ данных литературы показывает, что авторами определялись в составе кефирных зерен, используемых на разных молочных предприятиях, как дрожжи, способные сбраживать лактозу, так и дрожжи, не сбраживающие лактозу (табл. 1.2).

Так при исследовании микробного состава кефирных зерен из четырех различных источников, аргентинскими учеными было показано, что в микрофлоре всех образцов присутствуют дрожжи рода *Saccharomyces*, и только в одном образце было выявлено наличие *Kluveromyces marxianus*, которые характеризовались способностью сбраживать лактозу [Garrote et al., 2001].

Таблица 1.2.

Характеристики дрожжевых компонентов кефирных зерен

Источники литературы	Выделенные дрожжи	Способ-ть сбраж-ть лактозу	Примечание
Garrote et al., 2001	<i>Kluveromyces marxianus</i>	сбраж.	
	<i>p.Saccharomyces</i>	не сбраж.	
Королева, 2000	дрожжи	сбраж.	Усиление роста молочнокислых палочек
Lopitz-Otsoa et al., 2006	<i>Candida kefir</i>	?	
	<i>Sac. turicensis</i>	?	
	<i>Sac. cerevisiae</i>	?	
	<i>Sac. unisporus</i>	?	
	<i>Kluveromyces marxianus</i>	сбраж.	

	<i>Kluyveromyces lodderae</i> <i>Candida humilis</i>	? ?	
Frengova et al., 2002	<i>Sac. cerevisiae</i>	?	Усиление синтеза кефирана
Елинов, Ларина, 1991	<i>Sac. cerevisiae</i>	?	Сбраж. глюкозу, галакт., сахар.
	<i>Candida tibetica</i>	не сбраж.	Сахара не сбраж. Ассимилирует глюк., галакт, сахарозу, мальтозу и т.д. Не ассимил. лактозу, D,L-молочную к-ту
Kourkoutas et al., 2002	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>p.Candida</i> , <i>Sac. cerevisiae</i> , <i>p.Pichia</i>	?	
Козырева, 2011	<i>Candida krusei</i>	не сбраж.	Патогенный вид, усваивают лактозу
	<i>Sac. unisporus</i>	не сбраж.	Не усваивают лактозу
Хамагаева, Ванданова, 2004	дрожжи	сбраж. не сбраж.	Одновременное их присутствие
Зипаев и др., 2008	<i>Candida lambica</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida kefir</i> , <i>Zygosaccharomyces sp.</i>	?	
Хамнаева, Доржиева, 2006	<i>p.Torulopsis</i>	сбраж.	
Farnworth, Mainville, 2008	<i>Torulopsis holmii</i>		
Garofalo et al., 2015	<i>Dekkera anomala</i> ,	?	
Korsak et al., 2015	<i>Naumovozyma spp.</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kazachastania khefir</i>	?	
Хамнаева, Павлова, 2010	дрожжи	сбраж.	

Возможность дрожжей размножаться в молоке и молочных продуктах определяется их способностью использовать лактозу в аэробных условиях для

роста или использовать ее для спиртового брожения в анаэробных, а также наличием в молоке микрофлоры, обладающей β-галактозидазной активностью. В связи с этим дрожжи, присутствие которых в молоке и молочных продуктах отмечалось рядом авторов, можно отнести к 3 группам:

- дрожжи, не способные к спиртовому брожению, но окисляющие лактозу в аэробных условиях (в молоке растут, но не используют лактозу для спиртового брожения). К таким дрожжам относятся дрожжи родов *Mycoderma*, *Torula*.

- дрожжи, не использующие для спиртового брожения лактозу, но использующие для брожения другие сахара, могут развиваться только в совместно с микроорганизмами, обладающими β-галактозидазной активностью. К ним относятся дрожжи р. *Saccharomyces* и др.

- дрожжи, использующие лактозу для спиртового брожения. К ним относятся *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces fragilis*, *Torulopsis kefir*, *Torulopsis sphaerica*, *Candida pseudotropicalis* и др. [Еремина, 2004].

В многочисленных работах было показано постоянное присутствие в составе кефирных зерен уксуснокислых бактерий [Феофилова, 1958; Фильчакова, 2004, 2005; Елинов, Ларина, 1999; Farnworth, Mainville, 2008]. Уксуснокислые бактерии (ацетобактерии), выделенные из молочных продуктов, относятся к роду *Acetobacter*, являются подвижными грамотрицательными палочками, которые располагаются поодиночке, попарно, цепочками. У некоторых штаммов могут присутствовать инволюционные формы: сферические, изогнутые, нитевидные и т.д. Спор и капсул не образуют. Окисляют спирт до уксусной кислоты в аэробных условиях (так называемое уксуснокислое брожение), некоторые могут окислять ацетат и лактат до CO₂ и H₂O. Лактозу не гидролизуют [Определитель бактерий Берджи Т.1, 1997; Еремина, 2004].

Микробный состав грибковой закваски отличается от состава кефирных грибков соотношением основных групп микроорганизмов [Фильчакова, 2005; Farnworth, Mainville, 2008]. Доминирующими в закваске определены мезофильные гомоферментативные молочнокислые стрептококки (10⁸–10⁹

КОЕ/мл). Количество мезофильных молочнокишечных палочек в закваске не менее 10^6 КОЕ/мл, термофильных молочнокислых палочек – 10^5 , дрожжей – 10^5 – 10^6 и уксуснокислых бактерий – 10^4 – 10^5 КОЕ/мл. При увеличении продолжительности процесса сквашивания и при повышении температуры количество молочнокислых палочек в кефире повышалось до 10^9 КОЕ/мл, что приводило к переокислению продукта [Фильчакова, 2005; Еремина, 2004; Хамагаева, Ванданова, 2004].

По данным же Lopitz-Otsoa [et al., 2006] 90% микрофлоры кефира составляли *Lactococcus lactis* и *Candida kefir*.

При исследовании тибетского риса [Елинов, Ларина, 1999] было отмечено, что большая часть микрофлоры продукта, приготовленного на молочно сахарной воде, представлена лактобациллами *L. casei* и *L. divergens* (около 90% от общего числа микроорганизмов), число уксуснокислых бактерий составляло около 7%. В зерне тибетского риса количество уксуснокислых бактерий составляло всего около 0.045%. Количество же дрожжевых культур и в напитке, и в зерне не превышало 0.45%.

Из-за сложности внутри и межвидовых взаимоотношений между компонентами кефирных грибков установление четкой вертикальной трофической зависимости весьма затруднительно. Анализ данных литературы определения видового разнообразия микробного профиля кефирных грибков и методов, используемых при их исследовании, показывает, что получение гетерогенных данных о микробном профиле кефирных грибков может определяться **методическими трудностями при использовании классических микробиологических методов**, основанных на высеве растертых кефирных зерен на твердые питательные среды. Так, в монокультуре многие микроорганизмы теряют свои специфические свойства и активность, а некоторые просто не растут [Farnworth, 2006; Farnworth, Mainville, 2008]. Было показано, что молочнокислые бактерии *Lactobacillus brevis*, продуцирующие кефирин, теряют способность к образованию капсул при первом посеве на синтетические среды [Квасников, Нестеренко, 1975; Fujisawa et al, 1988].

Сложности возникают и при подборе специфических сред, для выделения всех компонентов кефирного грибка из-за не высокой их селективности, так как определенные виды молочнокислых бактерий способны расти более чем на среде одного состава. Так, например, бактерии *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* способны расти на средах MRS, КСА + TTC и КСА + V, *Lactococcus lactis subsp. lactis* – на средах КСА + TTC и КСА + V, а *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* – на среде Pal–P, селективной для пропионовокислых бактерий [Зипаев и др., 2008]. Для активации роста некоторых микроорганизмов необходимо создавать особые условия. Показано, что многие молочнокислые палочки не способны образовывать колонии на твердой агаризованной среде в аэробных условиях.

При применении стандартных микробиологических методов высева на агаризованную среду трудно обеспечить необходимую полноту выделения компонентов кефирных зерен. Морфологические характеристики колоний некоторых микроорганизмов могут быть настолько близки, что их легко принять за идентичные культуры, в то время как колонии, мало различающие морфологией, могут быть образованы одним и тем же микроорганизмом [Farnworth, Mainville, 2008]. Так, например, в неоптимальных или неблагоприятных для роста условиях при длительном воздействии физических, химических, биологических стрессов на микроорганизмы наблюдалось выщепление минорных фенотипов (субпопуляций) молочнокислых бактерий [Симон, 2009], а также образование жизнеспособных некультивируемых клеток [Пахомов и др., 2011; Котова, 2013]. При рассеивании клеточных суспензий *Lactococcus lactis*, длительно хранящихся на голодных средах с лимитом по углеводам, отмечалось развитие отличных от доминантного типа вариантов, различающихся как морфологическими, так и биохимическими признаками [Симон, 2009; Пахомов и др., 2011].

В настоящее время для более полного анализа микрофлоры кефирного грибка все чаще применяются *молекулярно-генетические методы*, позволяющие установить видовую принадлежность выделяемых культур.

Метод 16S рРНК анализа чистых культур включает в себя предварительную изоляцию культур из ассоциации, что является весьма трудоемким процессом и снова приводит к использованию селективных сред. Это не может гарантировать полного извлечения культур из кефирного грибка при использовании классических микробиологических методов посева на твердые питательные среды.

Использование современных молекулярно-генетических методов, таких как метод градиентного геля электрофореза (DGGE) позволяет определить микробный профиль сообщества микроорганизмов без выделения чистых культур. Но молекулярно-биологические методы, также как и классические микробиологические имеют ряд недостатков. Так при идентификации микроорганизмов из ассоциаций «без выделения чистых культур» предполагается, что, после проведения ПЦР получают примерно равное количество ампликонов всех присутствующих в образце бактерий, однако это может быть не так. В результате проведения ПЦР с универсальных праймеров получают больше ампликонов тех бактерий, численность которых больше в исходном образце и нуклеиновых кислот которых из образца выделено больше. Из-за очень низкой концентрации некоторых ампликонов их полосы на DGGE-фореграмме могут быть трудно различимы на фоне других полос. А высокие концентрации ампликонов близкородственных организмов на недостаточно качественной фореграмме могут выглядеть одной объемной полосой. Еще одним недостатком метода DGGE является возможность спонтанного синтеза химерных ампликонов при проведении ПЦР, которые могут быть приняты за новые, неидентифицированные или некультивируемые организмы [Нетрусов и др., 2005].

Данные исследователей, осуществлявших сравнительный анализ эффективности методов «с выделением чистых культур» и последующей идентификацией методом 16S рРНК анализа и метода «без выделения чистых

культур», градиентного гель электрофореза, для определения микробиологического состава кефирных грибков, показали, что оба метода имеют свои преимущества и недостатки. Некоторые виды молочнокислых бактерий удавалось определить только методом «с выделением чистых культур» и не удалось определить при помощи градиентного гель электрофореза. Авторы предполагают, что возможно это связано с большим содержанием в кефирных зернах ДНК других микробных групп помимо молочнокислых бактерий, что в свою очередь служит препятствием к специфической ПЦР-амплификации ДНК молочнокислых бактерий и может снижать качество полученных результатов. Кроме того, различные клеточные белки и возраст культур могут также мешать, влияя на отжиг праймеров или активность ДНК-полимеразы [Chen et al., 2008]. Однако присутствие некоторых бактерий было определено только при использовании культуро-независимого метода (табл. 1.3).

При анализе микробного состава трех кефирных грибков, используемых на разных молочных предприятиях, при использовании метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза было показано, что во всех трех грибках среди бактерий преобладали *Lactobacillus kefiranofaciens* и *Lactobacillus kefiri*, а среди дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, бактерии же *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* (сейчас *p.Lactococcus*) и *Acetobacter* присутствовали в небольших количествах [Leite et al., 2012]. Причем бактерии *Lactobacillus kefiranofaciens* преобладал и при культивировании, и при хранении, а *Lactobacillus kefiri* обнаруживался только в кефирном грибке, но не обнаруживался в кефире [Leite et al., 2013].

Определение присутствия в составе кефирных грибков условно патогенных бактерий *p.Pseudomonas sp.* и *E.coli* при проведении DGGE [Jianzhong et al., 2009; Chen H.-C. et al., 2008] вероятнее всего связано с заражением образца на какой-то из стадии эксперимента.

Микробный профиль кефирных грибков, определенный с применением методов «с выделением чистых культур» и «без выделения чистых культур»

Источники литературы	Идентифицированные виды и использованием методов:	
	«без выделения чистых культур»	«с выделением чистых культур»
Chen H.-C. et al., 2008	<i>Lb.kefiranofaciens</i> <i>Lb.kefiri</i> <i>Lc.lactis</i>	<i>Lb.kefiranofaciens</i> <i>Lb.kefiri</i> <i>Leu.mesenteroides</i>
Jianzhong et al., 2009	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus kefiri</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Kazachtania unispora</i> , <i>Kluuyveromyces marxianus</i> <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , <i>Kazachstania exigua</i>	
Miguel et al., 2010	<i>Gluconobacter japonicas</i> <i>Lactobacillus uvarum</i> ,	<i>L. helveticus</i> <i>L. kefiri</i> <i>Acetobacter syzygii</i>
Leite et al., 2012, 2013	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <i>Lactobacillus kefiri</i> <i>Lactobacillus parakefiri</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactococcus lactis</i> (<i>ssp.cremoris</i> и <i>ssp.lactis</i>) <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Acetobacter lavaniensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

При использовании сочетания методов сканирующей электронной микроскопии, классических микробиологических методов выделения колоний на селективных средах, денатурирующего градиентного гель-электрофореза и пиросеквенирования в кефирных зернах были определены следующие виды: *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Acetobacter genera*, *Enterococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Acetobacter fabarum*, *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter orientalis* [Garofalo et al., 2015].

Исследование микробного профиля 5 кефирных зерен, используемых на разных молочных предприятиях, и продукта кефира, полученного из них, с

использованием 16S пиросеквенирования показало присутствие более 20 видов бактерий, среди которых доминировали следующие виды: *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Gluconobacter frateurii*, *Lactobacillus kefiri*, *Acetobacter orientalis*, *Acetobacter lovaniensis*. Производственный кефир отличался от остальных, в нем преобладали *Lactococcus lactis* и *Leuconostoc mesenteroides* [Korsak et al., 2015].

Таким образом, при определении микробного профиля кефирных грибков необходимо учитывать метод идентификации микроорганизмов.

Показано, что состав и свойства кефирных зерен и кефира в значительной степени меняются в зависимости от их источника получения (место происхождения зерен) и **условий культивирования** [Lopitz-Otsoa et al., 2006; Lin et al., 1999; Hsieh H.-H. et al., 2012; Kök-Taş T. et al., 2013; Grønnevik H. et al., 2011; Gul et al., 2015; Garofalo et al., 2015]. В работе [Зипаев др., 2008] описано, что микробный состав кефирных зерен зависит от времени активации кефирных зерен и меняется на всем протяжении их культивирования.

При исследовании роста кефирных грибков на различных питательных средах отмечалось существенное влияние на увеличение прироста биомассы присутствие в среде продуктов гидролиза белков молока и лактозы и добавление других питательных компонентов [Фильчакова, 1999; Guzel-Seydim et al., 2011; Schoevers, Britz, 2003].

На прирост биомассы кефирных зерен и изменение соотношения основных групп микроорганизмов в составе кефирного грибка и закваске, приготовленной на их основе, также влияют соотношение кефирных зерен к молоку, температура культивирования, изменение режимов перемешивания. В зависимости от условий среды перевес получает одна из этих групп (мезофильные стрептококки, термофильные палочки, ароматобразующие бактерии, дрожжи сбраживающие и не сбраживающие лактозу, уксуснокислые бактерии) [Rimada, Abraham, 2001; Schoevers, Britz, 2003; Gao et al., 2012; Фильчакова, 2004; Хамагаева, Ванданова, 2004]. Повышение температуры культивирования с 20 до 30°C приводило к

увеличению количества дрожжей (с $7.1 \cdot 10^6$ до 10^7 КОЕ/г КГ и $1.2 \cdot 10^5$ до $1.7 \cdot 10^6$ КОЕ/мл в закваске) и уксуснокислых бактерий (с 10^5 до 10^7 КОЕ/г КГ и $4.2 \cdot 10^4$ до $7.0 \cdot 10^6$ КОЕ/мл закваски), и не значительно влияло на количество мезофильных молочнокислых бактерий в составе кефирных грибков [Фильчакова, 2004]. Однако в составе закваски более высокая температура ферментации 25°C приводила к быстрому снижению значений pH, что приводило к ингибированию роста гомо- и гетероферментативных молочнокислых стрептококков. В закваске приготовленной при 25°C большее количество молочнокислых палочек, чем в закваске приготовленной при $18\text{--}20^\circ\text{C}$ [Хамагаева, Ванданова, 2004].

На состав и консистенцию кефира оказывало влияние количество вносимого посевного материала и время хранения полученного продукта. Так при внесении в молоко кефирных грибков в качестве инокулята в количестве 1% в полученном продукте наблюдалось более высокое содержание молочнокислых бактерий, а при внесении 5% – более высокое содержание дрожжей и уксуснокислых бактерий, а также увеличение вязкости кефира [Irigoyen et al., 2005]. Отмечено, что pH закваски зависело от количества вносимого инокулята: при соотношении закваска:молоко 1:10 значения pH снижаются до 3.6–3.8, а при соотношении 1:30 или 1:50 значения pH снижаются до 4.4–4.6 [Koroleva, 1988]. Вероятнее всего это связано с усилением гидролиза белков молока при увеличении количества вносимых кефирных грибков [Ferreira et al., 2010].

На свойства микробной системы кефирных грибков влияние оказывают не только биологические факторы, такие как создание условий для развития анаэробной микрофлоры, но и физические воздействия [Хамнаева, 2001]. При встряхивании в процессе культивирования наблюдались увеличение продукции экзополисахаридов культурами кефирного грибка и существенные различия в качественном и количественном составе зерен. Так, при встряхивании снижалось количество дрожжей и молочнокислых бактерий в кефирных зернах, но при этом значительно увеличивалось содержание углеводов и жиров [Schoevers, Britz, 2003].

На микробный состав кефирных зерен могут влиять и другие факторы. В частности, промывание грибков при их пересеве, а также изменения свойств молока в течение ферментации влияет на гетерогенность условий, окружающих кефирные зерна, условий аэрации, концентрации белка сгустка. Влияние гетерогенных условий на распределение микрофлоры кефирного грибка было показано опытным путем. Основываясь на определении фермента β -галактозидаза с использованием хромогенного субстрата, исследователи сравнивали распределение микроорганизмов, способных сбраживать лактозу в кефирных грибках, инкубированных в однородной среде, созданной за счет встряхивания, и в гетерогенной среде. Неравномерное окрашивание кефирных зерен в последнем случае показывало, что неоднородность среды приводила к различиям в составе микрофлоры ассоциации [Ninane et al., 2005].

Отмечено, что перемешивание ферментационной смеси мешало росту плесени на поверхности закваски, способствовало распределению микроорганизмов и их метаболитов, приводило к десятикратному увеличению гомоферментативных молочнокислых стрептококков и дрожжей, не влияло на количество гетероферментативных молочнокислых стрептококков, термофильных молочнокислых палочек и уксуснокислых бактерий и оказывало незначительное влияние на количество летучих жирных кислот в конечной закваске [Farnworth, Mainville, 2008].

Изучение методов сохранения кефирных зерен показало, что состав микрофлоры зерен, хранящихся при -20°C в течение 120 дней, не отличался от состава микрофлоры свежих зерен. В качестве кефира, полученного из тех и других зерен, не выявлено различий и по реологическим свойствам, кислотности и содержанию CO_2 . Хранение зерен при 4°C приводило к ухудшению качества получаемого кефира [Garrote et al., 1997]. Показана возможность использования лиофилизированных кефирных зерен [Libudzisz, Piatkiewicz, 1990] в качестве стартовых культур для промышленного производства кефира. Однако хранение лиофильно высушенных зерен в течение 1–3 месяцев в упаковке с различной водно- и кислородно-проницаемостью приводило к снижению функциональной

активности зерен: более медленное снижение рН, меньшая кислотность, снижение активности сбраживания лактозы, низкий уровень синтеза молочной кислоты, – по сравнению со свежими зёрнами. Отмечены и различия и в их микробном составе [Witthuhn et al., 2005]. Если при длительном хранении (около 10 месяцев) замороженные зёрна сохраняли свою окислительную активность, то при использовании кефирных грибков, высушенных на воздухе и лиофилизированных, наблюдалось увеличение lag-фазы и снижение активности кислотообразования.

Отмечалась [Абрамова, 2013] чувствительность молочнокислых бактерий к сезонным изменениям качества молока.

В зависимости от среды и условий культивирования микрофлора кефирных грибков и кефирной закваски обладает уникальной способностью к саморегуляции [Хамагаева, Ванданова, 2004]. Симбиоз микроорганизмов в кефирных зёрнах обеспечивает сохранение на всем протяжении года качества кефира и микробного профиля кефирных зерен, лишь с незначительными изменениями соотношений основных групп микроорганизмов. Микробный состав кефира может отличаться от микробного состава кефирных грибков из-за различий в условиях (рН и др.), времени культивирования, а также это различие может быть связано с местом нахождения микроорганизмов в зёрнах. Так, например, молочнокислые бактерии *Lactococcus*, располагающиеся на поверхности кефирных зерен, легко десорбируется в культуральную жидкость и поэтому в кефире их достаточно много [Farnworth, Mainville, 2008].

Многими авторами показана возможность **использования микробной ассоциации кефирных грибков не только для получения кефира**, но и для получения других продуктов с пробиотическими свойствами при использовании различных субстратов.

Так Н.И. Хамнаевой с соавторами была разработана технология получения напитка на основе молочной сыворотки с закваской кефирных грибков и культурой *L.acidophilus* (А.с. 1741720) [Хамнаева и др., 2000]. Показана

возможность использования кефирных зерен на соевом молоке [Abraham, de Antoni, 1999]; возможность использования кефира для получения кисломолочных напитков с добавлением крупяных концентратов [Еремина, Иванова, 2009]; использование смешенной культуры, содержащей кефирные зерна, для производства хлеба с увеличенным сроком хранения и улучшенным вкусом [Plessas et al., 2005]; возможность добавления кефира в качестве сопутствующей культуры при производстве сыра типа брынзы [Kourkoutas et al., 2006].

Взаимоотношения микробных компонентов кефирных зерен определяются особенностями метаболизма отдельных микробных компонентов.

Практически все молочнокислые бактерии факультативные анаэробы, грамположительные, неподвижные, спор и капсул не образуют. Метаболизм бродильного типа. Особенностью молочнокислых бактерий является способность к росту на среде с низким значением рН и высокая спиртоустойчивость. Большинство молочнокислых бактерий мезофиллы. К термофильным относятся *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*. Молочнокислые бактерии нуждаются в богатых сложных средах. Для роста необходимо присутствие аминокислот, витаминов группы В, компонентов нуклеиновых кислот (пуриновых и пиримидиновых оснований) [Еремина, 2004; Петухова и др., 2008; Определитель бактерий Берги Т.2].

Различные штаммы одного вида молочнокислых бактерий могут по-разному относиться к одним и тем же источникам углерода и обладать потребностью в разных ростовых факторах [Стойнова, 2008].

Отмечаются благоприятные воздействия одних видов молочнокислых бактерий на другие. Часто закисляющая активность смешанной культуры молочнокислых бактерий значительно выше закисляющей активности каждой из составляющих ее бактерий отдельно. Чаще всего это связано с тем, что рост культур со слабой протеолитической активностью стимулируется культурами, обладающими более высокой протеолитической активностью. Молочнокислые палочковидные бактерии обладают большей протеолитической активностью, чем

кокковые формы. Например, *L.casei* могут переводить до 25–30% казеина в растворимую форму, тогда как *L.cremoris* и *L.lactis* – 15–17% [Стойнова, 2008]. В работе [Simova, Simov et al., 2006] отмечено, что штамм *Lactobacillus. helveticus* MP12, характеризующийся высокой протеолитической активностью и слабым кислотообразованием, стимулировал рост и образование молочной кислоты в смешанной культуре *Lactococcus lactis* C15 – 1% + *Lactobacillus helveticus* MP12–3% + (*Streptococcus thermophilus* T15 + *Lactobacillus bulgaricus* HP1 = 1:1) – 3%, каждая из которых в отдельности обладали меньшей закисляющей способностью и меньшей скоростью роста. Кислотообразование смешанными культурами по сравнению с чистыми повышалось на 30–50%. Этот эффект по мнению авторов обусловлен сложными процессами обмена продуктами в ассоциативной культуре.

Полученные данные [Артюхова, Гаврилова, 2010] показывают, что в смешанной культуре *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* аминокислота валин, выделяемая *L. delbrueckii*, стимулирует развитие термофильного стрептококка. Обладая слабой протеолитической активностью, термофильный стрептококк образует пролин, содержание которого в молоке минимальное, и потребляет остальные аминокислоты, образуемые *L. delbrueckii*. В свою очередь *Str. salivarius* создает более благоприятные условия для развития болгарской палочки за счет синтезируемой им муравьиной кислоты и снижения pH среды.

Сложные взаимоотношения, как симбиотические, так и антагонистические между организмами, входящими в состав кефирного грибка, могут меняться в зависимости от условий культивирования.

Описаны антагонистические взаимоотношения [Стойнова, 2008], обусловленные главным образом выделением специфических антибиотических веществ. Антибиотическая активность молочнокислых бактерий штаммоспецифична и связана со способностью синтезировать органические кислоты, антимикробные пептиды – бактериоцины, а также ряд низкомолекулярных соединений. Синтез бактериоцинов – наследственная особенность организмов, проявляющаяся в том, что каждый штамм способен

образовывать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ. Гены бактериоцинов грамположительных бактерий могут находиться и на плазмидах, и на хромосоме. Бактериоцины – это гетерогенные антибактериальные пептиды, разнообразные по уровню активности, механизму действия, молекулярной массе, генетическому происхождению и биохимическим свойствам. Для бактериоцинов грамположительных бактерий характерен довольно широкий спектр действия. Наблюдалось подавление развития грамположительных, грамотрицательных бактерий и микроскопических грибов штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К, выделенным из коровьего молока Бурятии [Устюгова и др., 2011]. Бактериоцины накапливаются внутри клетки и выделяются в среду культивирования. Далеко не все молочнокислые бактерии способны продуцировать бактериоцины. Так, при исследовании 250 различных штаммов молочнокислых бактерий и их антагонистического влияния друг на друга было показано, что из них 20% обладали антибиотической активностью, и лишь 12 продуцировали бактериоцин [Гейс и др., 1982]. Способность штаммов молочнокислых бактерий синтезировать бактериоцины также зависит от состава среды культивирования, ее pH и температуры культивирования. Максимальное накопление бактериоцинов у лактококков происходит к концу экспоненциальной фазы роста [Стоянова, 2008].

Различные типы бактериоцинов синтезируются микрофлорой кефира. При изучении 33 кефирных зерен ирландскими учеными было показано присутствие как минимум трех различных типов бактериоцинов синтезируемых молочнокислыми бактериями кокковой формы, отличающихся спектром действия: только против лактококков; против *Lb. casei*, *Lb. helveticus* и *Pediococcus pentosaceus* и третий против *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* [Cogan et al., 1997].

Разные молочнокислые бактерии могут вырабатывать разные бактериоцины. Штаммы *L.lactis* subsp. *lactis* продуцируют бактериоцины, ингибирующие как рост *Lb.casei* и другой сопутствующей микрофлоры пищевых производств [Vademuthu et al., 1994], так и *Listeria*, *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus*

aureus, *Lb. plantarum* [Lasagno et al., 2002], грамположительных бактерий, *E.coli*, *Pseudomonas* [Lee, Paik, 2001]. Помимо лактококков бактериоцины способны синтезировать и палочковидные бактерии. Так, например, бактерии *Lactobacillus paracasei subsp. tolerans* FX-6, выделенные из тибетского кефира, способны синтезировать бактериоцин широкого спектра действия, подавляющий рост грибов и бактерий [Miao et al., 2014].

Одним из наиболее изученных бактериоцинов мезофильных гомоферментативных лактококков является низин. Низин обладает бактерицидным действием на грамположительные микроорганизмы: стрептококки, стафилококки, пневмококки, микобактерии, споровые – аэробные и анаэробные бактерии, подавляет рост многих молочнокислых и пропионовокислых бактерий. Наиболее чувствительны к нему *Lb. helveticus* и *Lb. lactis* [Стойнова, 2008].

Показано, что некоторые штаммы молочнокислых стрептококков в смеси с другими культурами того же вида становятся преобладающими, даже если они не продуцируют антибиотики. Возможно, это связано с различиями в активности роста, кислотообразования, а также с различиями в устойчивости к конечным продуктам брожения, потребности в питательных веществах и др.

Многими авторами отмечается стимулирующее действие дрожжей по отношению к молочнокислым бактериям (табл. 1.4).

Таблица 1.4

Стимулирующее действие дрожжей и молочнокислых бактерий

Источники литературы	Культуры	Условия культивирования	Наблюдаемый эффект
Королев, 1974	Молочнокислые бактерии + дрожжи	культивирование на молоке	сохранение жизнеспособности в течение нескольких мес.
Феофилова, 1958	молочнокислой палочки + дрожжи	культивирование на молоке	значительно усиливается развитие палочки (особенно при культ. с сбраж. лактозу дрожжами)
Farnworth, Mainville,	<i>Lb. kefir</i> + <i>Candida kefir</i>	Добавление дрожжей до или	усиление роста <i>Lb. kefir</i> , синтеза молочной

2008		во время сбраживания молока	кислоты, глицерина и этанола
	Молочнокислые бактерии	добавление дрожжевого экстракта	усиление роста молочнокислых бактерий
Gobbetti et al., 1994	<i>L.brevis</i> subsp. <i>lindneri</i> + дрожжи <i>S.cerevisiae</i> или <i>S.exiguus</i>	среда, не содержащая валина или лейцина	активный рост <i>L.brevis</i> за счет выделения аминокислот дрожжами
Stadie et al., 2013	<i>Lb.nagelii</i> + <i>Zygotorulaspora</i> <i>florentina</i>		<i>Lb.nagelii</i> активно используют аргинин, синтезируемый дрожжами
Wulijideligen et al., 2013	3 штамма МКБ + 2 штамма дрожжей	Культивирование на восстановленном обезжиренном молоке	увеличение жизнеспособности и кислотообразующей способности МКБ
	<i>Candida kefir</i> 2Y305 + МКБ		увеличивалась продукция этанола до 1.35 г/л
	<i>S.cerevisiae</i> 4С + МКБ <i>Leuc.</i> <i>mesenteroides</i>		увеличение продукции этанола до 1.24 г/л (чистая культура дрожжей – 0.2 г/л)
Xie et al., 2012	<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> Н9 + дрожжи		Повышение пробиотических свойств <i>L.paracasei</i> : устойчивость к моделируемым сокам желудочно-кишечного тракта (рН 2.0 и 8.0); усиление способности к адгезии к слизистой оболочке кишечника
Cheirsilp et al., 2003; 2003; 2007, 2011; Tada et al., 2007	<i>L.kefiranofaciens</i> + <i>S.cerevisiae</i> .		Увеличение продукции ЭПС <i>L.kefiranofaciens</i>

Примечание: «МКБ» –молочнокислые бактерии.

Стимулирующее действие дрожжей возможно связано с изменением pH среды вследствие потребления молочной кислоты, с изменением состояния белковой части молока в результате протеолиза, с выделением ферментов или витаминов. Дрожжи в свою очередь активнее растут на закисленной среде в результате синтеза молочной кислоты молочнокислыми бактериями, используют экзопродукты метаболизма бактерий [Farnworth, 2006; Farnworth, Mainville, 2008].

Однако при совместном культивировании молочнокислых бактерий *L.helveticus* 130B4 с дрожжами *C.kefyr* 2Y305 и *L.reuteri* 940B3 с *S.cerevisiae* 4C уменьшалась кислотообразующая активность молочнокислых бактерий, что могло быть связано с использованием молочной кислоты дрожжами, но также уменьшалась жизнеспособность клеток *L.helveticus* в совместной культуре с *C.kefyr*, что говорит о существовании не только симбиотических взаимоотношений между ними [Wulijideligen et al., 2013].

Китайские исследователи при попытке создания искусственной закваски для производства кисломолочного продукта близкого к традиционному кефиру, был использован метод иммобилизации смеси чистых культур, выделенных из кефирного грибка в кальций-альгинатном геле. Молочнокислые бактерии и дрожжи были иммобилизованы отдельно друг от друга, однако, при совместном культивировании на молоке после нескольких ферментационных циклов было обнаружено, что в составе капсул с дрожжами присутствуют короткие цепочки молочнокислых палочек, окружающие дрожжевые клетки [Chen T.-H. et al., 2009]. Это явление подтверждает наличие тесного взаимодействия между компонентами, составляющими микрофлору кефирного грибка.

Механизмы взаимодействий микробных компонентов кефирных грибков. Симбиотическая связь про- и эукариотических клеток микробного консорциума кефирных грибков, созданная природой в процессе эволюции, обладает уникальным механизмом саморегулирования, проявляется при утилизации питательных компонентов среды. Прочные симбиотические

взаимоотношения лактобактерий и дрожжей обеспечивают протекание в питательной среде гомо- и гетероферментативного брожения.

Основным субстратом для жизнедеятельности ассоциативной культуры кефирного грибка при выращивании на молоке является лактоза. Под воздействием фермента β -галактозидазы продуцентами этого фермента дисахарид гидролизуется на глюкозу и галактозу.

Как правило бактерии и дрожжи синтезируют внутриклеточную β -галактозидазу с большой молекулярной массой (свыше 200 кДа) и сложной четвертичной структурой, обусловленной наличием нескольких субъединиц. [Сухих, 2007]. Фермент β -галактозидаза является индуцибельным ферментом, то есть обычно присутствует в клетке в следовых количествах и начинает активно синтезироваться, если в среду добавить лактозу. Но практически все β -галактозидазы ингибируются продуктами реакции – глюкозой и галактозой. Таким образом, фермент β -галактозидаза синтезируется в среде, в которой присутствует лактоза, но отсутствует глюкоза. [Ленинджер, 1976; Chen, Hounq, 1985]. Однако, в некоторых случаях показана способность β -галактозидазы образовывать дисахариды из глюкозы. Так в присутствии β -глюкозидазы, выделенной из миндаля, в глюкозосодержащем растворе образовывались гентиобиоза, ламинарибиоза, софороза, целлобиоза и некоторые трисахариды, причем общий выход дисахаридов увеличивался почти линейно с повышением начальной концентрации глюкозы до 90% [Синтез олигосахаридов, 1987].

Среди молочнокислых бактерий, используемых в производстве различных молочных продуктов, самые высокие активности β -галактозидазы была обнаружена у *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* [Сухих, 2007].

Однако, не смотря на то, что β -галактозидаза является эндоферментом в литературе встречаются данные о том, что в процессе метаболизма лактозы разными штаммами молочнокислых бактерий возможен выход глюкозы в окружающую среду [Cheirsilp et al., 2001; Дидух, Могиланская, 2008; Wulijideligen et al., 2013; Leite et al., 2013]. Так в работе [Молотов и др., 1994] описана схема

утилизации лактозы (рис. 1.1). Лактоза в клетку попадает у мезофильных стрептококков по фосфоенолпируватзависимой фосфотрансферной системе (ФТС), а у термофильных стрептококков с использованием специфического фермента пермеазы [Postma, Roseman, 1976]. Причем в клетках *S.thermophilus* используется только глюкозная часть лактозы, а галактоза секретируется в окружающую среду. Усвоение же галактозы начинается только при полном отсутствии лактозы в среде.

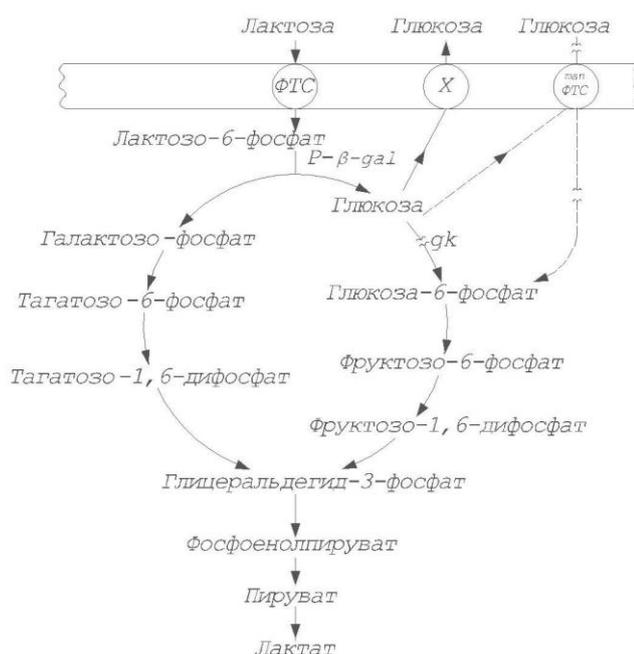


Рис. 1.1. Пути транспорта и утилизации лактозы и глюкозы в клетках лактококков [по Молотов и др., 1994]

ФТС – фосфоенолпируватзависимая фосфотрансферная система; man ФТС – маннозофосфотрансферная система транспорта; X – неизвестная система выхода для глюкозы и 2-дезоксид-D-глюкозы; gk- глюкокиназа; P-β-gal – фосфо-β-галактозидгалактогидролаза

Микробная система кефирных грибов обеспечивает в среде молочнокислое и спиртовое брожение. Активность протекания разных видов брожения зависит от концентрации клеток про- и эукариот. Возможные взаимоотношения прокариот и эукариот в кефирном грибе при утилизации лактозы описаны в работе Хамнаевой И.И. [Хамнаева, 2001] (рис. 1.2), которые предполагают после гидролиза и последующего фосфорилирования дисахарида (S_D) лактозы образование двух моносахаридов – фосфорилированного (S_{M-P}) и нативного (S_M)

Фосфорилированный моносахарид (S_{M-P}) обычным образом метаболизируется до конечного продукта (M). Нативный (S_M) же может использоваться прокариотической клеткой и выходить в среду культивирования через клеточные покровы (КП) по градиенту концентраций «клетка – среда». По мере истощения в среде дисахарида (S_D) нативный моносахарид (S_M) снова может использоваться клеткой. А если в среде будет присутствовать сообщество про- и эукариотических культур, то мономер (S_M) вместо реутилизации будет источником питания эукариотических культур.

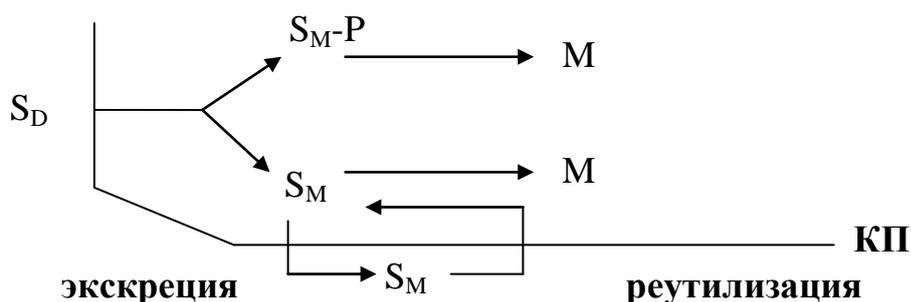


Рис. 1.2. Схема взаимосвязи клеток микробной системы кефирных грибков [по Хамнаевой, 2001]

где: S_D – димерный углевод; S_M – нативный мономер; S_{M-P} – фосфорилированный мономер; M – метаболит; КП – клеточные покровы

Увеличение содержания глюкозы и галактозы в среде до 16.17 г/л описано в работе [Wulijideligen et al., 2013] при культивировании молочнокислых бактерий *Leuconostoc mesenteroides* 6B2081 и *Lb.helveticus* на среде с лактозой. А при совместном культивировании дрожжи использовали глюкозу и галактозу, образуемую молочнокислыми бактериями.

В зависимости от вида возбудителя различают две формы молочнокислого брожения: гомоферментативное и гетероферментативное. К гомоферментативным молочнокислым бактериям относятся *Str.thermophilus*, *Lb.bulgaricus*, *L.lactis* и др. Около 90% конечных продуктов составляет молочная кислота и лишь небольшая часть уксусная кислота, этанол, диоксид углерода и ацетоин. К гетероферментативным молочнокислым бактериям относятся *Str.diacetylactis*, *Lb.brevis*, все виды рода *Leuconostoc* и др. В результате гетероферментативного

молочнокислого брожения образуются молочная, янтарная, уксусная кислоты, этиловый спирт, диоксид углерода, молекулярный водород, соотношение которых может меняться в зависимости от условий культивирования (рН, температура, аэрация и др.) [Шлегель, 1987].

Несмотря на интенсивные исследования в области экспериментального получения кефирных зерен из чистых и смешанных культур, обычно выделяемых из грибка, данные о положительных результатах отсутствуют. Что может быть результатом не достаточного изучения механизма формирования ассоциативной культуры кефирных зерен [Schoevers, Britz, 2003; Farnworth, 2006]. По мнению Королевой Н.С. любые попытки заменить кефирные зерна чистыми культурами микроорганизмов не будут эффективными, так как сложно дублировать симбиотические отношения, развивающиеся между бактериями и дрожжами. Поскольку исследователями не достигнуты успехи в получении кефирных зерен, то можно сделать вывод о том, что новые кефирные зерна могут быть получены только при размножении уже существующих [Farnworth, Mainville, 2008].

На основании анализа литературного обзора можно было бы предположить, что кефирные грибки представляют систему, характеризующуюся различным микробным составом, но выполняющую одинаковые функции. Однако, имеющиеся литературные данные, не дают основания для подтверждения этого положения. Так остаются нерешенные вопросы, касающиеся присутствия большого разнообразия молочнокислых бактерий в кефирных грибках и механизмов взаимодействия между ними, не определены микроорганизмы-продуценты данной системы, нет объяснения закономерностей описанного присутствия большого разнообразия дрожжей и др. Отсутствуют данные, позволяющие разработать концептуальную (функциональную) модель сложившегося консорциума кефирных грибков, которая включает необходимость изучения структуры микробной системы и потока веществ между ними [Свирижев, Логофет, 1978], и является основой для разработки способов

управления этой системой и создания экспериментально полученного стабильного консорциума.

1. 3. Кефиран – экзополисахарид кефирных грибков

Матрицей для удерживания микробных компонентов ассоциативной культуры кефирных грибков служит экзополисахарид кефиран, выполняющий структурирующую роль в кефирных грибках.

Полисахаридами называются высокомолекулярные соединения из класса углеводов, состоящие из остатков моносахаридов, связанных гликозидными связями. Молекулярные массы их значительно различаются, могут быть равными от нескольких тысяч до нескольких млн. Да и определены могут быть лишь приблизительно, так как полисахариды представляют из себя смеси компонентов, различающиеся степенью полимеризации [Шлегель, 1987].

Полисахариды могут быть классифицированы по строению составляющих их моносахаридов (гексозы, пентозы, аминсахара, и т.д [Шлегель, 1987]), могут содержать белковые или липидные компоненты, заместители неуглеводной природы [Кочетков и др., 1967]. Могут существовать как в виде линейных, так и разветвленных структур. Различают гомо- и гетерополисахариды.

Полисахариды выполняют ряд важных функций. Запасающую функцию в организме животных и человека выполняет гликоген, в растениях – крахмал. [Бартон, Оллис 1986; Кольман, Рем, 2000]. При недостатке питательных веществ полисахариды легко превращаются в моносахариды, которые служат источником энергии [Кочетков и др. 1967]. Структурную функцию в клетках животных и человека выполняют мукополисахариды, в растениях – целлюлоза. [Никитин и др. 1978]. Хитин является основным компонентом наружного скелета насекомых, панциря ракообразных и входит в состав клеточных стенок мицелия грибов [Кольман, Рем, 2000]. Для позвоночных животных скелетные функции выполняют хондроитинсульфаты, гиалуроновые кислоты, растворы которых являются смазкой и амортизатором в суставах конечностей [Бартон, Оллис, 1986; Кочетков и др. 1967]. К полисахаридам, выполняющим защитные функции,

относятся камеди и слизи в растениях и капсульные полисахариды микроорганизмов. [Советский энциклопедический словарь]. Фрагменты полисахаридов в смешанных углеводсодержащих биополимерах (гликопротеидах, липополисахаридах) обеспечивают специфические иммунные реакции организма [Шлегель, 1987].

Полисахариды микроорганизмов могут быть как интегральными составляющими клеточной стенки – эндополисахариды, так и находится снаружи клеточной стенки в виде капсул микроорганизмов или выделяться в культуральную жидкость – экзополисахариды (ЭПС) [Бартон, Оллис, 1986]. По физическим свойствам различают капсулы и слизи. Когда экзополисахарид относительно прочно связан с клеточной стенкой, говорят о капсулах, если же связь непрочная или ее вообще нет, говорят о слизи [Шлегель, 1987].

Роль экзополисахаридов для клеток микроорганизмов также очень разнообразна. Так, капсулы некоторых патогенных бактерий обеспечивают устойчивость к фагоцитозу, чем увеличивают их вирулентность. Выделение слизи некоторыми бактериями обеспечивает им возможность ограниченно перемещаться. Экзополисахариды могут быть также источником запасных питательных веществ, обеспечивать защиту от воздействий окружающей среды, защищают от высыхания в условиях с низкой влажностью. Адгезивные свойства ЭПС играют важную роль в образовании биопленок, выполняя роль обеспечения меж- и внутривидовых взаимодействий. Устойчивость бактериальных ценозов, заключенных в единую полисахаридную пленку, повышается в 10–100 раз по сравнению с отдельными «свободно плавающими» микроорганизмами [Шлегель, 1987; Ботина и др., 2010].

Многие микроорганизмы способны синтезировать полисахариды, аналогичные полисахаридам, выделенным из животных и растений. Так бактерии *p.Acetobacter* синтезируют целлюлозу, стрептококки групп А и С – гиалуроновую кислоту. В состав слизистого слоя многих бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* входят леваны – фруктаны [Кочетков и др. 1967; Петрушевский и др. 1989]. С

другой стороны, многие ЭПС способны продуцировать только микроорганизмы. Так, в продуктах гидролиза ЭПС метанонокисляющих бактерий были обнаружены D-аллоза и 2-O-метил-D-манноза, которые не встречались в других природных источниках [Дерябин и др. 1986].

Известно два механизма синтеза ЭПС микроорганизмами: внеклеточный синтез и синтез по механизму образования пептидогликана и липополисахаридов. Для внеклеточного синтеза требуется в качестве субстрата сахароза. Так синтезируются немногие гомополисахариды (леваны, декстраны) [Sandford, Baird, 1983]. Все другие ЭПС синтезируются по механизму образования пептидогликана и липополисахаридов [Cooper, Zajic, 1980; Day-Donal, Marceau-Day, 1982; Sandford, Baird, 1983]. При таком механизме синтеза состав ЭПС не зависит от используемого субстрата [Шлегель, 1987]. На первой стадии образуются общие промежуточные соединения. Активирование мономерных единиц происходит при помощи нуклеозидтрифосфатов (у молочнокислых бактерий уридиндифосфат и тимидинтрифосфат) с образованием нуклеозиддифосфатсахаров (уридинтрифосфат-сахара), которые присоединяются к липиду-переносчику (ундекапренилдифосфату). Там комбинируются, образуются структурные компоненты будущего полисахарида (гомо- или гетерополисахариды), которые выводятся из протопласта в наружные слои клеточной стенки, где связываются в макромолекулярный экзополисахарид. Изопреноидный липид-пирофосфат после отщепления пирофосфата снова используется в синтезе. Если в клетке мало ундекапрениллактана – это может стать лимитирующим фактором биосинтеза ЭПС [Ботина и др., 2010].

От условий культивирования бактерий зависит возможность биосинтеза и количественный выход ЭПС, но не зависит моносахаридный состав [Ботвинко, 1984].

Большинство микробных ЭПС синтезируются параллельно росту бактерий и во многих случаях их количество не увеличивается после завершения роста продуцента. Однако, в ряде случаев после максимального накоплением ЭПС наблюдается снижение их количества, что скорее всего связано с

высвобождением гликолитических ферментов при автолизе клеток либо с потреблением ЭПС микроорганизмами. В некоторых случаях накопление ЭПС в среде продолжается и в период автолиза клеток, что вероятнее всего связано с продолжением синтеза ЭПС жизнеспособными клетками или высвобождением клеточных полимеров [Ботвинко, 1984].

Микробные полисахариды находят широкое применение в самых различных сферах человеческой деятельности: медицине, ветеринарии, фармацевтической, пищевой, химической промышленности, в сельском хозяйстве, при добыче нефти и газа, в процессах очистки, концентрирования и разделения металлов, поскольку обладают широким спектром физико-химических, функционально-технологических и биологических свойств [Harran et al., 2006].

Для последних лет характерен повышенный интерес исследователей к природным (натуральным) биоагустителям, полисахаридам, продуцируемым молочнокислыми бактериями, которые являются безопасными по классификации GRAS (General Recognized As Safe) [Ганина, Рожкова, 2005]. Полисахариды молочнокислых бактерий на протяжении многих столетий используются в питании человека, поскольку принимают участие в формировании качества молочнокислых продуктов таких, как кефир, йогурт, сыр, кумыс и др., обеспечивая их консистенцию, реологические, водосвязывающие свойства, продолжительность хранения и др. Это определяет перспективу широкого использования полисахаридов молочнокислых бактерий в пищевой промышленности для удовлетворения растущего в мире спроса на лечебные, натуральные продукты питания [Ботина и др., 2010 №1].

Одним из таких ценных полисахаридов молочнокислых бактерий является *полисахарид кефиран*, продуцируемый кефирными грибами, служит матрицей для удерживания, иммобилизации клеток микробных компонентов кефирных грибов.

На основании исследования химического состава сухих кефирных грибков установлено, что в них преобладают углеводы (около 50%), большую часть которых составляет глюкогалактан (кефиран) (34%) Он представляет собой волокнистый продукт белого цвета без вкуса и запаха, растворимый в воде и водных растворах хлористого натрия. Растворимость кефирана в воде увеличивается с повышением температуры в пределах 60–100°C [Фильчакова, 1999].

Кефиран имеет разветвленное строение (рис. 1.3) и состоит из примерно равных остатков D-глюкозы и D-галактозы [La Riviere et al., 1967; Medrano et al., 2008]. По различным источникам кефиран может содержать глюкозу и галактозу в молярном отношении 1.0 : 1.0 [La Riviere et al., 1967], 1.00 : 1.05 [Maeda et al., 2004], 0.9 : 1.1 [Micheli et al., 1999], 1.0: 0.94 [Frengova et al., 2002], 1.0 : 0.7 [Zajsek et al., 2011]; 1.0 : 1.1 [Ghasemlou et al., 2012]. Причем это соотношение может варьироваться в зависимости от условий культивирования и географического происхождения кефирных грибков [Zajsek et al., 2013].

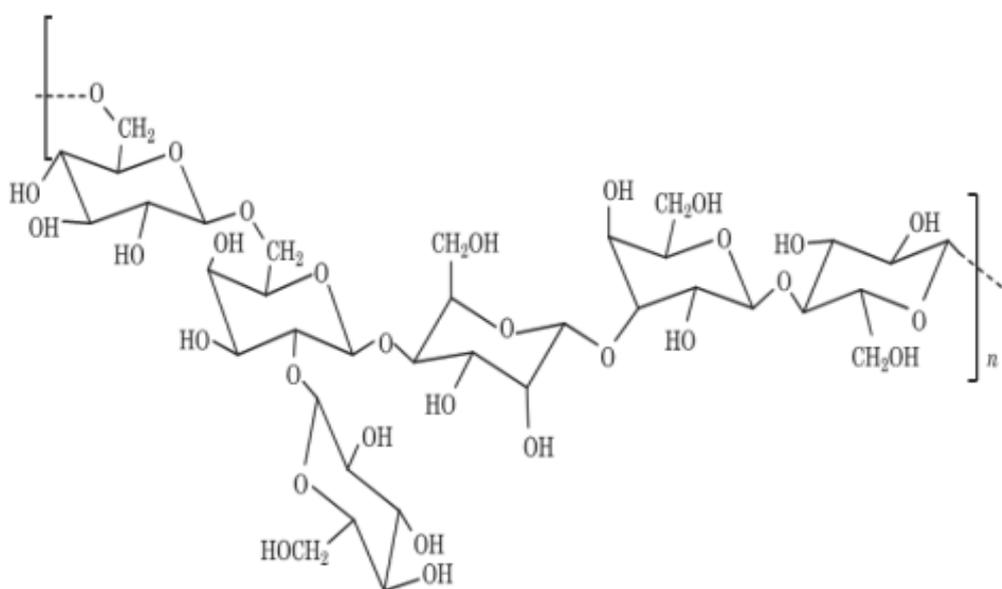


Рис.1.3. Структурная формула кефирана

Молекулярная масса кефирана, выделенного из кефирных грибков, по разным источникам составляет $1.35 \cdot 10^6$ Да [Ghasemlou et al., 2012], 10^7 Да [Piermaria et al., 2008].

Средняя молекулярная масса кефирана, синтезированного *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2В^T, по результатам гель-фильтрации равна $7.6 \cdot 10^5$ г/моль со средним радиусом молекулы 39.9 нм [Maeda et al., 2004]. А молекулярная масса кефирана, синтезированного другим штаммом *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 $5.5 \cdot 10^4$ Да [Ahmed et al., 2013].

Температура плавления полисахарида, синтезированного культурой *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3, равна 93.38°C, температура разложения – 299.62°C. Он хорошо растворяется в воде, обладает хорошей влагодудерживающей способностью, маслосоемкостью, обладает лучшими эмульгирующими свойствами по сравнению с такими коммерчески доступными коллоидными растворами, как ксантановые, гуаровые и камеди бобов рожкового дерева, что определяет перспективность его использования в пищевой промышленности как текстурирующего и гелеобразующего компонента [Wang et al., 2008; Ahmed et al., 2013].

Кефиран в концентрациях 5.9–14.3 г/л способен образовывать криогели, способные плавиться при 37°C, что может найти применение при разработке пищевых продуктов [Piermaria et al., 2008]. Причем при добавлении сахарозы или фруктозы в разных концентрациях к растворам кефирана можно изменять вязкость полученных гелей [Zavala et al., 2014].

Микроорганизмы продуценты. Считается, что единственным источником получения кефирана являются кефирные зерна, но, тем не менее, не установлено имеет ли данный полисахарид изомеры. До сих пор остается не ясным спектр бактерий способных синтезировать кефиран или подобные ему полисахариды.

При изучении способности молочнокислых бактерий, выделенных из кефирных зерен, к синтезу полисахаридов было показано, что различные культуры способны продуцировать полисахариды. Так разными авторами описаны разные бактерии, ответственные за синтез кефирана в кефирных зернах. В более ранних работах считалось, что основная культура синтезирующая кефиран – это *Lactobacillus brevis* [La Riviere et al., 1967]. В 1983 Кандлер и Кунат

идентифицировали *Lactobacillus kefir* как бактерию ответственную за синтез кефирана [Kandler, Kunath, 1983]. Также были описаны такие молочнокислые бактерии, способные синтезировать кефиран, как *Lactobacillus sp.* КРВ-167В [Yokoi, Watanabe, 1992], *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus parakefir* [Takizawa et al., 1994], *Lactobacillus kefiranofaciens* [Rogosa et al., 1951; Toba et al., 1986], *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* [Ларина, 2000]. В настоящее время в большинстве работ *Lactobacillus kefiranofaciens* описывается как основной продуцент кефирана в кефирных грибках [Еникеев, 2011].

В зависимости от штамма-продуцента полисахаридов отмечено различие состава: варьирование соотношения глюкозы и галактозы в полисахариде, а также возможное включение и других сахаров. Так, было показано, что полисахариды, продуцируемые *S.thermophilus* и *Lactobacillus plantarum*, содержат в своем составе маннозу [Frengova et al., 2002; Wang et al., 2010]. Молочнокислые бактерии *L. helveticus* синтезировали ЭПС с соотношением глюкоза:галактоза 2:1 [Frengova et al., 2002]. Культура *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12 синтезировали ЭПС, состоящие из фруктозы и рамнозы [Pan, Mei, 2010]. При использовании штамма бактерий *Lactobacillus hilgardii* LCC12, продуцируемые полисахариды, по мнению авторов, относились к декстранам, но, к сожалению, соответствующие исследования, подтверждающие это предположение, не были проведены [Pidoux et al., 1990]. Синтезируемые некоторыми штаммы болгарской палочки ЭПС содержали 10–19% арабинозы, 4–27% маннозы, 9–15% глюкозы, 34–36% галактозы [Артюхова, Гаврилова, 2010].

Однако по данным многих авторов полисахарид кефирных грибков содержит в своем составе только глюкозу и галактозу [Zajsek et al., 2013].

Кефиран характеризуется высокой биологической активностью. Показано его антимикробное, противоопухолевое, иммуномодулирующее, противовоспалительное, ранозаживляющее действие, противоастматическое, его влияние на повышение устойчивости молочнокислых бактерий к антибиотикам и их способности к адгезии и заселению кишечника [Murofushi et al., 1986; Medrano

et al., 2011; K.L. Rodrigues et al., 2005; Rodrigues, Caputo et al., 2005; Laws, Marshall, 2011; Chen Y.P. et al., 2012].

Кефиран по данным ряда исследователей в определенных дозах повышает ферментативную активность желудочно-кишечного тракта человека, повышает физиологическую активность организма, укрепляет иммунную систему, и следовательно, может быть использован для получения лечебно-профилактических продуктов [Фильчакова, 1999].

Кефиран:

- приводил к снижению кровяного давления и снижению уровня холестерина (при приеме кефирана в количестве 100 и 300 мг/кг веса) у крыс, питающихся продуктами с высоким содержанием жиров, что приводит к гиперлипемии и предрасположенности к развитию инсульта [Maeda et al., 2004; 2004(2)];

- обладал противоастматическим действием, что было показано на мышах, у которых искусственно вызывали легочное воспаление. У мышей, которым вводили кефиран (50 мг/кг массы тела), значительно снижалось количество воспалительных клеток в легочной ткани, нормализовалось содержание интерлейкинов и уменьшалось количество вырабатываемой слизи [Kwon et al., 2008];

- оказывал антагонистическое влияние по отношению к внеклеточным факторам, продуцируемым *Bacillus cereus*, вызывающей пищевые токсикоинфекции у человека [Medrano et al., 2008; 2009];

- обладал иммуностимулирующим действием, усиливал защитные свойства слизистых оболочек кишечника [Medrano et al., 2011; Vinderola et al., 2006];

- обладал противомикробной активностью в отношении энтеропатогенных бактерий: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* [Maeda et al., 2005].

Свойства кефирана определяют перспективу его использования в фармацевтической, пищевой, косметической промышленности [Еникеев, 2011].

В настоящее время в медицине применяется пробиотик «Аципол», содержащий в своем составе наряду с лиофилизированной культурой молочнокислых бактерий *L.acidophilus* и полисахарид кефиран в виде инактивированных прогреванием кефирных грибков. Препарат является эффективным в комплексной терапии для лечения дисбактериозов [Новокшенов и др., 2007].

В ряде работ рассматривается возможность использования кефирана в качестве основного компонента при производстве биodeградируемых упаковочных пленок для увеличения срока годности пищевых продуктов [Piermaria et al., 2009; Motedayen et al., 2013; Ghasemlou et al., 2011]. Это представляет большой интерес поскольку, в настоящее время, большая часть материалов, используемых в промышленности для производства упаковок, производится из неразлагаемых материалов, оказывающих негативное воздействие на окружающую среду [Moore et al., 2001; Tanabe et al., 2004]. В связи с возросшим производством пластиковых упаковок [Потапов, Пармон, 2010], способствующих загрязнению окружающей среды, все больше исследований направлено на поиск альтернативы синтетических пластмасс. Растет интерес к биodeградируемым материалам, таким как биоразлагаемые пленки, в качестве замены пищевой упаковки, безопасные для природы и человека [Прудникова и др., 2012].

В качестве пластификатора для получения пленок на основе кефирана чаще всего используется глицерин [Piermaria et al., 2009; 2011; Ghasemlou et al., 2011], но также есть работы по получению пленок с добавлением в качестве пластификаторов кукурузного крахмала [Motedayen et al., 2013], сахаров (глюкозы, галактозы, сахарозы), сорбитола [Piermaria et al., 2011]. Показано, что пленки, полученные на основе кефирана при добавлении в него глицерина (25 г глицерина на 100 г кефирана) обладают высокой пластичностью, соизмеримой с синтетическими материалами, высокой прочностью и являлись хорошим барьером для влаги [Piermaria et al., 2009]. Описано получение нанокомпозитных пленок с добавлением изолятов сывороточных белков и монтмориллонита [Zolfi et

al., 2014]; получение нановолокон на основе кефирана методом электроформования [Esnaashari et al., 2014].

В литературе рассматриваются два *возможных способа получения экзополисахарида – кефирана*: на основе использования кефирных грибков и чистых культур молочнокислых бактерий.

Из кефирных грибков чаще всего кефиран выделяли водной экстракцией в кипящей воде с соотношением КГ : вода 1:10 – 1:100 в течение получаса и более, затем из надосадочной жидкости после отделения клеток и нерастворенного осадка кефиран осаждали этанолом или ацетоном и повторяли процедуру переосаждения несколько раз [Micheli et al., 1999; Piermaria et al., 2008; Medrano et al., 2008; 2011; Kwon et al., 2008]. Причем отмечено, что гомогенизация кефирных грибков перед водной экстракцией не только не увеличивает выход кефирана, а даже уменьшает, а также снижается вязкость получаемого водного раствора полисахарида, что, предполагается, связано с уменьшением молекулярной массы выделяемого полисахарида [Micheli et al., 1999].

Еникеевым Р.Р. с соавторами был разработан способ выделения кефирана при использовании протеолитических ферментов для расщепления белковых компонентов после стадии экстракции в кипящей воде, после чего кефиран осаждался этанолом и отделялся фильтрованием через мелкопористый фильтр без центрифугирования. Для очистки полученного полисахарида осадок несколько раз промывался водой и фильтровался. Это позволяло сократить затраты этанола на осаждение полисахаридов и уменьшить время экстракции [Пат. 2450021 РФ].

Первой технологической стадией получения ЭПС из кефирных грибков является стадия культивирования кефирных грибков. Продукция полисахарида кефирными зернами в значительной степени зависит от температуры ферментации, перемешивания, источника углерода, азота, добавления солей. Так, в работе [Zajsek et al., 2013] при исследовании влияния этих факторов максимальная продукция кефирана и наибольший прирост массы кефирных грибков были получены при температуре 25°C, перемешивании 80 об/мин при

культивировании на молоке с добавлением лактозы, тиамин и FeCl_3 . Чуть меньший выход ЭПС был получен при добавлении лактозы и сахарозы одновременно. При использовании же синтетической среды с глюкозой, фруктозой, сахарозой, мальтозой для культивирования кефирных грибов максимальный рост кефирных грибов наблюдался при культивировании на среде с фруктозой как единственного источника углерода, чуть меньше на среде с сахарозой. Большая продуктивность по биомассе кефирных грибов была получена на среде с глюкозой и сахарозой в соотношении 1:3 [Harta et al., 2004].

Различия между полученными результатами по мнению авторов могут быть связаны с микробиологическим составом, источником происхождения кефирных зерен, химическим составом сред культивирования, различий в составе молока и др. Также были получены небольшие различия в соотношении глюкозы и галактозы в составе кефирана кефирных грибов в зависимости от условий культивирования: температуры, перемешивания, добавления различных источников углерода, азота [Zajsek et al., 2011; 2013].

При увеличении температуры культивирования до 40–43°C количество ЭПС в культуральной жидкости увеличивалось, но одновременно уменьшался прирост массы кефирных грибов [Еникеев и др., 2010; Rimada, Abraham, 2001]. То есть вероятнее всего, при такой температуре происходит частичное растворение полисахаридной оболочки кефирных зерен.

При исследовании возможности использования более дешевого сырья для производства кефирана кефирными зернами культивирование вели на подсырной сыворотке, содержащей 67 г/л лактозы, 13 г/л дрожжевого экстракта, при pH 5.7 и температуре 24°C [Ghasemlou et al., 2012].

Еникеевым Р.Р. предлагается технология производства кефирана из кефирных грибов, культивируемых на сконцентрированной молочной сыворотке до содержания СВ 15–18% и с добавлением 1% CaCl_2 при pH 4–5 и температуре 30°C в течение 60–80 часов или до остаточного содержания углеводов <5% от начального. После отделения кефирных зерен и после отделения белков из сыворотки осаждали кефиран [Еникеев, 2011 автореф].

Однако лимитирующим фактором использования кефирных грибков для получения полисахаридов в промышленных условиях является низкая продуктивность процесса культивирования кефирных грибков [Abraham, de Antoni, 1999; Garrote et al., 2001; Rimada, Abrham, 2001; Schoevers, Britz, 2003], либо технологические трудности использования излишек кефирных грибков при производстве кефира, что возможно осуществлять только при близости расположения молочного завода.

При использовании избыточного количества кефирных грибков в производственных процессах их прирост составляет 10% в неделю, что не может обеспечить производительность промышленного производства кефирана.

Другим направлением технологии получения кефирана является его выделение из культуральной жидкости при культивировании чистых культур молочнокислых бактерий.

Однако анализ литературы показывает различные данные при изучении динамики накопления ЭПС при культивировании молочнокислых бактерий. Некоторые авторы полагают, что максимальный синтез полисахарида приходится на момент начала стационарной фазы [Degeest et al., 2001]. Другими исследователями получены результаты, свидетельствующие, что ЭПС синтезируются во время логарифмической фазы роста культуры [Gancel, Novel, 1994]. Некоторыми авторами показано, что кефиран синтезируется по мере роста культуры [Yokoi, Watanabe, 1992; Frengova et al., 2002]. В некоторых же работах отмечается, что при продолжительном культивировании штаммов молочнокислых бактерий возможно снижение активного синтеза или разрушение ЭПС [Degeest et al., 2001]. Имеются данные о синтезе ЭПС клетками молочнокислых бактерий в условиях неблагоприятных для их роста, в условиях подавления синтеза новой клеточной стенки, например, при культивировании при субоптимальных температурах. При стимулировании же роста и деления клетки синтез ЭПС уменьшается [Артюхова, Моторная, 2015; Stingele et al., 1999; Dabour, LaPointe, 2005]. Другие авторы утверждают, что кефиран синтезируется в условиях

благоприятных для роста клеток. Так для исследования возможности синтеза кефирана культурой *Lactobacillus sp.* КРВ-167В в среде с отсутствием источников азота в безазотную среду засеивали предварительно наработанный на богатой среде инокулят *Lactobacillus sp.* КРВ-167В. При этом было показано, что практически вся лактоза была использована для образования молочной кислоты, рост клеток не наблюдался и практически не синтезировался ЭПС (0.08 г/л) [Yokoi, Watanabe, 1992].

На возможность биосинтеза ЭПС и их количественный выход особое влияние оказывают индивидуальные особенности штамма, природа и концентрация источника углерода и азота, pH питательной среды, а также температура, время культивирования, стадия развития культуры [Ботвинко, 1984; Degeest et al., 2002]. А также имеются данные, показывающие, что в зависимости от условий культивирования может меняться строение и состав синтезированных ЭПС. Так бактерии *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 при pH 5.5 синтезировали экзополисахариды с более высокой молекулярной массой и более компактной структурой, чем при pH 6.5 [Ayala-Hernandez et al., 2008]. Молочнокислые бактерии *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM6985 при использовании лактозы и мальтозы в качестве источников углерода синтезировали ЭПС с молекулярной массой $2.4 \cdot 10^5$ и $1.5 \cdot 10^5$ Да и соотношением глюкозы : галактозы в составе ЭПС равным 1 : 4 и 1 : 10, соответственно [Wang, Bi, 2008]. В то же время в работе [Maeda et al., 2004] было показано, что культура *Lactobacillus kefiranofaciens* на разных средах: с рисовым гидролизатом и на среде с глюкозой и пептоном, – синтезировала практически идентичные по структуре полисахариды.

Способность продуцировать ЭПС мезофильными молочнокислыми бактериями непостоянна и может быть снижена или вообще утрачена из-за многократных пересевов, продолжительных периодов хранения, сублимационной сушки и изменений оптимальной температуры культивирования. Некоторыми авторами высказано предположение, что возможно это связано с плазмидной природой генов, отвечающих за продукцию ЭПС, в отличие от термофильных

молочнокислых бактерий, у которых эти гены предположительно закодированы хромосомно. Однако, для утверждения этого не достаточно данных, так как штаммы молочнокислых бактерий разных видов, обладающие различными свойствами и способные к синтезу ЭПС, отличаются составом и размером обнаруженных плазмид [Ганина и др., 2005; Абрамова, 2013].

Отмечено стимулирующее действие солей Mn^{2+} и Mg^{2+} на рост лактобацилл и синтез ими полисахаридов. Например, ионы Mg^{2+} влияют на активность фермента фосфоглюкомутазы, который участвует в биосинтезе ЭПС, катализирует перенос фосфатной группы между углеродами C_1 и C_6 в глюкозе. Добавление некоторого количества минеральных солей в среду при культивировании *Lactobacillus ramosus* положительно влияло на биосинтез ЭПС, однако не оказывало никакого влияния на биосинтез ЭПС при культивировании *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [Macedo et al., 2002].

В ряде работ отмечена большая скорость роста и большая продукция полисахарида смеси культур *Lactobacillus kefiranofaciens* и *Saccharomyces cerevisiae* по сравнению с чистой культурой *Lactobacillus kefiranofaciens*. [Cheirsilp et al., 2003, 2003; 2007, 2011; Tada et al., 2007]. Усиление синтеза экзополисахаридов при совместном культивировании с дрожжами и другими молочнокислыми бактериями также было отмечено в работе [Frengova et al., 2002]. При культивировании штамма *L.bulgaricus* HP1 совместно с другими молочнокислыми бактериями и дрожжами, входящими в состав кефирной закваски, значительно повышался синтез экзополисахаридов, что позволяет делать вывод о стимулирующем влиянии дрожжей на синтез полисахаридов молочнокислыми бактериями. В работе [Cheirsilp, Radchabut, 2011] было подобрано оптимальное соотношение *Lb. kefiranofaciens* и *S. cerevisiae* – $2.1 \cdot 10^7$ и $4.0 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, соответственно.

В литературе описаны в основном способы культивирования чистых культур молочнокислых бактерий при использовании коллекционных штаммов бактерий (табл. 1.5).

**Влияние условий культивирования молочнокислых бактерий на синтез
экзополисахаридов**

работа	Продуцент ЭПС	Среда культ-я	Усл-я культ-я	Конц. ЭПС, г/л
Yokoi, Watanabe, 1992	<i>Lactobacillus sp.</i> КРВ-167В	MRSЛ среда с 10% лактозы, 5 ммоль CaCl ₂ и двойным содержанием источников азота	30°C, pH 5.0, 4 сут.	2.04
		молочная сыворотка с доб. 5% лактозы и источников азота (казаминовая к-та, L-цистеин)	30°C, pH 5.0, 5 сут.	0.6
Micheli et al., 1999	<i>Lactobacillus sp.</i> LM-17	MRSЛ среда с 10% лактозы, 5 ммоль CaCl ₂ и двойным содержанием источников азота	28°C, 10 дн., анаэробные условия (в атмосфере CO ₂)	2.0
Macedo et al., 2002	<i>Lactobacillus ramnosus</i>	Среда с доб. солей Mn ²⁺ и Mg ²⁺ и витаминов	24 ч	~2.77
Frengova et al., 2002	<i>Lb. delbrueckii bulgaricus</i> HP1	Молоко + 0.45% сахарозы	28 ч, 22°C, до pH 4.7	0.47
	<i>Lb. delbrueckii bulgaricus</i> HP1 + <i>S. thermophilus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>S. cerevisiae</i>		22 ч, 22°C,	0.82
Senini et al., 2004	Разные штаммы <i>S. thermophilus</i>	Среда M17 с лактозой	42°C	0.016–0.57
		Среда M17 с глюкозой		0.024–0.662
Maeda et al., 2004,	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> WT-2B ^T	10% гидролизата рисового крахмала + 0.35% гидролизата белков риса	33°C, pH 5.0, 7 сут.	2.5
Yeesang et al., 2008	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> JCM6985	MRS с 4% сагового крахмала (обработ. фермент. 100 ед/г (α-амилаза и глюкоамилаза	30°C, нач. pH 5.5, анаэробные условия, 72–120 ч	0.85

		60:40))		
Wang, Bi, 2008	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> JCM6985	MRSЛ среда с 100 г/л мальтозы, 80 г/л дрожжевого экстракта	25°C, 96 ч, нач. рН 5.5	0.45
			Поддержание рН за счет доб. CaCO ₃ 10 г/л	3.2
Ботина и др, 2010	<i>S.thermophilus</i> BC320 BC321 BC 315 BC 223 BC 227 BC 241 BC 223	M21	48 ч, 42°C 72 ч, 42°C 72 ч, 42°C 72 ч, 42°C 72 ч, 50°C 72 ч, 42°C 72 ч, 42°C	5.86 6.13 4.33 3.21 3.31 2.61 2.40
Pan, Mei, 2010	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> 12	MRS	35°C, рН 6.0, 3% инокулята, 24ч	0.95
Xu et al., 2010	<i>Lactobacillus paracasei</i> НСТ	СDM с 10% глюкозы; C/N 1/9 или 1/12	27°C, рН 5.9, 60 ч	0.039
Wang et al., 2010	<i>Lactobacillus plantarum</i> KF5	Среда на основе молочной сыворотки	рН 6.3, 30 ч, 3% инокулята	0.096
Cheirsilp, Radchabut, 2011	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> JCM6985 + <i>S.cerevisiae</i>	MRS с доб. 4% лактозы сыворотки, 4% дрожжевого экстракта	Нач. рН 5.5 микроаэрофильные условия анаэробных периодическое культ-е при поддерж. конц. O ₂ 5%, рН 5.5 с подпитками	0.938 0.807 2.58 3.25
Абрамова, 2013	Разные штаммы <i>Str. thermophilus</i>	молоко	42°C	>0.05 -0.15
	Разные штаммы <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>			0.03– 0.068

Данные приведенные в таблице показывают, что разные молочнокислые бактерии способны синтезировать экзополисахариды в разных концентрациях от 0.03 до ~6 г/л. В основном для синтеза ЭПС использовались довольно дорогие

питательные среды (MRS в различных модификациях). Во многих случаях увеличивали количество вносимых источников углерода, а в некоторых случаях увеличивали и содержание источников азота, но с повышением количества углерода, так чтобы все же увеличить соотношение C:N. В качестве источников углерода использовали лактозу, глюкозу, мальтозу, лактозу из сыворотки, молоко с дополнительным внесением сахарозы.

Еще одним направлением способов получения кефирана является обогащение молочнокислых продуктов полисахаридами за счет включения в состав заквасок штаммов, обладающих большей активностью синтеза полисахаридов [Ганина и др., №11, 2005; Рожкова, 2006; Ботина и др., №1, 2010; Абрамова, 2013] или непосредственного добавления в продукт полисахаридов, выделенных из кефирных грибков при их нагревании [Еникеев и др., 2010; Piermaria et al., 2008].

Увеличенное количество кефирана достигалось применением оптимальных условий культивирования кефирных грибков при приготовлении закваски на молочной сыворотке [Еникеев, 2011 (2)].

Получение кефирана в настоящее время, практически, не реализовано, что сдерживается низкой достигаемой продуктивностью процесса по сравнению с технологиями получения других полисахаридов. Разработка эффективных способов получения полисахаридов, продуцируемых молочнокислыми бактериями, является одной из актуальных, практически значимых проблем биотехнологии.

Однако анализ литературы показывает, что, несмотря на большой интерес исследователей к изучению закономерностей синтеза кефирана, остается невыясненным ряд положений. Есть сведения о получении экзополисахаридов из кефирных грибков путем их расплавления в кипящей воде и при культивировании коллекционных штаммов молочнокислых бактерий, но недостаточно данных о микробном профиле экзополисахаридсинтезирующих микроорганизмов компонентов кефирного грибка. Не понятно, какие бактерии ответственны за

синтез ЭПС кефирана в кефирных грибках. Не ясна динамика накопления ЭПС при культивировании молочнокислых бактерий.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основными *объектами исследований* являлись:

- кефирные грибки, применяемые при производстве кефира на молочных предприятиях г. Ставрополя (КГС), г. Гагарина (КГГ) и лиофилизированные кефирные грибки, используемые на предприятиях г. Москвы (КГМ) и г. Владикавказа (КГВ);

- культуры бактерий, выделенные в процессе работы из кефирных грибков;

- молочнокислые бактерии *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, полученные из Института Микробиологии и эпидемиологии им. Г.Н. Габричевского, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* 4079 (ВКПМ).

Кефирные грибки культивировали в колбах на 100 мл с объемом среды 50 и 100 мл в микроаэрофильных условиях на нативном молоке Parmalat 0.5% жир. (lac+), на молоке со сниженным содержанием лактозы (обработанном ферментным препаратом галактозим, lac±) и на молоке, не содержащем лактозы, Valio Zero Lactose, 1.5% жир. (lac-). Используемые образцы молока содержали практически одинаковое суммарное количество углеводов. Для культивирования грибков также использовали молочную творожную сыворотку (МС), с содержанием лактозы 4%, полученную в лабораторных условиях. Для сравнительных исследований количество засеваемых кефирных грибков выравнивалось по объему их массы, что определялось по объему вытесняемой жидкости при их погружении в стерильную воду.

Для **гидролиза лактозы молока** использовали ферментный препарат галактозим, предоставленный НТЦ «Легбиотех». β-галактозидазная активность препарата определялась по ортонитрофенилу β-D-галактопиранозидазе (НФГ) и лактозе на уровне 9640 ед/г. В эксперименте использовали фермент в дозе 4000 ед/100мл молока.

Содержание общего азота в грибках, как косвенного показателя соотношения в них микроорганизмов и полисахаридов, определяли по методу Кьельдаля.

Микробный состав кефирных зерен определяли методом, основанным на растирании кефирных грибков [Garrote et al., 2001]. Кефирные зерна в стерильных условиях измельчали лезвием, растирали в ступке до однородной массы, суспендировали в 1% растворе триптона. Высев проводили на традиционно используемые твердые среды: дрожжевая среда, г/л: глюкоза (лактоза) – 30, дрожжевой экстракт – 10, CaCO₃ – 20, агар – 15; среда Сабуро (глюкозо-пептонная), г/л: глюкоза – 40, пептон – 10, дрожжевой автолизат – 30, агар – 15; среда MRS, г/л: гидролизат казеина – 10, мясной экстракт – 10, дрожжевой экстракт – 5, глюкоза – 20, ацетат натрия – 5, цитрат аммония (двузамещенный) – 2, твин 80 – 1, K₂HPO₄ – 2, MgSO₄ · 7H₂O – 0.2, MnSO₄ · 4H₂O – 0.05, агар – 15. Посевы инкубировали при комнатной температуре (22–25°C).

Чистые культуры дрожжей компонентов кефирных грибков выделяли на твердой среде Сабуро из колоний близ бумажного диска, пропитанного раствором ампициллина на чашках Петри.

Соотношение живых и мертвых клеток дрожжей и бактерий определяли методом Life/Dead на базе института ИНМИ им. С.Н. Виноградского РАН. Микроорганизмы, компоненты кефирных грибков, окрашивали флуоресцентным красителем Life/Dead (Bac Light™ Bacterial Viability Kit) и просматривали в люминесцентном микроскопе Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия).

Электронно-микроскопические исследования проводили на базе ИБФМ им. Г.К.Скрябина и на базе МГУ им. М.В. Ломоносова. Для подготовки образцов для сканирующей электронной микроскопии (на базе ИБФМ им. Г.К.Скрябина) образцы после обезвоживания в серии спиртов монтировали на объектодержатель, на который предварительно наносили токопроводящий скотч и напыляли платино-углеродной смесью в вакуумной установке JEE-4X (Япония, JEOL). Образцы просматривали в сканирующем электронном микроскопе JSM 6510LV (Япония, JEOL).

Для приготовления ультратонких срезов кефирные зерна фиксировали в 1.5%-ом растворе глутарового альдегида в 0.05М какодилатном буфере (pH 7.2) при 4°C в течение 1 часа; трижды отмывали в том же буфере и дополнительно фиксировали в 1%-ом растворе OsO₄ в 0.05М какодилатном буфере (pH 7.2) в течение 3 часов при 20°C. После обезвоживания в серии спиртов материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Ультратонкие срезы монтировали на опорные сеточки, контрастировали в течение 30 мин в 3% растворе уранилацетата в 70% спирте и дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу [Reynolds, 1963]. Ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кв.

Идентификацию выделенных изолятов до вида проводили совместно с ФГУП ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов с помощью анализа генов, кодирующих 16S рРНК, стандартными методами с учетом культурально-морфологических свойств. Работа выполнена с использованием уникальной научной установки – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, при идентификации молочнокислых бактерий. Для наработки анализируемых последовательностей использовали следующие консервативные праймеры: 8f – agagtttgatcctggctcag; 926r – ccgtcaattcctttagttt; 1492r – ggttacccttggtacgactt [Eden et al, 1991]. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе AE3000. Для анализа сиквенсов использовали специализированные филогенетические компьютерные программы, находящиеся на сайте RDB II (Ribosomal Database Project II), предназначенные для определения родства микроорганизмов и построения филогенетических деревьев. Стабильность воспроизведения результатов определялась трехкратной повторностью ПЦР-реакций. Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считалась гомология не менее 97%, при длине сиквенса не менее 500 п.н. [Eden et al., 1991].

Для сравнения микробного профиля кефирных грибков использовали *метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE)*.

Исследования проводили на базе МГУ им. М.В. Ломоносова, института микробиологии им. В.Н. Виноградского, Южно-Китайского Университета (Шанхай).

Выделение ДНК из кефирных грибков и их культуральной жидкости проводили модифицированным хлороформ-фенольным методом. Для изоляции ДНК из грибка его сначала гомогенизировали с помощью стеклянных бус на приборе "Mini beadbeater-8" (Biospec Products, Bartlesville, USA).

Для проведения ПЦР для исследования бактериального профиля использовали следующие праймеры: **Bact907R** – ccg tca att cmt ttg agt tt; **Univ515F** – gtg bca gcm gcc gcg gta a; **Univ518FGC** – cgc ccg ccg cgc ccc gcg ccc gtc ccg ccg ccc ccg ccc ggt gbc agc mgc cgc ggt aa.

Для исследования дрожжевого профиля использовали праймеры: **LS2** – att ccc aaa caa ctc gac tc; **NL1GC** – gcg ggc cgc gcg acc gcc ggg acg cgc gag ccg gcg gcg ggc cat atc aat aag cgg agg aaa ag [Jianzhong et al., 2009].

Электрофорез проводили в системе the DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad), заполненной 0.5x TAE буфером (60 °C), блок питания включали на 16 часов, 100 V. Для окрашивания геля использовали раствор **SYBR Green I**. После окрашивания гель промывали H₂O superQ и просматривали в УФ.

Функциональные свойства кефирных грибков определяли по активности воздействия их культур, полученных после культивирования кефирных грибков на молоке и последующего их отделения (в производстве называемых заквасками), на молоко. «Закваску» использовали в качестве посевного материала из расчета 1 мл на 10 мл молока. Функциональную активность выделенных изолятов оценивалась при инокулировании петлей с твердой среды в пробирки с 10 мл молока. Культивировали при комнатной температуре (20–25°C). В качестве критериев оценки функциональной активности кефирных грибков и культур микроорганизмов, выделенных из них, использовали стандартные показатели, применяемые в молочной промышленности: образование сгустка и его характер, изменение pH среды, показатели титруемой кислотности молока, на основании

которой рассчитывали количество образуемой молочной кислоты и количество сброженной лактозы [Ганина и др., 2002].

Культивирование микроорганизмов осуществляли глубинным способом в микроаэрофильных условиях в пробирках с 10 и 15 мл среды, в колбах на 100 мл с объемом среды 50 мл, 500 мл – с объемом среды 350 мл при периодическом встряхивании. Культивировали при комнатной температуре (20–25°C) и температуре 30°C. При изучении образования ЭПС молочнокислые бактерии культивировали также в ферментерах "Фермус–3" (НИЦ "Биоавтоматика", г.Н.Новгород) и «Minifors», общим объемом 5 л с полезным объемом 2.5 л в периодическом и отъемно-доливном режиме в микроаэрофильных условиях (перемешивание 80 об/мин) и температуре 30°C. Поддержание pH среды осуществляли 10% или 4н раствором КОН. Для подготовки инокулята штамм *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ-8 культивировали в колбе объемом 500 мл с объемом среды 250 мл в стационарных условиях при 30°C. В качестве питательной среды для подготовки инокулята использовали ту же среду, что и для ферментации: молочная творожная сыворотка с добавлением 30 г/л сахарозы или модифицированная среда MRS с сахарозой г/л: гидролизат казеина – 10, мясной экстракт – 10, дрожжевой экстракт – 5, сахароза – 40, ацетат натрия – 5, цитрат аммония (двузамещенный) – 2, твин 80 – 1, K_2HPO_4 – 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 0.05.

Оптическую плотность для характеристики роста бактерий определяли на фотоколориметре (фотометр) "Экотест-2020-4-РС".

Концентрацию редуцирующих веществ определяли методом Бертрана.

Пробиотические свойства культур кефирных грибков определяли в соответствии с рекомендациями Института Микробиологии и эпидемиологии им. Г.Н. Габричевского по их устойчивости к желчи (20, 30 и 40%), фенолу, способности к росту при щелочном значении pH. Антагонистическую активность молочнокислых бактерий определяли на плотной питательной среде методом перпендикулярных штрихов по отношению к тест-культурам *Escherichia coli* № 168/59 ГКПМ 240345, *Staphylococcus aureus* № 25923 ГКПМ 201189, *Pseudomonas*

aeruginosa № 27/99 ГКПМ 190027 и *Proteus*, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Устойчивость к антибиотикам определяли классическим методом наложения фильтров, смоченных в антибиотике [Градова и др., 2004].

β-галактозидазную активность микроорганизмов определяли по их кислотообразующей способности при культивировании на молоке [Ганина и др., 2002], а также при использовании хромогенного субстрата X-Gal [Миллер, 1967].

Концентрацию сахаров (глюкозы и галактозы) в культуральной жидкости определяли в динамике при периодическом культивировании *Leuconostoc gelidum* методом тонкослойной хроматографии. *L.gelidum* культивировали в микроаэрофильных условиях в жидкой среде следующего состава, г/л: глюкоза – 30, дрожжевой экстракт – 15, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0.05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1, K_2HPO_4 – 2. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинах силикагеля 60 F₂₅₄ (Merck, Германия), в качестве растворителя использовали смесь – изопропиловый спирт : этилацетат : вода в соотношении 7:1:2, в качестве проявителя – 2% щелочной раствор хлористого 2,3,5-трифенилтетразолия в спирте [Кадырова, 2010].

Способность выделенных изолятов использовать разные источники углерода для молочнокислого брожения определяли по изменению показателей рН и титруемой кислотности (°Т) при их культивировании на жидкой среде, г/л: $(NH_4)_2SO_4$ – 5, KH_2PO_4 – 1, KCl – 0.15, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2, $CaCl_2$ – 0.05, дрожжевой экстракт – 5, с глюкозой, лактозой или галактозой – 20 г/л.

Активность спиртового брожения определяли в сосудах Эйнгорна-Смита и выражали в относительных единицах 1; 0.5; 0.3; 0.15 (по объему вытесняемой жидкости).

Способность к спорообразованию дрожжевых компонентов кефирного грибка определяли при высеве на среду Городковой: (%): глюкоза – 0,1; пептон – 1; NaCl – 0.5; агар – 3 (инкубировали при комнатной температуре в течении 21 дня). Наличие спор определяли при фазово-контрастном микроскопировании.

Скрининг культур, способных синтезировать экзополисахариды проводили на основании качественной реакции при высеве изолятов на плотную питательную среду с красителем рутениевым красным, содержащей сухое молоко с пониженным содержанием жира – 10% (или цельное обезжиренное молоко в качестве основы среды), дрожжевой экстракт – 0,5%, агар – 1,5%, сахароза – 1%, рутениевый красный – 80 мг/л [Ботина и др., 2010].

Выделенные культуры, способные продуцировать полисахариды, выращивали в микроаэрофильных условиях на жидкой среде (MRS) с разными источниками углерода: лактозой, глюкозой, галактозой, сахарозой, а также и на молочной сыворотке в условиях периодического культивирования в колбах при комнатной температуре 20–23°C и температуре 30°C (время экспозиции не более 6 суток) и в ферментере общим объемом 5 л.

Вязкость среды измеряли капиллярным стеклянным вискозиметром ВПЖ–2 с диаметром капилляра 0.34 мм ($K=0.003 \text{ мм}^2/\text{с}^2$) по скорости истечения жидкости.

$$V = \frac{g}{9.807} \cdot T \cdot K ,$$

Где V – кинематическая вязкость жидкости в $\text{мм}^2/\text{с}$; T – время истечения жидкости в секундах; g – ускорение свободного падения в месте измерения в $\text{м}/\text{с}^2$; K – постоянная вискозиметра в $\text{мм}^2/\text{с}^2$.

Для **количественного определения экзополисахаридов** использовали метод, основанный на выделении полисахаридов из культуральной жидкости многократным переосаждением этиловым спиртом и их количественного определения фенол-серным методом (по лактозе). Полисахариды кефирных грибков выделяли при их нагревании в кипящей воде при дальнейшем осаждении спиртом [Piermaria et al., 2008].

Структуру синтезированных экзополисахаридов определяли при использовании ИК-спектрального анализа. Исследования проводили на базе ФБГУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН. Спектры комбинационного рассеяния регистрировали с помощью КР-спектрометра

RamanStation-400 (Perkin-Elmer), оснащенного лазерным возбуждением 785 нм. Спектры записывали без какой бы то ни было подготовки пробы для анализа.

ИК-спектры полученных лабораторных образцов экзополисахаридов записывали с помощью Фурье-ИК-спектрометра Tensor-27 (Bruker), оснащенного приставкой НПВО Miracle (Pike Technologies). В работе использовали НПВО-кристалл из Ge на 1 отражение. Дополнительно записывали спектры ИК в режиме «на пропускание», используя приставку Microfocus (Perkin-Elmer), а также тонкие пластины кристаллического кремния. В последнем случае образцы наносили на поверхность кремния из водного раствора, а спектры записывали после испарения воды. Обработку ИК- и КР-спектров осуществляли с помощью ПО OPUS v/6.5 (Bruker).

Для анализа полученных спектров проводили компьютерный библиотечный поиск соответствия ИК-спектров изученных экзополисахаридов известным спектрам полисахаридов и целлюлозы.

Лиофильную сушку образцов ЭПС осуществляли на аппарате фирмы Scanvac CooSlate 100-9 Pro с объемом конденсатора 9 л.

Определение молекулярной массы и термодинамических параметров ЭПС производили методом динамического и статистического светорассеивания на базе Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН.

В основе данного метода лежит изменение величины « ΔR_{Θ} » от угла рассеяния « Θ ». На основе измеренной величины « ΔR_{Θ} » для ряда концентраций раствора «с» и углов рассеяния « Θ » рассчитывали величину « $H_c/\Delta R_{\Theta}$ ».

Молекулярная масса полимера рассчитывалась по формуле:

$$H_c/\Delta R_{\Theta} = 1/M + (16\pi^2/(3M\lambda_0^2)) \langle R_G^2 \rangle \sin^2(\Theta/2) + 2 A_2c,$$

где ΔR_{Θ} – избыточное светорассеяние раствором полимера по отношению к растворителю; Θ – угол рассеяния; H – оптическая константа раствора полимера.

Среднеквадратичный радиус инерции полимерных молекул, $\langle R_G^2 \rangle$, находили из тангенса угла наклона экстраполяционной кривой $(H_c/\Delta R_{\Theta})_{c=0}$, а

второй вириальный коэффициент, « A_2 » – из тангенса угла наклона экстраполяционной кривой « $Hc / \Delta R_{\Theta=0}$ ».

Приведенная интенсивность светорассеяния связана с молекулярными параметрами полимера формулой:

$$\alpha = (n_0 M / 2\pi N_A) dn/dc ,$$

где n_0 – показатель преломления чистого растворителя; c – массовая концентрация полимера, г/мл; α – поляризуемость, α – индекс показателя преломления раствора; величина dn/dc называется инкрементом показателя преломления; она непосредственно определялась из эксперимента путем рефрактометрических измерений для данной системы кефиран – растворитель.

Результаты по светорассеиванию снимались под 13 углами (от 40° до 140° , через каждые 10 градусов, а также в углах 45° и 135°), каждое измерение проводилось дважды. Измерения проводились при 25°C (термостатирование) и ионной силе раствора 0.001M.

Для приготовления биоразлагаемых пленок на основе полученных образцов ЭПС использовали водные растворы, содержащие 0.1 г ЭПС / 7.5 г раствора, к которым добавляли в качестве пластификатора 2.5 г глицерина (25 масс.%). Пленки получали в 4.5 сантиметровых пластиковых чашках Петри. Полученные растворы сушили при 87°C в вентилируемой печи до достижения постоянного веса в течении 6 ч.

При получении количественных показателей исследования проводились в не менее трех биологических повторностях и использовались средние показатели.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование микробного профиля кефирных грибков, культивируемых на нативном молоке (КПас+)

3.1.1. Характеристика, исследование микробного профиля кефирных грибков и их «закваски»

Кефирные грибки, применяемые при производстве кефира на молочных предприятиях г. Ставрополя (КГС), г. Гагарина (КГГ) и лиофилизированные кефирные грибки, используемые на предприятиях г. Москвы (КГМ) и г. Владикавказа (КГВ), представляли желеобразные гранулы неправильной формы со складчатой и бугристой поверхностью (рис. 3.1), различающиеся по размеру и упругости (табл. 3.1).

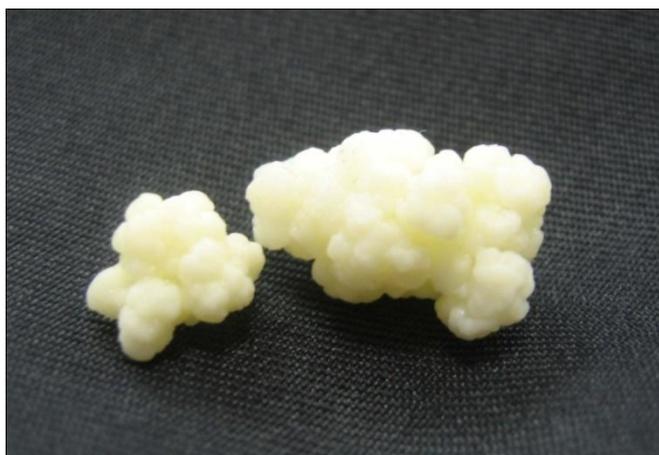


Рис. 3.1. Кефирные грибки КГС

Средний объем кефирных грибков популяции КГС и КГГ составлял около 1.0 мл, а КГВ и КГМ около 0.5 мл, что соответствует диапазону размеров кефирных грибков, описанному в литературе [Королева, 2000; Abraham, de Antoni, 1999; Garrote et al., 2001; Otes, Cagindi, 2003; Фильчакова, 2004; Otes, Cagindi, 2003].

Содержание азота в кефирных грибах, косвенно указывающее на микробную их составляющую, практически было одинаковым: 4.7–5.0%, что также соответствовало количеству азота 4.5–4.8%, определяемого в кефирных грибах, отобранных на разных предприятиях в Аргентине [Garrote et al., 2001].

Характеристика исследуемых кефирных грибков

Кефирные грибки	КГС	КГГ	КГВ	КГМ
Средний объем, мл	1.1 ± 0.03	0.95 ± 0.02	0.52 ± 0.02	0.47 ± 0.03
Содержание азота, %	4.7	5.0	4.9	4.8
Упругость	+++	+++	++	+

В процессе работы при растирании кефирных грибков при их подготовке к определению микробного сообщества была выявлена необходимость учитывать степень их упругости. Так при повторном растирании наиболее упругих грибков КГС и КГГ количество высеваемых микроорганизмов увеличивалось на 15–20%, что нами учитывалось в дальнейшей работе.

При инкубировании в молоке единичных кефирных грибков небольшого размера было показано, что в течение 1–2 суток объем грибков увеличивался до средних размеров, характерных для культивируемых грибков, после чего от материнских зерен отделялось 1–5 мелких образований (рис. 3.2).

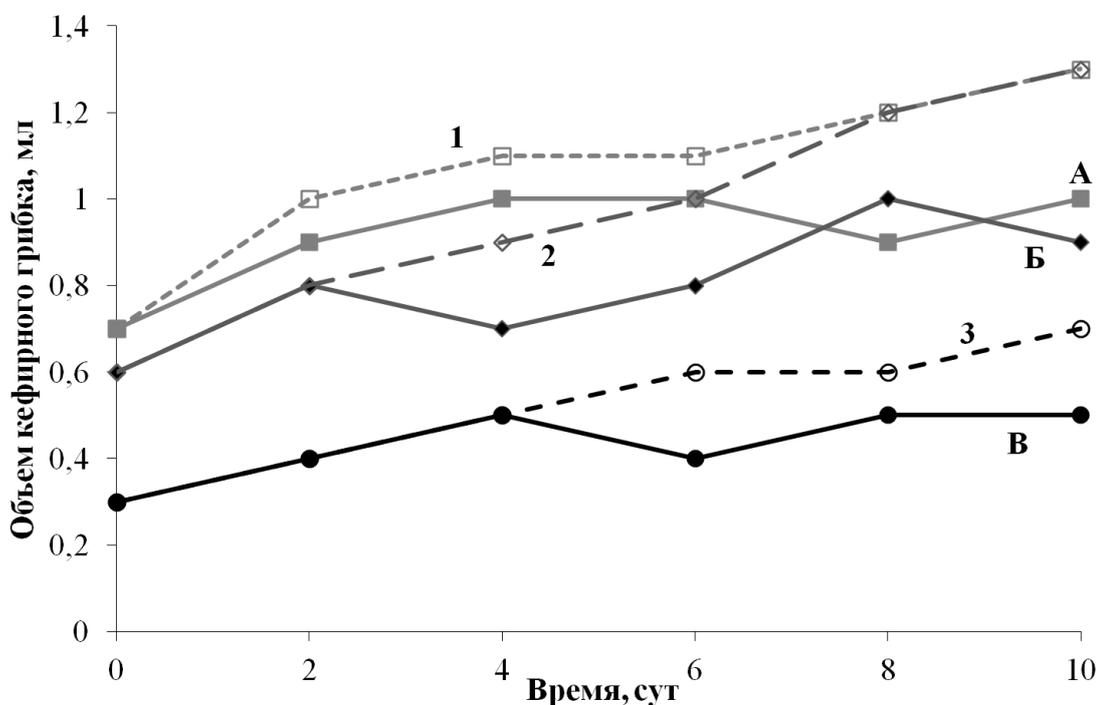


Рис. 3.2. Динамика роста кефирных грибков КГС, КГГ, КГМ.

А – КГС, Б – КГГ и В – КГМ – объем кефирных грибков; 1, 2 и 3 – объем общей массы кефирных грибков

Общий объем массы кефирных грибков в дальнейшем повышался за счет роста отделившихся мелких образований, а объем материнского грибка медленно увеличивался, приближаясь к первоначальному. Наблюдаемая динамика роста кефирных грибков показывает, что их микробное сообщество способно взаимодействовать со средой обитания как некое кооперативное целое.

Анализ поверхности кефирных зерен с помощью сканирующей электронной микроскопии показал, что наружная поверхность и приповерхностный внутренний слой зерна представлены тесно переплетенными нитями палочковидных (длинных и изогнутых) бактерий, погруженных в полисахаридный матрикс. Такая организация является составной частью стромы грибка, позволяющая включать в себя и удерживать в иммобилизованном состоянии другие микроорганизмы (рис. 3.3 а, б).

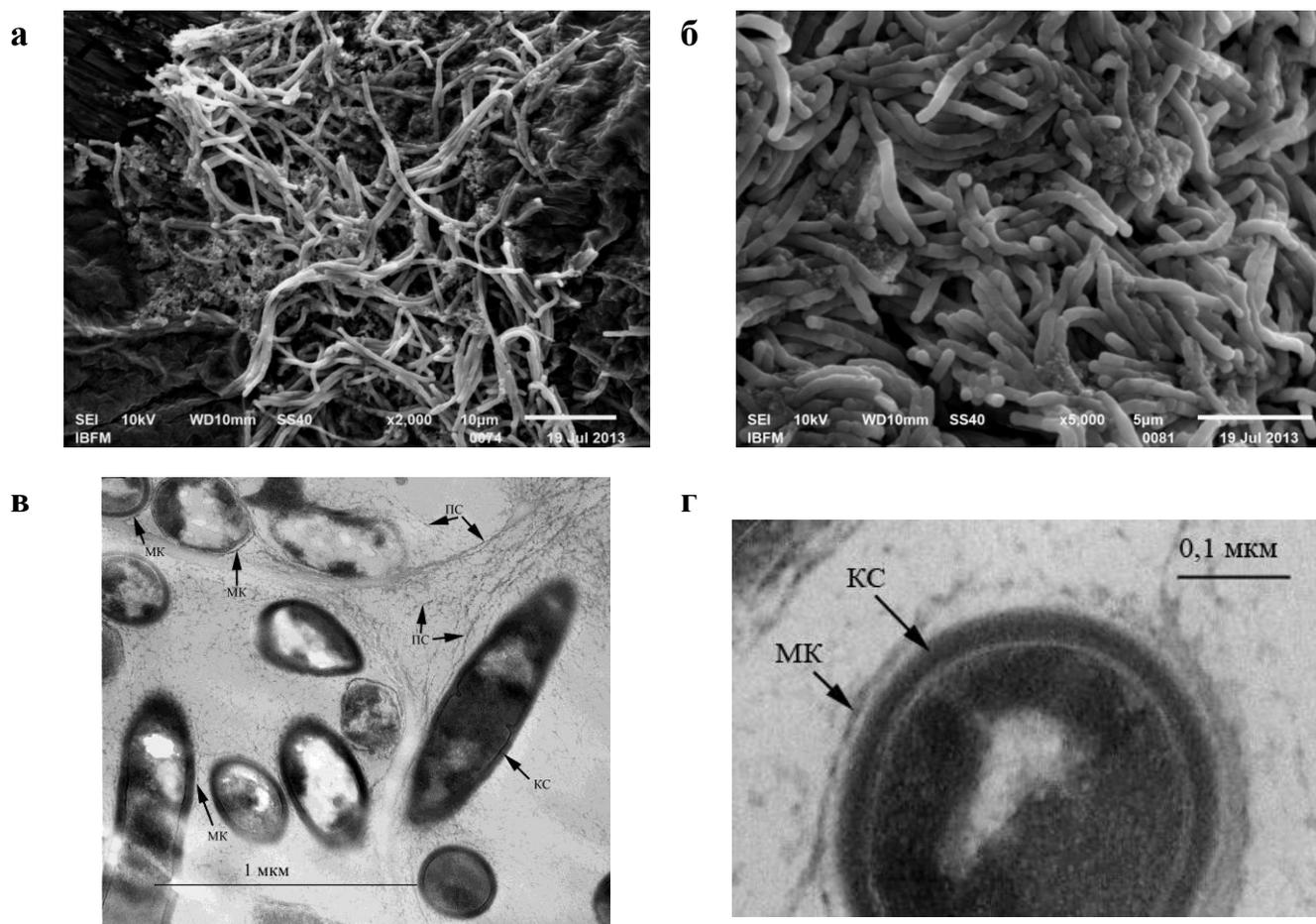


Рис. 3.3. Электронно-микроскопические исследования структуры кефирных грибков: а, б – сканирующая электронная микроскопия поверхности кефирных грибков, в, г – ультратонкие срезы кефирных грибков, где обозначения: КС – клеточная стенка; МК – микрокапсула; ПС – полисахаридные фибриллы.

Клетки дрожжей и кокков на электронных микрофотографиях не видны, что также отмечалось [Елинов, Ларина, 1999] при исследовании тибетского риса.

Анализ ультратонких срезов кефирных грибков показал, что внутренняя область кефирного зерна заполнена фибриллярным матриксом полисахаридной природы, в котором локализованы крупные (до 5 мкм) и среднего размера клетки (как единичные, так и делящиеся) с типичным для грамположительных бактерий строением клеточной стенки. Внешняя поверхность клеточной стенки бактерий характеризуется наличием микрокапсулы, которая находится в тесном контакте с полисахаридным матриксом зерна (рис. 3.3 в, г).

При исследовании срезов кефирных грибков методом Life/Dead («живые/мертвые») при использовании световой микроскопии было отмечено, что наряду с живыми клетками в кефирных грибках присутствует также инактивированные клетки (рис. 3.4). Живые клетки локализованы в матриксе инактивированных, что особенно характерно для бактериальных клеток, развивающихся на автолизатах дрожжевых клеток. Это подтверждает роль дрожжевых клеток как источника ростовых факторов для молочнокислых бактерий.

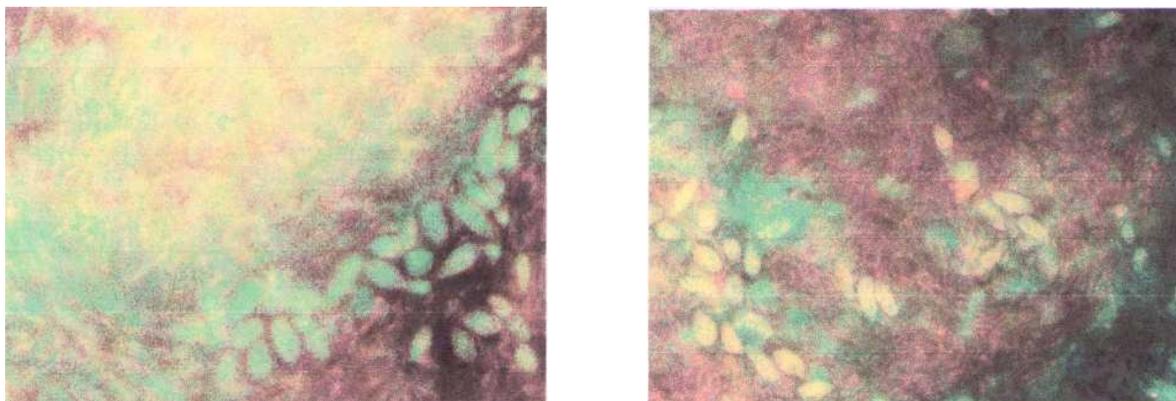


Рис. 3.4. Световая микроскопия срезов кефирных грибков, метод Life/Dead (живые клетки окрашены в зеленый цвет, мертвые – в красный).

Микробные компоненты из нативных кефирных грибков (отмытых, растертых и суспендированных в триптоне) выделялись при использовании классических микробиологических методов высева на твердые питательные среды на основании особенностей морфологии колоний и клеток при микроскопировании.

Исследование микробного состава изучаемых кефирных грибков показало, что количество дрожжевых клеток в ассоциативной культуре было практически в 10 раз меньше, чем бактериальных (табл. 3.2).

Таблица 3.2

Количество дрожжей и бактерий в кефирных грибах, (КОЕ/мл)

Кефирные грибки	КГС	КГГ	КГВ	КГМ
Дрожжи	$4.1 \cdot 10^4$	$2.8 \cdot 10^4$	$9.4 \cdot 10^3$	$9.3 \cdot 10^3$
Бактерии	$9.8 \cdot 10^4$	$1.2 \cdot 10^5$	$2.1 \cdot 10^5$	$3.2 \cdot 10^5$

Применение метода 16S рРНК анализа показало недостаточность визуальных характеристик оценки морфологии колоний и клеток при работе с такими сложными ассоциативными культурами как кефирные грибки, что связано с однотипностью морфологии и малыми размерами колоний молочнокислых бактерий. Так, при первичном анализе изолятов, полученных из КГМ, было показано, что молочнокислые бактерии, выделенные из колоний с одинаковой морфологией, относились к разным морфологическим типам и видам (*Acetobacter fabarum*, *Lactococcus*) и наоборот, культуры, выделенные из казалось морфологически различающихся колоний, – относились к одному виду (*Lactococcus lactis*) (табл. 3.3).

Исходя из этого, для определения микробного профиля молочнокислых бактерий кефирных грибков в настоящей работе был использован методический подход, основанный на выделении из рассевов кефирных грибков на твердой питательной среде изолятов, колонии которых морфологически имели даже незначительные различия, и определении физиологических свойств, характеризующих их функциональную активность.

Сравнительная характеристика и 16S рРНК анализ изолятов, выделенных из КГМ

Усл. обозн. изолятов	Морфология колоний	16S рРНК анализ
3кж.	маленькие, прозрачные, круглые, плоские, маленькие зоны просветления (мелкие палочки и кокки)	<i>Acetobacter fabarum</i> (89%)
4кж.		<i>Lactococcus</i> (97%)
5кж.	бежевые, белесые, полупрозрачные, плоские, круглые, края ровные, маленькие зоны просветления (кокки)	<i>Lactococcus lactis</i> (94%)
6кж.		

При сравнении микробных профилей трех кефирных грибков, используемых на разных молочных предприятиях, при их культивировании на нативном молоке (lac+), было выделено более 80 изолятов. Из них были отобраны штаммы с наибольшей функциональной активностью с учетом морфологии их колоний и клеток. Полученные изоляты были идентифицированы методом 16S рРНК анализа. Во всех трех образцах кефирных грибков был выявлен практически идентичный состав молочнокислых бактерий (табл. 3.4).

Бактериальный профиль кефирных грибков, используемых на разных молочных производствах

Кефирные грибки (80 изолятов)		
КГС	КГГ	КГМ
<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
<i>Lactobacillus sakei</i>		
<i>Lactobacillus sp.</i>		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		
<i>Leuconostoc gelidum</i>		
		<i>Lactobacillus kefir</i>

Однако данные, характеризующие различия в бактериальном профиле разных кефирных грибков, являются не достаточно корректными, поскольку они были получены на основе «выделенных чистых культур», что может вносить ошибку в результаты в связи с особенностями морфологии колоний молочнокислых бактерий, их однотипностью, и способностью роста ряда видов молочнокислых бактерий на специфических средах.

Невозможность объективного определения структуры сообщества на основании выделения чистых культур показана многими авторами, изучающими ассоциативные культуры [Chen T.-H. et al., 2009; Елинов, Ларина, 1999].

Исходя из этих результатов, далее для сравнения микробного профиля кефирных грибков на ряду с классическими методами выделения чистых культур нами был использован метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE). Данный метод признан наиболее информативным при сравнении микробных сообществ, поскольку он позволяет изучать микробный профиль без выделения чистых культур.

При использовании метода DGGE также не было выявлено принципиальных различий микробного профиля между исследованными образцами кефирных грибков (рис. 3.5). Доминирующими по степени четкости выраженных полосок являлись 7 видов микроорганизмов. Отмечены некоторые различия среди наиболее малочисленных групп микроорганизмов, образующих трудноразличимые полосы.

Таким образом, в результате проведенной работы не было выявлено различий в микробных профилях кефирных грибков, используемых на разных молочных производствах. Об этом свидетельствуют результаты исследований, проводимых как «с выделением чистых культур» и их последующей идентификации с помощью 16S рРНК анализа, так и метода денатурирующего градиентного гель электрофореза (DGGE) «без выделения чистых культур».

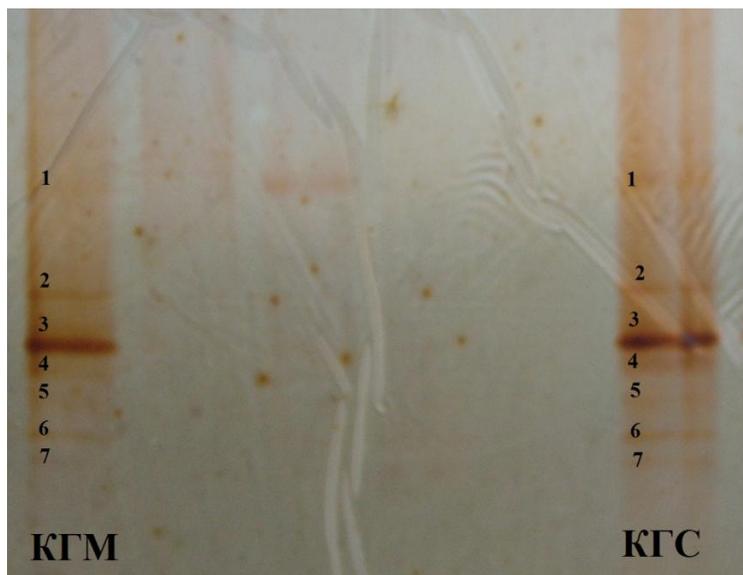
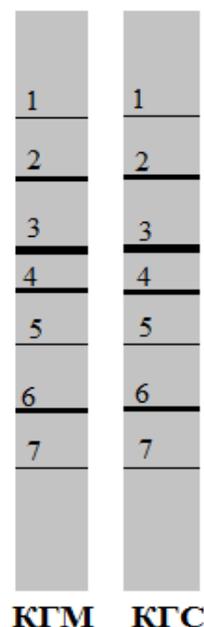
а**б**

Рис. 3.5. DGGE бактериального профиля кефирных грибков КГМ и КГС: **а** – фореграмма DGGE, **б** – схема DGGE.

Поскольку в производственных условиях технология получения готового продукта кефира предусматривает использование не самих кефирных грибков, а их культуральной жидкости при их культивировании на молоке (в производстве называемой «закваской»), в наших исследованиях также исследовался микробный профиль «закваски» исследуемых кефирных грибков.

Исследование микробного профиля «заквасок» проводилось в сравнении с микробным профилем кефирных грибков при использовании классических микробиологических методов посева на твердые среды. Из выросших колоний, различающихся даже незначительными морфологическими характеристиками, с учетом морфологии клеток при микроскопировании, выделялись изоляты микроорганизмов. При идентификации отобранных изолятов методом 16S рРНК анализа было показано, что практически все культуры кефирных грибков переходят в культуральную жидкость при их культивировании на молоке (табл. 3.5).

Микробный состав кефирных грибков и их заквасок

Культуры	КГС		КГМ	
	КГ	закв.	КГ	закв.
<i>Lactococcus lactis</i>	●	●	●	●
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	●	●	●	●
<i>Leuconostoc lactis</i>	○	●	○	●
<i>Lactobacillus sp</i>	○	●	○	●
<i>Acetobacter sp.</i>	●	●	●	●
<i>Lactobacillus casei</i>	○	●	●	●

● – присутствуют, ○ – отсутствуют.

Однако в «заквасках» определялось большее разнообразие микроорганизмов, чем в кефирных грибках. Сравнительное исследование «заквасок» двух кефирных грибков, используемых на разных молочных производствах (КГГ и КГС), показало присутствие в них соответственно 11 и 6 отдельных групп микроорганизмов. При этом при использовании метода 16S рРНК анализа было показано генетическое родство изученных заквасок по трем группам микроорганизмов.

При исследовании динамики десорбции микроорганизмов из кефирных грибков в течение 1, 2 и 3 часов выдерживания было определено, что через 1 час в молоке присутствовали, в основном, кокковидные формы бактерий (75 КОЕ/мл), палочковидные формы (50 КОЕ/мл) и дрожжи (не более 10 КОЕ/мл). К 3-м часам экспозиции общее количество данных форм увеличивалось, но сохранялось соотношение между ними.

Исследование динамики десорбции микроорганизмов из кефирного грибка в течение 1, 2 и 3 суток выдерживания закваски показало, что основные микробные компоненты переходят из кефирного грибка в жидкую фазу в первые сутки культивирования и только уксуснокислые бактерии – на вторые сутки (табл. 3.6).

Динамика десорбции микроорганизмов из кефирного грибка

Культуры	Время культивирования, сут		
	1	2	3
<i>Lactococcus lactis</i>	xxxxxxxx	xxxxxxxx	xxxxxxxx
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	xxxxxxxx	xxxxxxxx	xxxxxxxx
<i>Leuconostoc lactis</i>	xxxxxxxx	xxxxxxxx	xxxxxxxx
<i>Lactobacillus sp</i>	xxxxxxxx	xxxxxxxx	xxxxxxxx
дрожжи	xxxxxxxx	xxxxxxxx	xxxxxxxx
<i>Acetobacter sp.</i>		xxxxxxxx	xxxxxxxx

xxxxxxxx – присутствуют

Учитывая показанную ранее сложность определения микробного состава кефирных грибков при использовании методов, основанных на выделении чистых культур, на следующем этапе исследований был использован метод денатурирующего градиентного гель электрофореза (DGGE) (рис. 3.6).

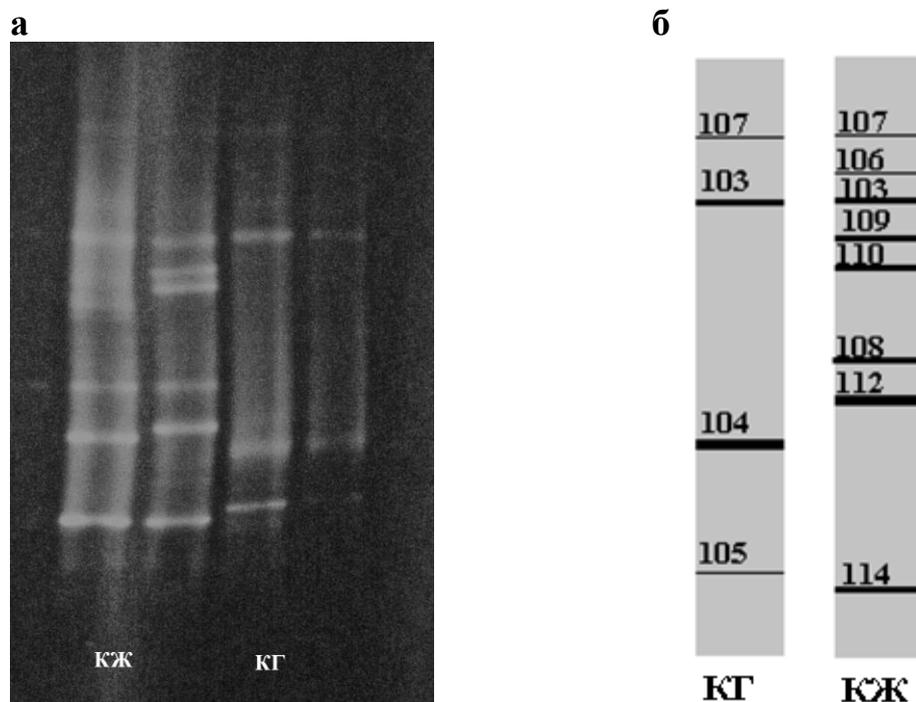


Рис. 3.6. DGGE бактериального профиля кефирных грибков КГС (КГ) и их культуральной жидкости (закваски) (КЖ): а – фореграмма DGGE; б – схема DGGE

Исследования, проведенные при использовании DGGE, кефирных грибков, применяемых на разных молочных предприятиях, показали, что основные культуры кефирных грибков переходят в культуральную жидкость, в «закваску» (рис. 3.6). При этом микробный профиль «заквасок» во всех исследованных образцах шире, чем микробный профиль грибков, что подтверждает результаты, полученные при использовании метода с выделением чистых культур (табл. 3.5). Выявляемый более широкий микробный профиль заквасок может определяться методической трудностью изолирования как клеток микроорганизмов, так и ДНК из кефирного грибка, в связи с его полисахаридной компонентой.

3.1.2. Физиолого-биохимические свойства микробных компонентов кефирного грибка

Для определения трофических взаимодействий между микробными компонентами была исследована физиологическая активность выделенных изолятов. Известно, что функционирование ассоциативных культур определяется основным ресурсом, поступающим в систему, в которой должен быть один продуцент, метаболизирующий основной ресурс с большей активностью [Заварзин, 2003; Сетров, 1971; Свирежев, Логофет, 1978].

На основании литературных данных известно, что β -галактозидаза является эндоферментом, однако, рядом авторов показана возможность выхода в среду глюкозы и галактозы – основных компонентов гидролиза лактозы β -галактозидазой [Молотов и др., 1994; Дидух, Могилянская, 2008; Wulijideligen et al., 2013]. Что нами было подтверждено при использовании тонкослойной хроматографии при культивировании *Leuconostoc gelidum*, выделенной из кефирного грибка, обладающей β -галактозидазной активностью. По мере потребления бактериальными клетками лактозы в среде наблюдалось повышение концентрации галактозы и глюкозы (рис. 3.7).

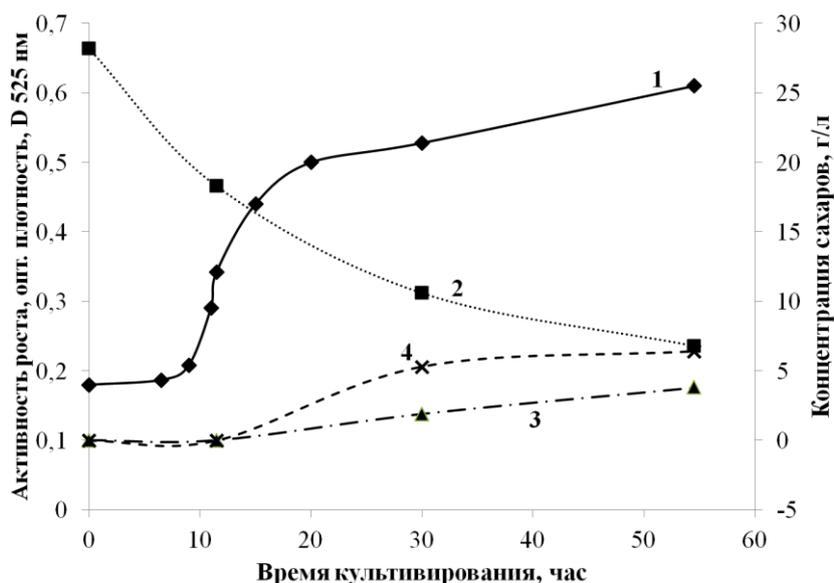


Рис. 3.7. Концентрация глюкозы и галактозы в среде в условиях периодического культивирования *L.gelidum* при использовании лактозы в качестве источника углерода: 1 – рост культуры, $D_{525\text{нм}}$; 2 – концентрация лактозы, г/л; 3 – концентрация глюкозы, г/л; 4 – концентрация галактозы, г/л.

В связи с этим была исследована способность изолятов из кефирных грибков осуществлять молочнокислое брожение не только на лактозе, но и на глюкозе и галактозе.

При исследовании способности 33 изолятов, выделенных из кефирного грибка КГС, развивающегося на нативном молоке (lac+), использовать разные источники углерода для молочнокислого брожения при их культивировании на синтетической среде, было показано, что 46% изолятов обладали β -галактозидазной активностью и осуществляли молочнокислое брожение не только при использовании лактозы, но и глюкозы и галактозы (табл. 3.7; приложение I). В то же время, 54% выделенных изолятов не обладали β -галактозидазной активностью. Из них 36% использовали глюкозу и галактозу, 18% – только глюкозу для молочнокислого брожения.

Полученные данные показывают, что в составе консорциума кефирных грибков присутствуют молочнокислые бактерии разных физиологических групп, способных использовать для молочнокислого брожения, как лактозу, так и углеводы – продукты ее гидролиза. При этом следует отметить, что группа микроорганизмов, обладающих β -галактозидазной активностью,

характеризовалась гетерогенностью по активности молочнокислого брожения. Среди них только 15% изолятов характеризовались высокой активностью молочнокислого брожения, при которой показатель титруемой кислотности среды достигал значений до 56°Т на лактозе, в то время как другие изоляты этой физиологической группы обладали меньшей активностью молочнокислого брожения, показатель титруемой кислотности на лактозе составлял около 25°Т.

Таблица 3.7

Физиологическая активность бактериальных компонентов кефирного грибка при их культивировании на синтетических средах с различными источниками углерода

Общее количество выделенных изолятов 33			Титруемая кислотность, °Т			β-галактозидазная активность
			лактоза	глюкоза	галактоза	
Из них, %	46	15	48	57	43	+
		31	25	51	28	+
	54	36	18	47	27	–
		18	18	40	18	–

Примечание:

«+» изоляты обладают β-галактозидазной активностью, то есть способны синтезировать фермент β-галактозидазу; «–» изоляты не обладают β-галактозидазной активностью, то есть не способны синтезировать фермент β-галактозидазу.

Возможность использования молочнокислыми бактериями и микробным консорциумом кефирных грибков экзогенной глюкозы для молочнокислого брожения также была показана при их культивировании на молоке и молочной сыворотке (МС) при дополнительном внесении глюкозы в концентрации 1% и 2%. Так, при дополнительном внесении глюкозы по сравнению с контролем (исходное молоко или молочная сыворотка) наблюдалась тенденция снижения значений рН среды при культивировании кефирного грибка с 3.9 до 3.1, *L.casei* – с 3.9 до 3.6, *L.acidophilus* – с 3.2 до 3.0. А при культивировании *L.lactis* дополнительное внесение глюкозы практически не оказывало влияния на закисляющую активность бактерий, что может объясняться лимитированием роста культуры при снижении рН среды ниже 3.9–4.0.

Анализ литературы показал, что разными авторами выделяются дрожжи, характеризующиеся различием физиологических свойств: как способные использовать лактозу для спиртового брожения, так и не способные, а также присутствие и тех и других одновременно. Это дает нам основания предположить, что эти результаты могли быть получены на основании того, что дрожжи, образующие однотипные колонии при их высеве из кефирного грибка могли обладать как разными свойствами, так и одинаковыми. В связи с этим нами были исследованы все выделенные изоляты из обособленно стоящих колоний, морфологически характерных для дрожжей. Всего было исследовано 23 изолята из КГС и 32 из КГГ. При микроскопировании первично выделенных изолятов дрожжей было выявлено их инфицирование бактериями, чаще кокковой формы. При расसेве изолятов на среду Сабуро также не были выделены чистые культуры дрожжей из многих изолятов, что может свидетельствовать о тесных симбиотических взаимоотношениях дрожжей и бактерий. При использовании метода дисков, пропитанных ампициллином, из колоний, выросших близ диска, были выделены чистые культуры дрожжей.

Исследование физиолого-биохимических свойств выделенных 55 чистых культур дрожжей показало, что все дрожжи аспорогенны, при их инкубировании в молоке не наблюдалось снижения рН среды, повышения показателей титруемой кислотности, не образовывался сгусток. Изоляты дрожжей не обладали β -галактозидазной активностью.

Определение функциональной активности изолятов дрожжей, инфицированных бактериями, показало, что их функциональная активность выше, чем выделенных из них чистых культур бактерий (табл. 3.8), что свидетельствует о тесных симбиотических отношениях молочнокислых бактерий и дрожжей.

Функциональная активность изолятов чистых культур бактерий и смешанных культур с дрожжами

Объект	Время образ. сгустка, сут.	Характер сгустка	Титруемая кис-ть, °Т	Индекс лактозосбра-живания
Изолят 1	5	+++	120	1.00
Ч.к. бакт. 1	7	++	110	0.89
Изолят 2	6	++	110	1.00
Ч.к. бакт. 2	7	++	100	0.89
Изолят 3	7	++	105	0.94
Ч.к. бакт. 3	8	+	30	0.07

Примечание: «+» – небольшой сгусток на дне пробирки; «++» – желеобразный сгусток; «+++» – плотный сгусток.

Симбиотические отношения дрожжей и бактерий были показаны также в опыте при использовании метода накопительных культур. При культивировании в микроаэрофильных условиях растертых кефирных грибков КГС и КГГ на минеральной среде, содержащей разные источники углерода: лактозу (при разном уровне содержания дрожжевого экстракта (ДЭ): 2, 10, 20 г/л), глюкозу, галактозу и этанол. В четвертом пассаже активность роста накопительных культур на лактозе, глюкозе и галактозе была, практически, одинакова (рис. 3.8).

При этом не было выявлено конкурентного преимущества дрожжей или бактерий, компонентов кефирных грибков, при развитии на лактозе, глюкозе и галактозе. На среде с этанолом развивались практически только палочковидные бактерии, идентифицированные как бактерии *p.Acetobacter*. При увеличении концентрации дрожжевого экстракта в среде с 2 до 20 г/л увеличивалась концентрация дрожжей и бактерий, что подтверждает большую роль продуктов автолиза дрожжей в трофической структуре микробного сообщества кефирных грибков и не дают оснований для определения продуцента микробной системы кефирных грибков при их развитии на молоке.

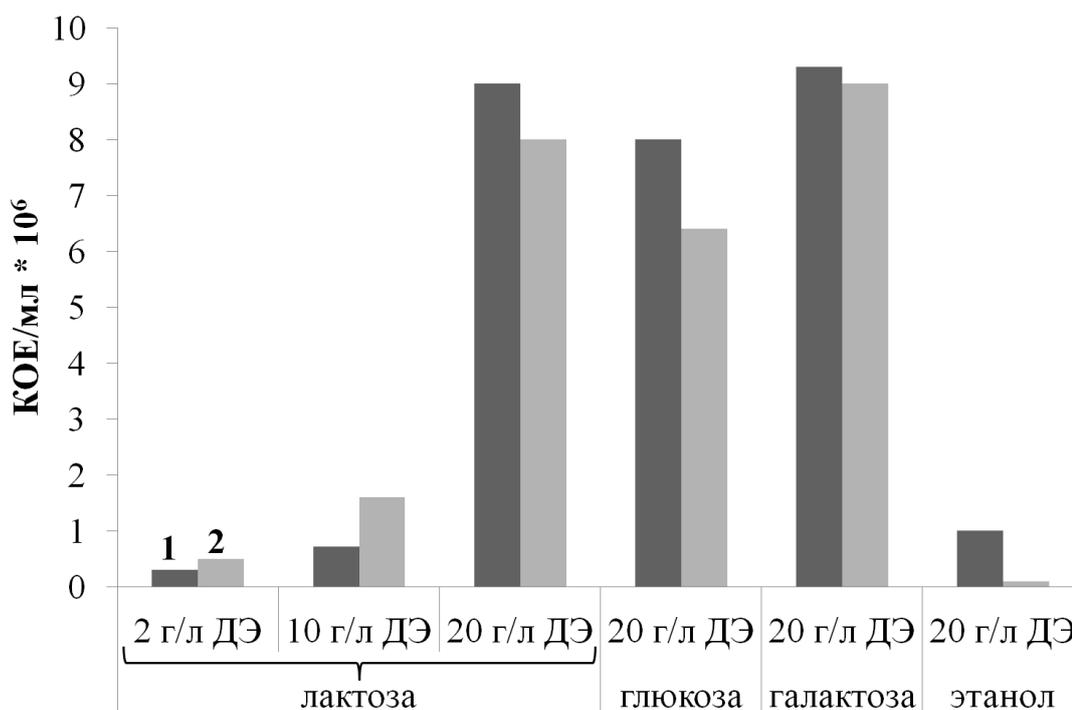


Рис. 3.8. Активность роста накопительных культур растертых кефирных грибков (1 – бактерии, 2 – дрожжи) на лактозе, глюкозе, галактозе и этаноле в четвертом пассаже.

Дрожжи, выделенные из накопительных культур на разных источниках углеводов, были исследованы на содержание ГЦ пар в ДНК. Результаты показали, что по показателю минимального содержания ГЦ пар и диапазону изменчивости дрожжи относились к роду *p.Kluuveromyces*, которые способны активно использовать лактозу в качестве источника углерода в аэробных условиях.

Выделенные культуры дрожжей не использовали лактозу для спиртового брожения, а осуществляли с разной степенью активности спиртовое брожение на глюкозе и некоторые на галактозе (табл. 3.9; приложение I).

Таким образом, проведенные исследования показали, что дрожжи не являются продуцентом в микробной системе исследованных кефирных грибков, они не обладают β -галактозидазной активностью, не используют лактозу для спиртового брожения, но способны в аэробных условиях усваивать лактозу.

**Активность спиртового брожения дрожжей на разных углеводах,
(количество штаммов, %)**

Акт-ть спирт. брожения, отн. ед.	Количество штаммов, выделенных на средах с разными источниками углерода, % (11 дрожжевых изолятов)		
	глюкоза	галактоза	лактоза
1	37	0	0
0.5	27	0	0
0.3	18	18	0
0.15	9	9	0

Полученные данные позволили сделать вывод, что в кефирных грибах основным продуцентом системы могут быть молочнокислые бактерии, относящиеся к физиологической группе, активно использующих лактозу для молочнокислого брожения. Микроорганизмы, относящиеся к другой группе, используют продукты метаболизма лактозы (глюкозу и галактозу) и могут находиться между собой либо в отношениях пассивного антагонизма, либо кооперации.

3.2. Определение функциональной активности и микробного профиля кефирных грибов (КГлас-), длительное время культивируемых на молоке, не содержащем лактозу

Исходя из основных положений, определяющих функционирование сообществ микроорганизмов, вертикальные трофические взаимоотношения определяются основным ресурсом, поступающим в систему. Продуцентом таких сложных систем может быть один вид микроорганизмов, который наиболее активно использует основной субстрат, входящий в систему. Хотя может наблюдаться смена продуцента при изменении основного ресурса или условий культивирования [Заварзин, 2003; Сетров, 1971; Свирежев, Логофет, 1978]. Эволюционно сложившаяся ассоциативная культура кефирных грибов развивается на среде, содержащей в качестве основного источника углерода

лактозу. Следовательно, продуцентом микробной системы кефирных грибков могут быть микроорганизмы способные сбраживать лактозу. Потребление же одних и тех же ресурсов может осуществляться только видами с перекрывающимися экологическими нишами. Виды же, принадлежащие одному трофическому уровню, могут находиться в отношениях конкуренции за ресурс, либо в коалиции в их использовании и образовывать горизонтальную структуру сообщества [Заварзин, 2003]. Таким образом, в ассоциативной культуре кефирных зерен должен присутствовать в данных условиях только один вид, который является продуцентом данной системы и использует основной входящий в систему ресурс лактозу.

Для выявления продуцента ассоциативной культуры кефирных грибков было исследовано влияние основного субстрата лактозы, поступающего в систему, на микробный профиль и функциональную активность кефирных грибков. Для этих целей был использован методический подход, основанный на предложенном С.Н. Виноградским методе накопительных культур, сравнении микробного профиля и функциональной активности кефирных грибков, культивируемых на нативном молоке (lac+) и молоке, в котором лактоза была гидролизована (lac-), но при этом сохранялось общее количество углеводов и не менялся состав других органических компонентов среды. Это предполагало возможность элиминирования из системы микроорганизмов, активно использующих лактозу для молочнокислого брожения.

3.2.1. Сравнительная оценка функциональной активности кефирных грибков КГlac- и КГlac+

На первом этапе работы кефирные грибки КГС и КГМ сравнительно культивировали на нативном молоке (lac+) и на молоке с низкой концентрацией лактозы (lac±). Молоко со сниженным содержанием лактозы получали при помощи обработки нативного молока ферментным препаратом галактозим (степень гидролиза лактозы составляла около 70% и более).

В результате не было выявлено различий в активности молочнокислого брожения кефирными грибами при культивировании на молоке со сниженной концентрацией лактозы (обработанное ферментным препаратом галактозим, lac^{\pm}) (рис. 3.9 а, б). А также не было выявлено различий в микробном составе кефирных грибов КГ lac^{\pm} в сравнении с КГ lac^{+} .

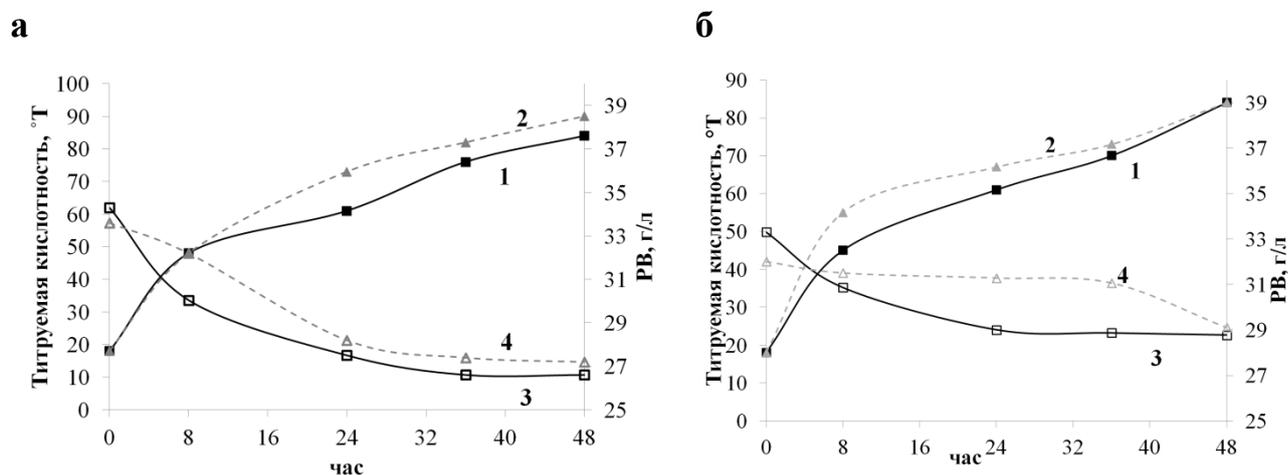


Рис. 3.9. Функциональная активность кефирных грибов (а) КГМ и (б) КГС при культивировании их на нативном молоке (lac^{+}) и молоке со сниженным содержанием лактозы (lac^{\pm}),

где кривые 1 и 3 соответствуют изменению титруемой кислотности ($^{\circ}T$) и редуцирующих веществ (РВ) в процессе культивирования КГ lac^{+} , 2 и 4 – изменению титруемой кислотности ($^{\circ}T$) и РВ в процессе культивирования КГ lac^{\pm} .

При перекрестном культивировании кефирных грибов КГС и КГМ, выращенных на нативном молоке (lac^{+}) и молоке, обработанном галактозимом (lac^{\pm}), соответственно на обработанном молоке и нативном также не было выявлено различий по времени образования сгустка и его характеру.

При использовании ферментного препарата галактозим лактоза гидролизовалась не полностью и при пересеве кефирных грибов на молоко со сниженным содержанием лактозы (lac^{\pm}) не было выявлено изменений в микробном профиле и функциональной активности кефирных грибов. Поэтому в дальнейших исследованиях использовали безлактозное Финское молоко фирмы Valio (lac^{-}). При этом предполагали, что длительное культивирование на безлактозном молоке (lac^{-}) может привести к иллиминированию культур, являющихся основными продуцентами, усваивающими лактозу, к изменению

вертикальной трофической структуры микробного сообщества, а также к изменению функциональной активности кефирных грибков.

Поскольку показано, что кефирные грибки, используемых на разных молочных производствах, практически не отличаются по составу, в дальнейшей работе исследования проводились с кефирным грибом КГС. Опыт по культивированию кефирных грибков на безлактозном молоке (lac-) в сравнении с нативным молоком (lac+) продолжался более 4-х лет.

При определении функциональной активности на протяжении всего опыта не было выявлено изменений функциональной активности кефирных грибков, культивируемых на lac- и lac+. При этом в процессе наблюдения в обоих вариантах опыта отмечалось образование хорошего плотного сгусток в молоке и снижение pH среды до 4.0 ± 0.3 .

При перенесении кефирных грибков КГlac- в нативное молоко также не было выявлено изменений их функциональной активности: КГlac- при засеве его в нативное молоко образовывал хороший плотный сгусток и при этом показатели титруемой кислотности составляли 275 и 300 °Т, соответственно, для КГlac- и КГlac+.

Сравнительный анализ действия «закваски» КГlac+ и КГlac- на нативное молоко не выявил различий между их функциональными активностями: не изменялись такие их функциональные характеристики, как показатели титруемой кислотности, скорость и характер образования сгустка, количество образуемой молочной кислоты (табл. 3.10).

Анализ полученных данных показывает, что в микроорганизмах кефирных грибков КГlac- при перенесении их в нативное молоко происходит индукция синтеза β -галактозидазы культурами, способными использовать лактозу для молочнокислого брожения.

**Функциональная активность закваски КГлас+ и КГлас-
(48 ч культивирования)**

год	закваска	Хар-р сгустка	pH	Титруемая кис-ть, °Т	Кол-во сброж. лактозы, г	Кол-во молочной кислоты, г
2010	лас+	++++	4.8	83	0.56	7.5
	лас-	++++	4.7	91	0.62	8.2
2011	лас+	++++	4.1	127	0.93	11.4
	лас-	++++	4.0	135	1.00	12.2
2012	лас+	++++	4.4	101	0.71	9.1
	лас-	++++	4.3	110	0.79	10.0
2013	лас+	++++	4.4	101	0.71	9.1
	лас-	++++	4.3	103	0.73	9.3
2014	лас+	++++	4.4	90	0.62	8.1
	лас-	++++	4.7	82	0.55	7.4

Примечание: «++++» – плотный однородный сгусток.

При засеве «закваски» КГлас- в нативное и безлактозное молоко по сравнению с «закваской» КГлас+ также не выявлено различий в их функциональной активности (табл. 3.11). Показана одинаковая их способность образовывать хороший плотный сгусток, снижать pH, повышать значения титруемой кислотности как при внесении в нативное, так и безлактозное молоко, что свидетельствует о сохранении функциональной активности кефирного грибка длительное время культивируемого на молоке, не содержащем лактозу.

Таблица 3.11

**Функциональная активность «закваски» КГлас+ и КГлас- при внесении в
молоко лас+ и лас-**

Субстрат для культ-я	Характеристика	Исх. молоко	закваска КГлас+	закваска КГлас-
Лас+ молоко	Хар-р сгустка	-	++++	++++
	pH	6.4	4.3	4.2
	°Т	18–31	131	135
Лас- молоко	Хар-р сгустка	-	++++	++++
	pH	6.4–6.5	4.2	4.1
	°Т	17	100	104

При сравнительной оценке пробиотических свойств кисломолочного продукта кефира, полученного при использовании КГлac+ и КГлac-, показано отсутствие различий пробиотических свойствах продуктов: устойчивость к желчи, фенолу, поваренной соли, щелочной реакции среды, к антибиотикам, антагонистические отношения к микроорганизмам-патогенам. Было показано, что «закваски» lac+ и lac- не устойчивы к фенолу, устойчивы к небольшим концентрациям NaCl, к низким концентрациям желчи, к слабощелочной реакции среды и слабо устойчивы к большим концентрациям NaCl и сильнощелочной реакции среды (табл. 3.12). Обладают наибольшей устойчивостью к таким антибиотикам, как пенициллин и менее устойчивы к большим концентрациям левомицетина и канамицина.

Таблица 3.12

Исследование резистентности консорциума микроорганизмов кефирных грибков к фенолу, желчи, NaCl и щелочной реакции среды

Исследуемые свойства		Показатели роста микроорганизмов	
		КЖ lac+	КЖ lac-
Устойчивость к фенолу		-	-
Устойчивость к NaCl			
NaCl, %	2	+	+
	4	±	±
	6.5	±	±
Устойчивость к желчи			
желчь, %	20	-	-
	30	-	-
	40	-	-
Устойчивость к щелочной реакции среды			
pH	8.3	+	+
	9.2	±	±
	9.6	±	±

Примечание: «+» устойчив; «±» слабо устойчив; «-» не устойчив.

Изучение антагонистической активности показало, что молочнокислые бактерии обоих образцов «заквасок» обладают антимикробным действием к

таким патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, как: *E.coli*, *Ps.aeruginosa* и *Proteus*.

Таким образом, кефирные грибки, длительное время культивируемые на безлактозном молоке (КГлас-), не потеряли своих пробиотических свойств.

Определение общего азота в грибах – как косвенный показатель соотношения в них микроорганизмов и полисахаридов, показало, что содержание общего азота в кефирных грибах КГлас+ и КГлас- составляло, соответственно 5.80% и 6.06%, что свидетельствует о несколько большем содержании микрофлоры в КГлас- по отношению к сухой массе грибка или меньшем содержании полисахаридов, чем в КГлас+.

Исследование динамики прироста кефирных грибов проводилось при измерении объема всей массы кефирных грибов и перенесении ее в свежее молоко через каждые сутки. Не было выявлено принципиальных отличий в активности прироста кефирного грибка КГлас- по сравнению с КГлас+ (рис. 3.10).

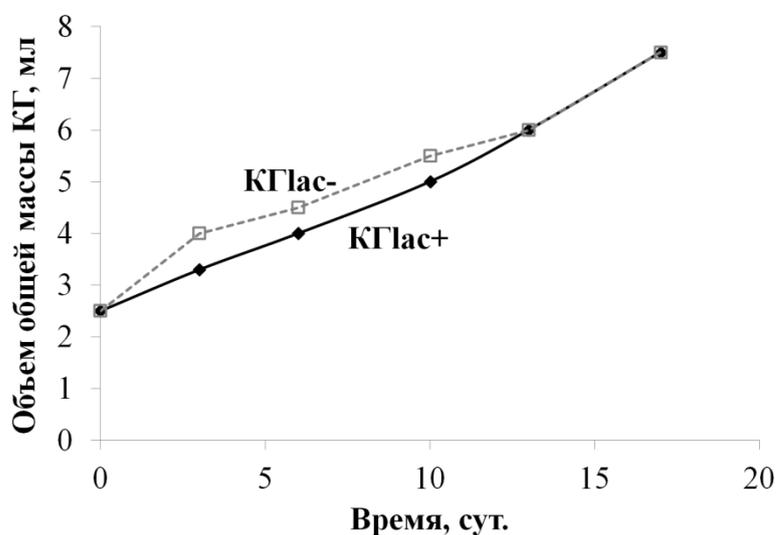


Рис. 3.10. Динамика прироста массы кефирных грибов КГлас+ и КГлас- при культивировании их, соответственно на молоке лас+ и лас-.

При сравнении ИК-спектров экзополисахаридов, выделенных из кефирных грибов КГлас+ и КГлас- (рис. 3.11, приложение II), также не выявлено различий. Положение и интенсивность полос поглощения в области $4000\text{--}650\text{ см}^{-1}$ дают

основание говорить об идентичности состава изученных экзополисахаридов. При длительном культивировании на молоке в отсутствие лактозы не произошло принципиальных изменений в структуре синтезируемых ЭПС, выполняющих структурирующую функцию в кефирных грибах.

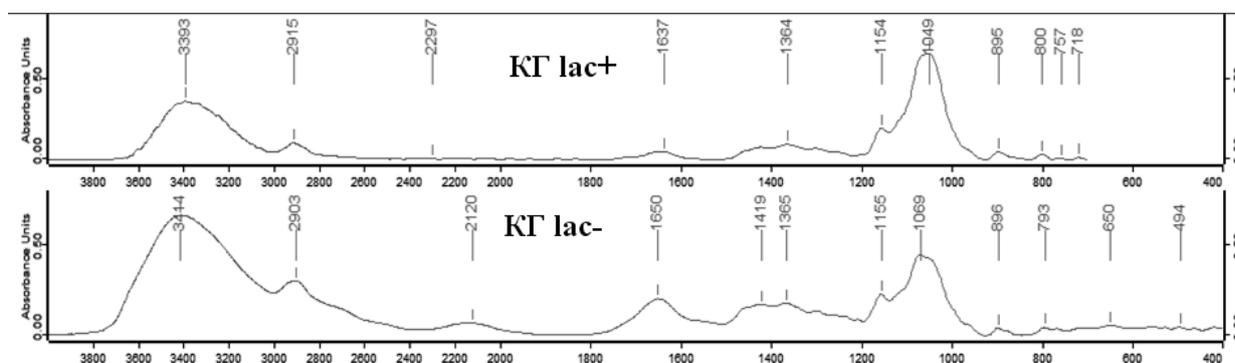


Рис. 3.11. ИК-спектральный анализ образцов экзополисахаридов, выделенных из кефирных грибов КГlac+ и КГlac-

При использовании сканирующей электронной микроскопии не выявлено морфологических различий исследуемых кефирных грибов КГlac+ и КГlac- (рис. 3.12).

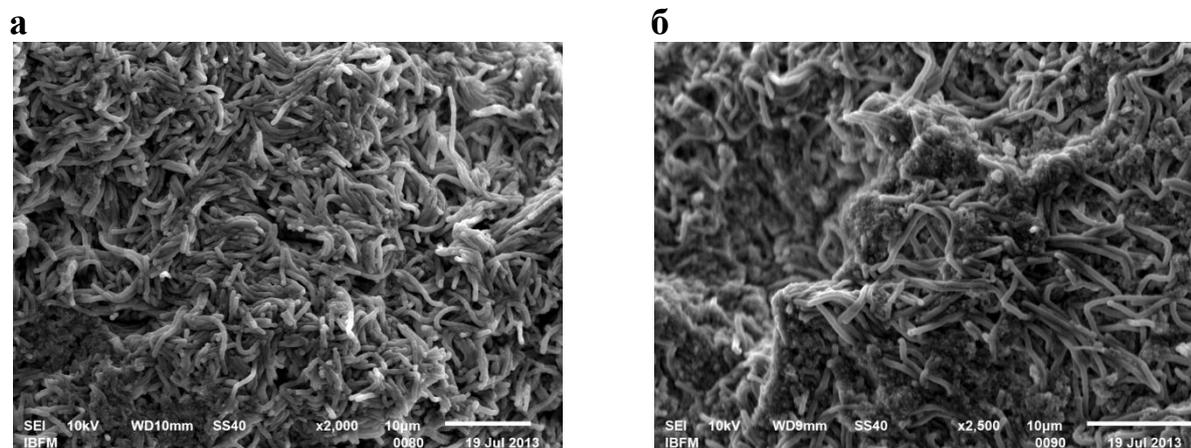


Рис. 3.12. Сканирующая электронная микроскопия поверхности кефирных грибов: а – КГlac+ и б – КГlac-.

Таким образом, при исследовании влияния лактозы, как основного ресурса, поступающего в ассоциативную микробную систему кефирных грибов, на их функциональные свойства была показана высокая степень устойчивости данной системы. Ни снижение концентрации лактозы, ни полная замена ее на продукты ферментативного гидролиза не оказали влияния на функциональные свойства

кефирных грибков: активность молочнокислого брожения и пробиотические свойства.

3.2.2. Микробный профиль кефирных грибков, длительное время культивируемых на безлактозном молоке (КГЛас-)

Для сравнения микробного профиля кефирных грибков, длительное время культивируемых на безлактозном и нативном молоке, было выделено 80 изолятов бактерий из КГЛас- и 73 из КГЛас+, колонии которых имели даже незначительные морфологические различия. При исследовании функциональной активности полученных изолятов показано, что в кефирных грибах присутствовало сравнимое количество изолятов, характеризующихся различной функциональной активностью (табл. 3.13; приложение I).

Таблица 3.13

Функциональная активность изолятов микроорганизмов, выделенных из кефирных грибков КГЛас- и КГЛас+, при культивировании на нативном молоке (Лас+)

Кефирные грибки	КГЛас-	КГЛас+	Характеристики функциональной активности		
			β-галактозидазная акт-ть	Титруемая кис-ть, °Т	Показатель закисления среды, рН
Количество изолятов	80	73	-	-	-
Из них, %	33	30	+	40–100	4.3–5.6
	35	22	+	≤38	5.8–6.8
	32	48	–	18	6.9

Примечание:

«+» изоляты обладают β-галактозидазной активностью, то есть способны синтезировать фермент β-галактозидазу; «–» изоляты не обладают β-галактозидазной активностью, то есть не способны синтезировать фермент β-галактозидазу.

Так 33 и 30% изолятов, соответственно из кефирных грибков КГЛас- и КГЛас+, характеризовались наличием β-галактозидазной активности и высокой функциональной активностью при развитии на нативном молоке. Так показатели

титруемой кислотности достигали значений 100°T и pH 4.3–5.6. Вторая группа (35 и 22% изолятов) отличались от первой низкой функциональной активностью при развитии на нативном молоке, показатели титруемой кислотности достигали значений до 38°T и слабо снижался pH (значения pH 5.8–6.8). Изоляты третьей группы (32 и 48% изолятов) характеризовались отсутствием β -галактозидазной активности и были функционально не активны. Наличие данных групп микроорганизмов компонентов кефирных грибков подтверждает результаты, полученные нами ранее (табл. 3.7).

Из каждой физиологической группы микроорганизмов были выделены наиболее функционально активные изоляты, которые были идентифицированы на основании анализа сиквенсов вариабельных участков генов, кодирующих 16S РНК, первичного скрининга по базе данных GenBank и RDP-II, филогенетического сравнения с гомологичными штаммами (табл. 3.14). Культуры были идентифицированы с критерием отнесения микроорганизмов к тому или иному виду при гомологии не менее 97%. При использовании классических микробиологических методов «с выделением чистых культур» не было выявлено принципиальных различий в микробном составе кефирных грибков, длительное время культивируемых на безлактозном молоке, в сравнении с исходными кефирными грибками, культивируемыми на нативном молоке.

На основании полученных данных можно заключить, что продуцентом микробного сообщества кефирных грибков, культивируемых на безлактозном молоке, могли быть либо молочнокислые бактерии из первой физиологической группы (табл. 3.7), которые активно используют глюкозу в отсутствие лактозы для молочнокислого брожения, либо бактерии второй группы, активно использующие глюкозу для брожения.

Бактериальный профиль кефирных грибков КГлас- и КГлас+

Основные фенотипические показатели	КГлас+	КГлас-
Обладают β -гал., 40–100°Т, рН 4.3– 5.6	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus otakiensis</i> <i>Lactobacillus sankii</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus otakiensis</i>
Обладают β -гал., $\leq 38^\circ\text{T}$, рН 5.8–6.8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Не обладают β -гал., 18°Т, рН 6.9	<i>Acetobacter sp.</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Acetobacter sp.</i>

По мере проведения эксперимента проводили сравнительное исследование кефирных грибков, длительно культивируемых на безлактозном и нативном молоке, при использовании метода денатурирующего градиентного гель электрофореза (DGGE) «без выделения чистых культур». Поскольку исследования были проведены на разных приборах, в разных условиях, при использовании разных реактивов, поэтому сравнительную оценку двух образцов объективно можно оценить, сравнивая их только между собой. Анализ фореграмм ампликонов показал, что в двух образцах кефирных грибков количество полос, их толщина, расстояние между ними, в основном, свидетельствуют об идентичности исследуемых образцов (рис. 3.13, 3.14, 3.15).

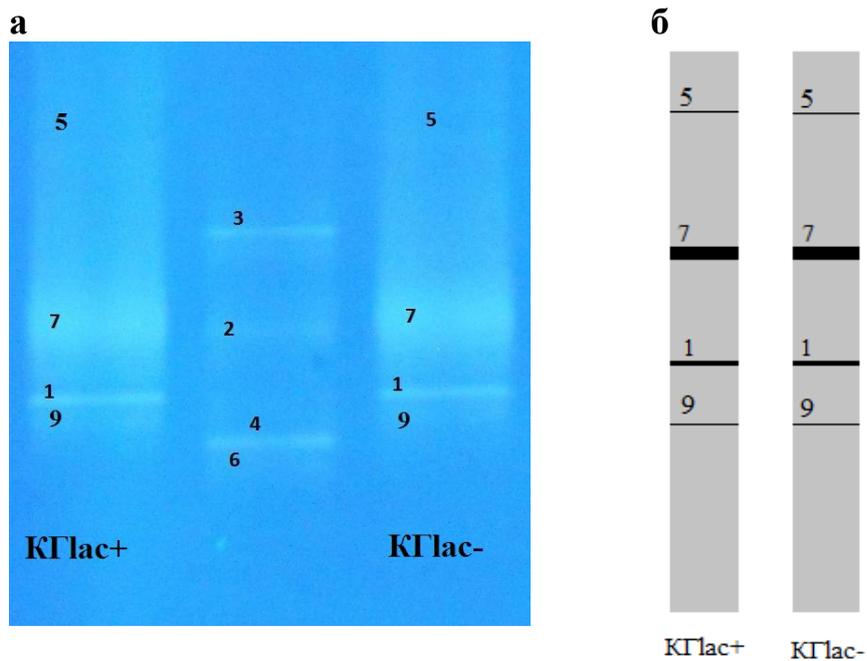


Рис. 3.13. DGGE микробного профиля кефирных грибков: KЛac+ и KЛac-, после 1-го года культивирования (исследование проводили на базе лаборатории микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова): (а) фореграмма DGGE; (б) схема DGGE бактериального профиля.

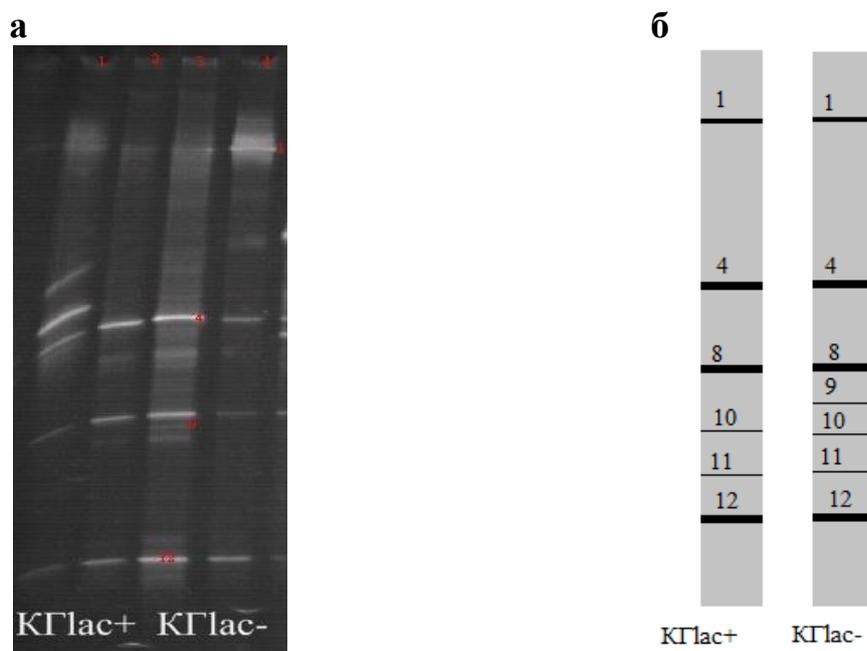


Рис. 3.14. DGGE микробного профиля кефирных грибков: KЛac+ и KЛac-, после 1.5 года культивирования (исследование проводили на базе лаборатории микробиологии Южно-Китайского Университета (Шанхай)): (а) фореграмма DGGE; (б) схема DGGE бактериального профиля.

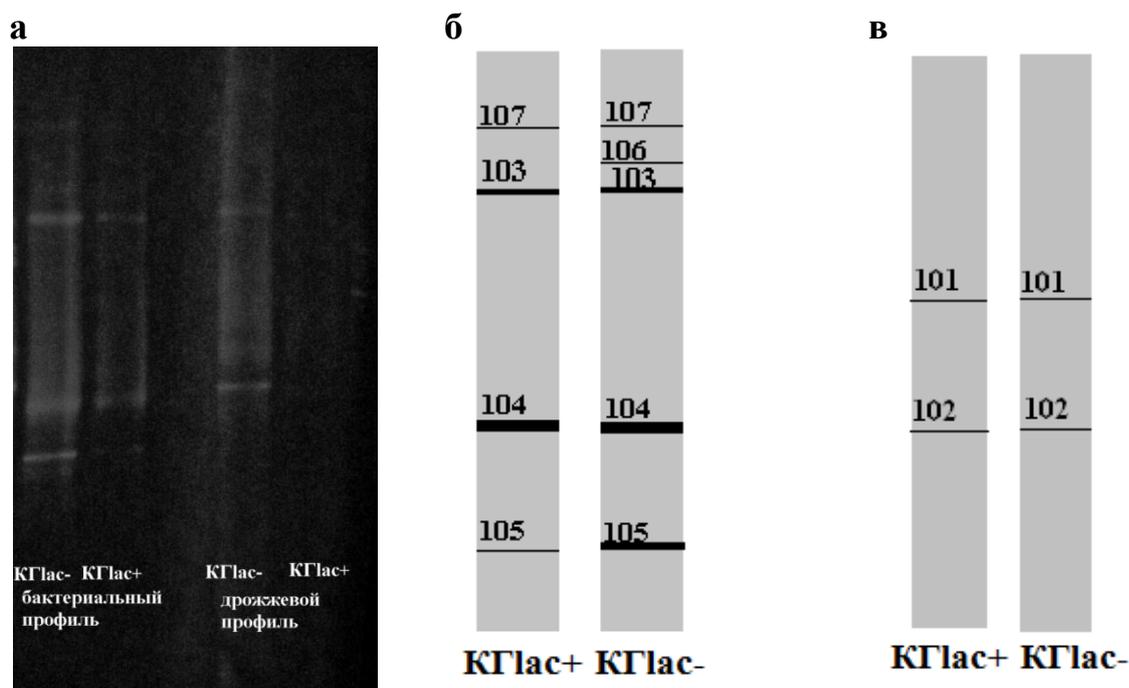


Рис. 3.15. DGGE микробного профиля кефирных грибов: КЛac+ и КЛac-, после 4-х лет культивирования (исследование проводили на базе лаборатории микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова): (а) фореграмма DGGE; (б) схема DGGE бактериального профиля; (в) схема DGGE дрожжевого профиля.

Таким образом, при исследовании кефирных грибов (lac+), культивируемых на нативном молоке, и кефирных грибов (lac-), длительное время (более 4-х лет) культивируемых на молоке, не содержащем лактозы, а также при последующем их перенесении в нативное молоко не было выявлено различий как в микробном профиле, так и их функциональной активности. Это подтверждает присутствие в кефирных грибах микробных компонентов, способных синтезировать индуцибельный фермент β -галактозидазу. Что позволяет быстро перестраиваться при изменении углеродного питания, обеспечивая сохранение стабильности сообщества. Данное положение свидетельствует о роли данного фермента в саморегуляции сообщества кефирных грибов, а, можно предположить, и в других системах.

К тому же длительное культивирование кефирных грибов на безлактозном молоке показало возможность использования кефирных грибов для получения продуктов с пробиотическими свойствами не только на лактозе, но и других субстратах.

Это также подтверждается и литературными данными о широком распространении в природе на листьях и плодах растений молочнокислых бактерий, использующих глюкозу в качестве субстрата для роста и молочнокислого брожения. [Рамонова и др., 2008]. Возможность использования консорциумом кефирных грибков и молочнокислыми бактериями *Lactobacillus casei* для молочнокислого брожения комплекса углеводов, основной составляющей которых являлась глюкоза, была подтверждена при их культивировании на ферментативных гидролизатах пивной дробины [Касаткина и др., 2008].

3.3. Трофическая цепь ассоциативной культуры кефирных грибков

На основании анализа литературных данных и результатов проведенных исследований очевидно, что ассоциативная микробная культура кефирных грибков является устойчивым, высокоорганизованным сообществом, обладающим сложными вертикальными и горизонтальными трофическими связями.

Результаты проведенных исследований позволяют охарактеризовать трофическую цепь и предложить функциональную модель микробного сообщества кефирных грибков (рис. 3.16).

Подход, основанный на оценке физиологической активности выделенных изолятов молочнокислых бактерий, позволяет утверждать, что продуцентом системы микробного сообщества кефирных грибков являются молочнокислые бактерии, относящиеся к первой физиологической группе, обладающие β -галактозидазной активностью, использующие лактозу для молочнокислого брожения и быстро закисляющие систему. Присутствие в системе нескольких видов молочнокислых бактерий, обладающих β -галактозидазной активностью, говорит о том, что между бактериями этой группы должны существовать определенные регулирующие факторы развития: либо конкурентные взаимоотношения за субстрат, либо смена основного продуцента в зависимости от условий, в частности изменение рН среды. Продуцентом системы является один

из видов, обладающий наибольшей активностью использования лактозы в данных условиях, что подтверждается и в работе Хамнаевой Н.И. [Хамнаева, 2001.]. Так, например, можно предполагать, что бактерии *Lactococcus lactis*, которые могут развиваться как при нейтральной реакции среды, так и при низком значении pH и уровне титруемой кислотности до 200°Т (образую до 4.0–30 г/л лактата), начинают использовать для молочнокислого брожения лактозу. При дальнейшем снижении pH лактозу могут использовать бактерии рода *Lactobacillus*, способные развиваться в более кислых средах, при титруемой кислотности до 300°Т (образуют до 120 г/л лактата) [Стоянова, 2008; Определитель бактерий Берджи].

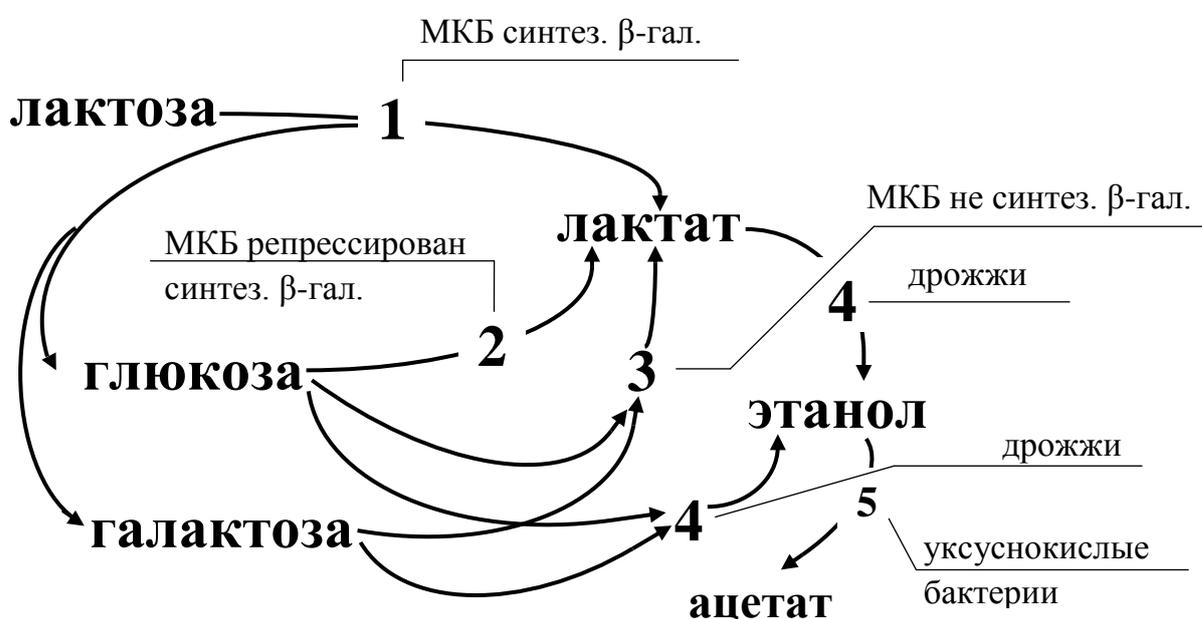


Рис. 3.16. Общая схема трофической цепи ассоциативной культуры кефирных зерен КГлас+ и КГлас-, где: **1** – молочнокислые бактерии, синтезирующие β-галактозидазу; **2** – молочнокислые бактерии группы 1, у которых синтез β-галактозидазы репрессирован глюкозой; **3** – молочнокислые бактерии не синтезирующие β-галактозидазу; **4** – дрожжи; **5** – уксуснокислые бактерии.

Глюкозу и галактозу, выход которых в среду возможен при транспорте лактозы в клетку и ее метаболизме [Молотов и др., 1994], используют для молочнокислого брожения бактерии второй физиологической группы, а также дрожжи для спиртового брожения. Эти микроорганизмы в консорциуме кефирных грибков выполняют регуляторную функцию, удаляя из среды глюкозу, тем самым устраняя ее ингибирующее действие на синтез β-галактозидазы.

Возможность выхода глюкозы и галактозы из клеток объясняет присутствие в кефирных грибах большого количества микроорганизмов, не использующих лактозу для молочнокислого брожения.

Роль дрожжей в микробном сообществе кефирных грибов, очевидно, заключается не только в использовании глюкозы, галактозы и молочной кислоты для спиртового брожения, но и в стимулировании роста бактериальных культур продуктами метаболизма и автолиза. Образующийся спирт используется уксуснокислыми бактериями.

Полученные данные расширяют общее представление о возможных трофических закономерностях рассматриваемых микробных сообществ и являются основой для разработки алгоритма экспериментального создания функционально устойчивой ассоциативной культуры кефирных грибов.

3.4. Кефирные грибки как продуценты экзополисахаридов

Большую роль в структурировании ассоциативной культуры кефирных грибов играет экзополисахариды, которые являются матрицей для их микробных компонентов. По литературным данным кефиран обладает высокой биологической активностью [Medrano et al., 2011; Rodrigues et al., 2005; Laws, Marshall, 2011]. Свойства кефирана определяют перспективу его использования в фармацевтической, пищевой, косметической промышленности. В ряде публикаций показана также возможность использования кефирана, как основы для получения нового пленкообразующего биоразлагаемого материала, как альтернативы синтетической упаковке в пищевой промышленности [Motedayen et al., 2013; Ghasemlou et al., 2011].

В настоящее время описано несколько возможных способов получения полисахарида кефирана:

- выделение путем термической обработки кефирных грибов;
- обогащение молочнокислых продуктов полисахаридами за счет включения в состав заквасок штаммов, обладающих большей активностью синтеза

полисахаридов или непосредственного добавления в продукт полисахаридов, выделенных из кефирных грибков;

- культивирование чистых культур молочнокислых бактерий в оптимальных условиях синтеза кефирана.

Так при исследовании возможности получения *ЭПС кефирана из кефирных грибков* при сохранении их функциональной активности было исследовано влияние температуры на растворение полисахаридной оболочки кефирных грибков. Для этого кефирные грибки равные по объему выдерживали при разных температурах от 20 до 80°C в течение 15 минут при соотношении кефирный грибок/вода 1:12. При определении вязкости жидкости капиллярным стеклянным вискозиметром и концентрация ЭПС после осаждения их спиртом было показано, что наибольшее количество ЭПС растворяется при 80°C, однако, при этом оставшиеся кефирные грибки не образуют сгустка на молоке, то есть не сохраняют свою функциональную активность (табл. 3.15). При температуре 60°C количество ЭПС растворяется почти в два раза меньше, чем при 80°C, но сохраняется функциональная активность. При этом было показано сохранение функциональной активности и «закваски» при их культивировании в молочной сыворотке. Наибольшее сохранение функциональной активности было при 23°C, но ЭПС практически не растворялись.

Таблица 3.15

Влияние температуры нагревания на растворение ЭПС из кефирных грибков при сохранении их функциональной активности

t, °C	23	60	80
Конц. ЭПС (по глюк.), г/л	1.138	6.036	7.786
Вязкость р-ра ЭПС, мм ² /с	0.787	2.737	4.561
Способность образования сгустка на молоке	+++	++	-

Примечание: «-» не образуют сгустка; «++» желеобразный сгусток; «+++» плотный не сгусток.

В культуральной жидкости при культивировании кефирных грибков на молоке достигаемые концентрации ЭПС кефирана достаточно низкие. Так при определении концентрации ЭПС в кефире «Домик в деревне» 1% жирности и

кефире собственного приготовления концентрации ЭПС была в пределах 0.05–0.2 г/л.

При измерении вязкости среды капиллярным стеклянным вискозиметром для определения уровня накопления ЭПС показана нечувствительность метода. При сравнении данных, полученных двумя методами: на основании измерения вязкости и метода осаждения ЭПС спиртом и определения концентрации фенол-серным методом [Piermaria et al., 2008] при культивировании молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* 4079 при разных условиях (совместно с дрожжами, при внесении в среду CaCO₃, изменение значений pH, соотношения углерода к азоту в среде) показано, что метод измерения вязкости может быть использован при концентрациях экзополисахаридов в среде более 1 г/л.

Таким образом, полученные данные показали возможность получения ЭПС из кефирных грибков, однако, этот способ является не технологичным, поскольку его продуктивность лимитируется низкой активностью роста кефирных грибков.

3.4.1. Скрининг полисахаридсинтезирующих молочнокислых бактерий компонентов кефирных грибков и исследование влияния источников углерода на синтез экзополисахаридов

Для определения микробных компонентов кефирных грибков способных к синтезу ЭПС на первом этапе работы был проведен скрининг микробных компонентов кефирных грибков, способных продуцировать полисахариды. Из высевок на твердые среды растертых кефирных грибков было выделено 119 изолятов бактерий, из колоний имеющих даже незначительные морфологические отличия. Первичная оценка способности выделенных изолятов к синтезу полисахаридов определялась на основании интенсивности окраски их колоний при высеве на среду с рутениевым красным, при этом также учитывалась степень ослизненности колоний. Результаты показали, что около 60% выделенных изолятов характеризовались способностью синтеза экзополисахаридов. При этом колонии 18% изолятов отличались активным синтезом экзополисахаридов.

На основании проведенного скрининга было отобрано 9 культур бактерий, способных к наиболее активному синтезу экзополисахаридов. Среди них 8 отобранных культур относились к кокковым формам и одна культура (№5) к палочковидным.

Результаты определения функциональной активности отобранных культур (образование сгустка при культивировании на молоке, активность снижения pH, титруемая кислотность) показали, что они могут быть отнесены к двум разным физиологическим группам (табл. 3.16). К первой группе относятся культуры (№№ 1–5), которые образуют плотный сгусток при росте на молоке и активно подкисляют среду. Вторая группа – культуры (№№ 6–9), не образуют сгустка при культивировании на молоке и в меньшей степени подкисляют среду. Полученные данные свидетельствуют о том, что в кефирных грибках синтезировать экзополисахариды способны микроорганизмы, относящиеся к разным физиологическим группам.

При определении активности синтеза экзополисахаридов отобранными культурами при их культивировании на жидкой среде MRS с различными источниками углерода (табл. 3.16) было показано, что культуры №№1–5, относящиеся к первой физиологической группе, синтезируют на среде с лактозой больше экзополисахаридов (0.24–0.30 г/л) по сравнению с культурами второй группы (0.08–0.20 г/л). Наиболее высокие концентрации полисахаридов 0.34 и 0.41 г/л определялись соответственно в культурах №5 и №3, относящихся к первой физиологической группе, при их культивировании на среде с галактозой.

При культивировании на среде с глюкозой не выявлены различия в активности синтеза полисахаридов культурами разных физиологических групп. Это подтверждает полученные ранее данные о присутствии в ассоциативной культуре кефирных грибков бактерий, не обладающих β -галактозидазной активностью и использующих для молочнокислого брожения преимущественно глюкозу.

Функциональная активность отобранных культур и активность синтеза ЭПС при культивировании их на среде MRS с разными источниками углерода и молочной сыворотке

Куль- ры	Функциональная активность			Концентрация ЭПС, г/л			
				Источники углерода			
	Обр-е сгустка	pH	Титр. кисл- ть, °Т	лактоза	глюкоза	галактоза	МС
1	+	4.3	89	0.30	0.18	0.12	0.11
2	+	4.4	90	0.30	0.16	0.16	0.16
3	+	4.6	78	0.24	0.21	0.41	0.19
4	+	4.5	77	0.25	0.22	0.22	–
5	+	4.6	73	0.25	0.21	0.34	0.10
6	-	5.9	36	0.13	0.20	0.12	0.16
7	-	5.8	38	0.08	0.23	0.15	0.18
8	-	6.8	16	0.16	0.03	0.03	–
9	-	6.5	21	0.20	0.16	0.03	–

Примечание: «+» – изоляты способны образовывать сгусток на молоке, «-» – не способны образовывать сгусток на молоке.

Поскольку рядом авторов показано, что активность синтеза экзополисахаридов микроорганизмами зависит от соотношения в среде культивирования углерода и азота, от используемого источника углерода. Так в частности при добавлении в молоко сахарозы, а также при повышении концентрации лактозы повышается продукция кефирана кефирными грибами [Zajsek et al., 2013].

Было исследовано влияние сахарозы на синтез экзополисахаридов изучаемыми культурами (табл. 3.17). Результаты показали, что культуры второй физиологической группы, не образующие сгустка при культивировании на молоке, активно продуцируют полисахариды на среде с сахарозой. При этом было отмечено снижение pH до 4.0 ± 0.2 . В то время, как биосинтез полисахаридов культурами первой физиологической группы остается на достаточно низком уровне, за исключением культуры №1, которая активно продуцирует ЭПС и

закисляет среду при культивировании как на среде с лактозой, так и при использовании сахарозы в качестве единственного источника углерода. При этом показано, что добавление глюкозы к среде, содержащей сахарозу, не приводило к повышению синтеза полисахаридов как данной культурой, так и другими.

Снижение концентрации сахарозы с 20 до 10 г/л при сохранении общей концентрации углеводов в среде за счет добавления глюкозы приводило к снижению концентрации продуцируемых экзополисахаридов культурами второй группы более чем на 50% и отмечалась тенденция к повышению синтеза полисахаридов культурами первой группы, кроме культуры №1. При общем повышении в среде концентрации углеводов в присутствии сахарозы в концентрации 20 г/л и глюкозы 20 г/л наблюдалось повышение синтеза полисахаридов культурами первой группы, что связано с повышением концентрации глюкозы в среде, и снижение активности синтеза полисахаридов бактериями второй группы.

Таблица 3.17

Влияние сахарозы на синтез ЭПС отобранными бактериями, г/л

Физиологич. группы	№ изолята	Источник углерода		
		Сахароза 20г/л	Сахароза 10г/л + глюкоза 10 г/л	Сахароза 20г/л + глюкоза 20 г/л
Образ. сгусток на молоке и активно подкисляют среду	1	1.81	0.76	1.19
	2	0.12	0.18	0.23
	3	0.18	0.30	0.23
	4	0.20	0.26	0.27
	5	0.10	0.16	0.22
не образ. сгусток и в меньшей степ. подкисл. среду	6	3.93	0.55	1.50
	7	2.89	0.51	1.00
	8	1.85	0.75	1.72
	9	1.09	0.48	0.54

На основании полученных результатов для дальнейшей работы были отобраны культура №1 из первой физиологической группы, как наиболее активный продуцент экзополисахаридов на среде с лактозой (до 0.30 г/л), и

культура №6 из второй физиологической группы, продуцирующая наибольшее количество экзополисахаридов на среде с сахарозой (более 4.0 г/л), соответственно идентифицированные как *Lactococcus lactis* и *Leuconostoc mesenteroides*.

При исследовании влияния концентрации сахарозы от 20 г/л до 50 г/л на синтез ЭПС культурой *L.mesenteroides* было показано, что при повышении концентрации сахарозы с 20 до 40 г/л концентрация продуцируемых ЭПС повышалась с 2.3 до 4.8 г/л (табл. 3.18). При дальнейшем повышении концентрации сахарозы до 50 г/л активность роста культуры и синтез полисахаридов снижались.

Таблица 3.18

Влияние концентрации сахарозы на синтез ЭПС культурой *L.mesenteroides*

	Конц. сахарозы, г/л			
	20	30	40	50
Конц. ЭПС, г/л	2.4	4.0	4.8	4.6
pH	4.3	4.1	4.1	4.1

Таким образом, проведенный скрининг микробных компонентов кефирных грибков, способных синтезировать полисахариды, показал, что полисахариды синтезируются разными видами молочнокислых бактерий, использующих для молочнокислого брожения как лактозу, так и глюкозу. Показано, что активность синтеза полисахаридов культурами, способными использовать сахарозу для брожения, значительно повышается при их культивировании на среде с сахарозой.

В качестве наиболее активных продуцентов полисахаридов были отобраны *L.lactis* и *L.mesenteroides* соответственно при их культивировании на среде с лактозой и на среде с сахарозой.

3.4.2. Структурные исследования экзополисахаридов из кефирных грибков и синтезированных чистыми культурами методом ИК-спектроскопии

В литературе, практически, отсутствуют данные по исследованию структуры полисахаридов, продуцируемых микробными компонентами и кефирными грибками на среде с лактозой и другими углеводами. Некоторыми авторами было высказано предположение, что при культивировании молочнокислых бактерий на среде с сахарозой синтезируется не кефиран, а декстраны [Pidoux et al., 1990]. Поэтому дальнейшие исследования были направлены на сравнение состава полисахаридов, синтезируемых культурами *L.lactis* и *L.mesenteroides* на средах с лактозой и сахарозой и кефирными грибками, культивируемыми на молоке.

Для сравнительной оценки полученных образцов экзополисахаридов был использован метод ИК-спектроскопии, который является эффективным аналитическим методом для определения функциональных групп, позволяющим получать информацию об образовании ковалентных связей в экзополисахаридах.

Результаты исследования методом ИК-спектроскопии образцов ЭПС, полученных в лабораторных условиях при культивировании *L.mesenteroides* и *L.lactis*, а также полисахаридов из кефирных грибков представлены на рис. 3.17 и в приложении II.

Группа ИК-спектров изученных образцов полисахаридов (№№1–4), исходя из наличия в них интенсивных полос поглощения в области $4000\text{--}650\text{ см}^{-1}$, позволяет судить о сложном составе изученных экзополисахаридов [Беллами, 1957].

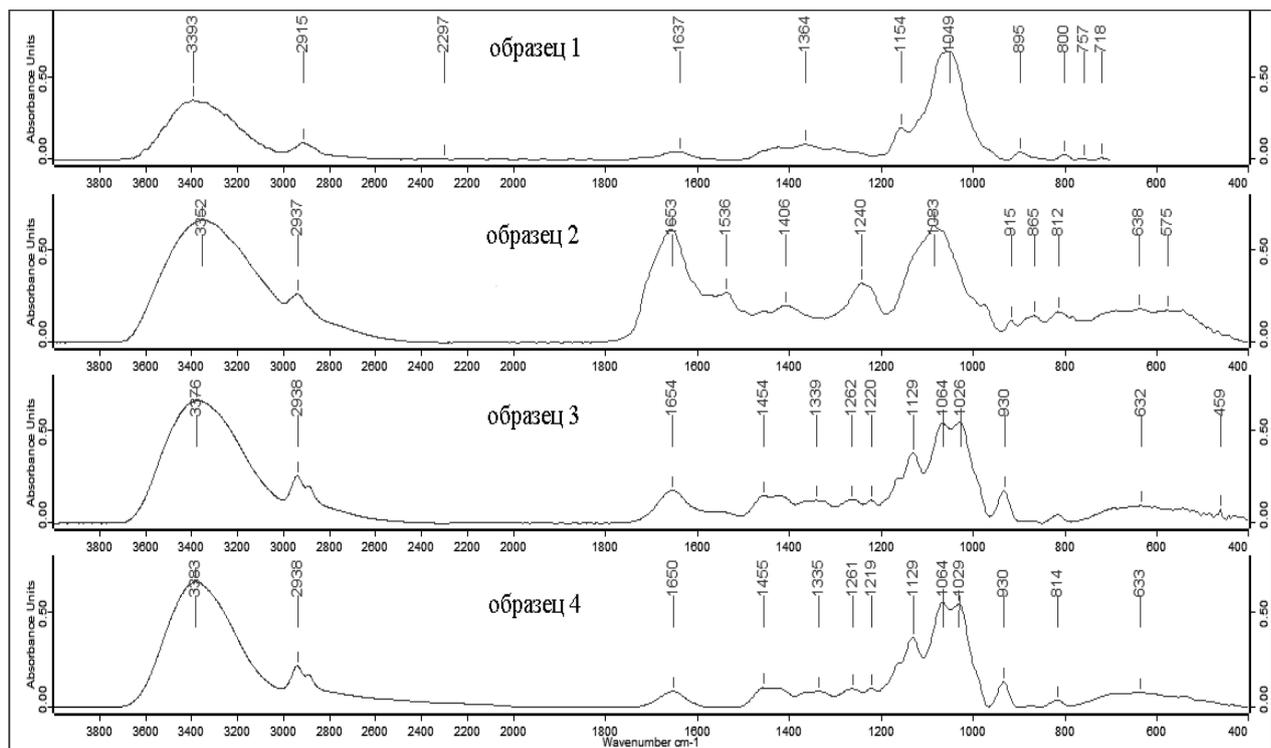


Рис. 3.17. ИК-спектры образцов:

- образец №1 – ЭПС из кефирного грибка;
- образец №2 – ЭПС, синтезированный культурой *L.lactis* на среде с лактозой;
- образец №3 – ЭПС, синтезированный культурой *L.mesenteroides* на среде с сахарозой;
- образец №4 – ЭПС, синтезированный культурой *L.lactis* на среде с сахарозой.

ИК спектры всех изученных образцов характеризовались (табл. 3.19):

- наличием широкой полосы колебаний -ОН (гидроксильных групп) в области $3600\text{--}3200\text{ см}^{-1}$, причем уширение полосы вызвано вовлечением свободных гидроксильных групп во внутримолекулярные и межмолекулярные водородные связи;

- появлением полосы поглощения в области $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$, что характерно для валентных колебаний С-Н связей;

- проявляющейся интенсивной полосой при $1600\text{--}1720\text{ см}^{-1}$, характерной для валентных колебаний, а также наличием широкого размытого поглощения, на фоне которого проявляется ряд нерезких полос поглощения, характеризующих различные колебания пиранозного кольца, связанные с СН- и СН₂- маятниковыми колебаниями;

- проявлениями асимметричных валентных колебаний С-О-С карбонильных групп в области 1150–1000 см⁻¹, что также типично для форм глюкозы и пиранозного цикла спиртовой, эфирной и фенольной групп;

- проявлениями в области полос 700–400 см⁻¹ внеплоскостных деформационных колебаний ароматического кольца и гидроксильных групп в виде размытых полос в области 850–860 см⁻¹ и 700–400 см⁻¹ и с максимумом при 580–620 см⁻¹.

Таблица 3.19

Типичные полосы поглощения образцов полученных экзополисахаридов в ИК-области

Полосы поглощения в ИК-области, см ⁻¹	• 3600-3200	• -ОН группы
	• 3000-2800	• -СН ₃ группы, СН-циклические вибрационные колебания
	• 1720-1600	• -СОСН ₃ группы, СН- и СН ₂ маятниковые колебания
	• 1150-1000	• -С-О-С- группы
	• 860-580	Внеплоскостные колебания ароматического кольца
	• 825 Альфа-сахарид	

Полосы поглощения в области 1200–850 см⁻¹ позволяют судить о наличии по крайней мере двух моносахаридов: глюкозы и галактозы, что подтверждает литературные данные о строении полисахарида кефирана.

Из сравнения экспериментально полученных ИК-спектров очевидно, что образцы экзополисахаридов (№№ 1–4), синтезированных кефирными грибами, бактериями *L.lactis*, развивающихся на среде с лактозой, бактериями *L.lactis* и *L.mesenteroides* на среде с сахарозой, по положению и интенсивности полос поглощения в ИК спектрах, практически, не отличаются.

Компьютерный библиотечный поиск соответствия ИК спектров изученных полисахаридов известным спектрам экзополисахаридов подтвердил типичную для полисахаридов структуру и показал, что все исследованные образцы являются родственными структурами. При этом, полученные ИК-спектры исследованных

образцов экзополисахаридов отличаются от ИК-спектров индивидуальных сахаров (у которых более или менее утвержденная молекулярная структура) отсутствием в спектре «тонкой структуры», что характерно и проявляется у полимеров по сравнению с исходными мономерами сахаров.

Таким образом, при использовании спектральных методов анализа было показано, что культуры *L.lactis* и *L.mesenteroides* синтезируют полисахариды, которые содержат глюкозу и галактозу, что аналогично по составу полисахаридам, синтезируемым кефирными грибами.

3.4.3. Исследование динамики роста *L.lactis* и *L.mesenteroides* и синтеза экзополисахаридов

При исследовании динамики pH среды и синтеза ЭПС при культивировании *L.lactis* и *L.mesenteroides* в микроаэрофильных условиях на молочной сыворотке и сыворотке с добавлением сахарозы в концентрации 30 г/л показано, что обе культуры синтезируют полисахариды в процессе роста (рис. 3.18 а, б).

При культивировании бактерий *L.lactis* на молочной сыворотке отмечалось активное молочнокислородное брожение (рис. 3.18 а). За 10 часов культивирования pH среды снизилось с 5.8 до 4.8, уровень синтезированных ЭПС составил 0.2 г/л. Добавление сахарозы к молочной сыворотке не оказывало влияния на закисляющую активность культуры *L.lactis* и, практически, не влияло на уровень синтезируемых полисахаридов культурой, что возможно объясняется тем, что при потреблении лактозы активно снижался pH среды, что в свою очередь ингибировало рост культуры, или возможно сахароза не использовалась одновременно с лактозой.

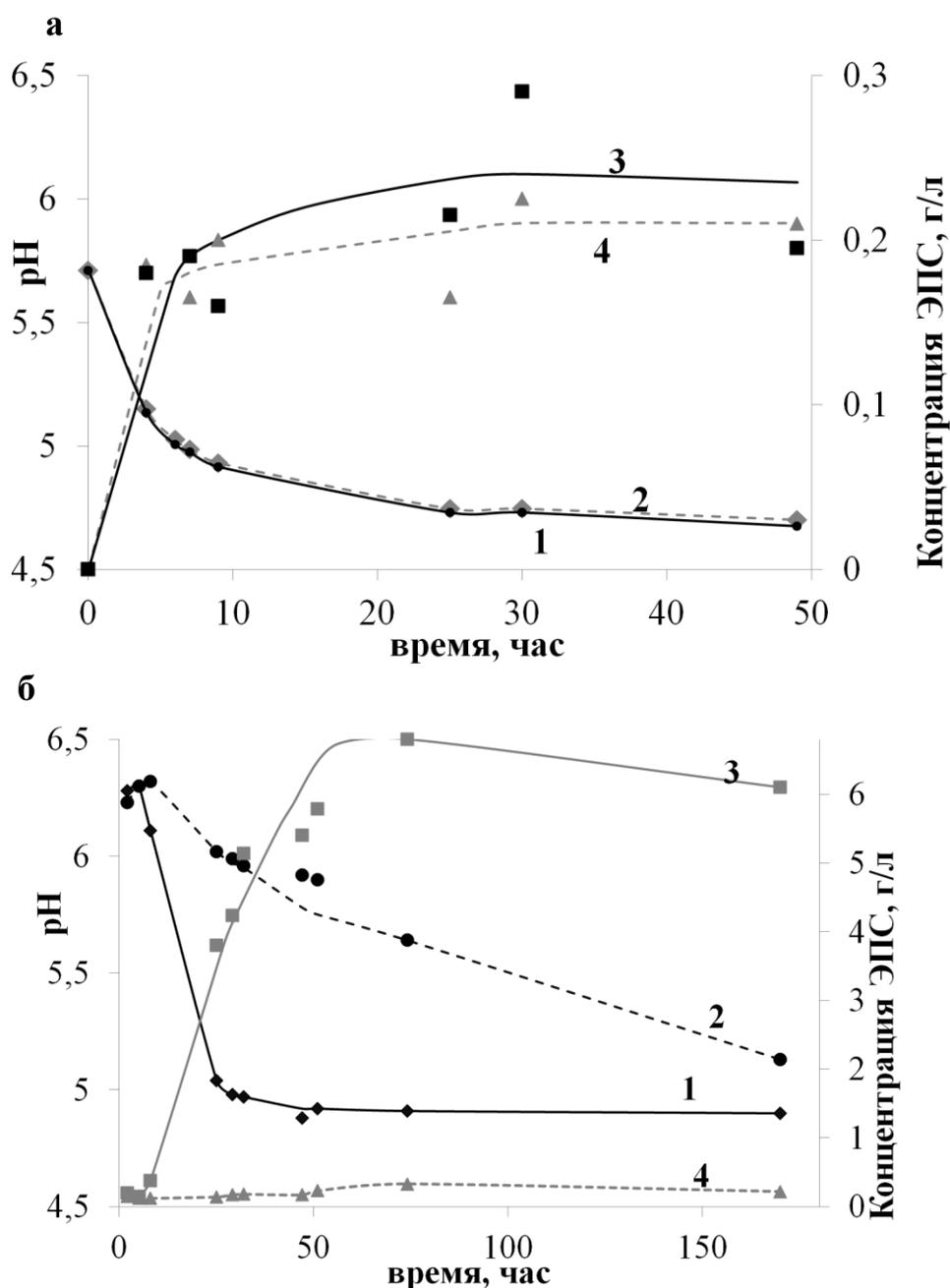


Рис. 3.18. Динамика роста и концентрации ЭПС при культивировании **а** – культуры *L.lactis*, **б** – *L.mesenteroides*, где кривые 1 и 3 соответствуют изменению рН и концентрации экзополисахаридов при культивировании на молочной сыворотке с добавлением сахарозы; кривые 2 и 4 – изменению рН и концентрации экзополисахаридов при культивировании на молочной сыворотке.

При культивировании бактерии *L.mesenteroides* на молочной сыворотке среда медленно закислялась (рис. 3.18 б), за 20 часов культивирования значения рН среды снизились с 6.2 до 5.8, концентрация экзополисахаридов в среде составляла менее 0.2 г/л. При добавлении сахарозы к молочной сыворотке активность роста культуры значительно повышалась. К 20-ому часу

культивирования рН среды снизилось с 6.2 до 5.0, концентрация синтезированных полисахаридов составляла более 6.0 г/л.

Сравнение данных культур по продуктивности получения полисахаридов показывает перспективность использования культуры *L.mesenteroides* для разработки способов получения полисахаридов. Штамм *L.mesenteroides* депонирован в ВКПМ ФГУП ГосНИИгенетика как *L.mesenteroides* 8 (В-11942) (приложение IV).

При культивировании *L.mesenteroides* в микроаэрофильных условиях в ферментере (с полезным объемом 2.5 литра) на молочной сыворотке с добавлением сахарозы в концентрации 30 г/л при снижении рН до значения 4.9 синтез ЭПС прекращался, а при доведении рН до 6.2 синтез ЭПС снова возобновлялся (рис. 3.19).

По окончании культивирования были получены следующие результаты:

Концентрация ЭПС, г/л	1.8
Концентрация молочной кислоты, г/л	2.8
Биомасса, г/л	1.81
Содержание редуцирующих олигосахаридов, г/л	29.67

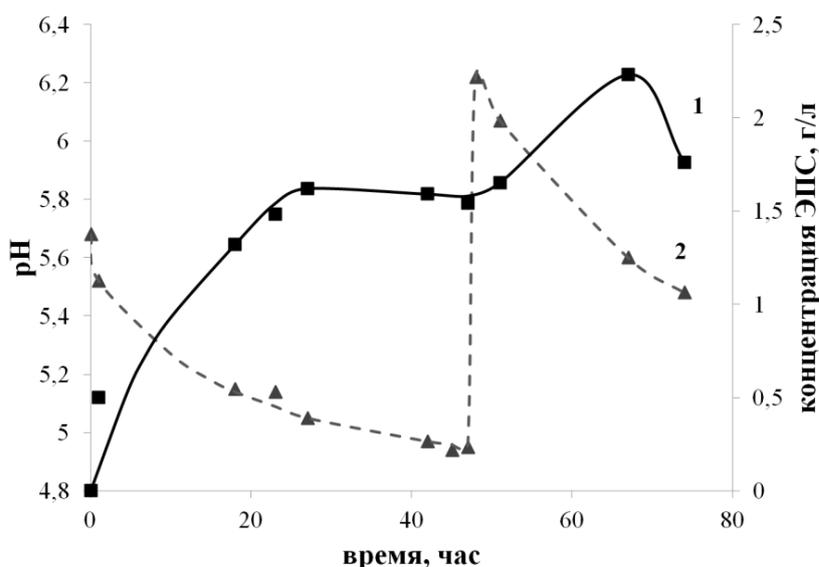


Рис. 3.19. Активность роста и синтеза экзополисахаридов бактериями *L.mesenteroides* на молочной сыворотке с добавлением сахарозы, где кривая 1 – концентрация ЭПС, г/л; 2 – значения рН среды.

Результаты проведенных исследований показали, что на функциональную активность и синтез ЭПС культурой *L.mesenteroides* большое влияние оказывает значение pH среды. В дальнейшем культивировали *L.mesenteroides* при постоянном pH среды при использовании в качестве титрующего агента 10% раствора КОН на уровне 6.0, что является оптимумом для данной культуры [Определитель бактерий Берджи]. Культивировали в микроаэрофильных условиях при слабом перемешивании при 80 об/мин (рис. 3.19).

Результаты исследований показали, что при постоянном pH среды равном 6.0 к 48 часу культивирования уровень ЭПС в среде достигал 3.4 г/л. Концентрация молочной кислоты составляла 2.7 г/л.

Аналогичность структуры полученного образца ЭПС с образцами ЭПС, синтезированными *L.lactis* и *L.mesenteroides* на среде с лактозой (на молочной сыворотке) была показана методами ИК-спектроскопии (приложение III, исследование проводили на базе ЦКП РХТУ им. Д.И. Менделеева).

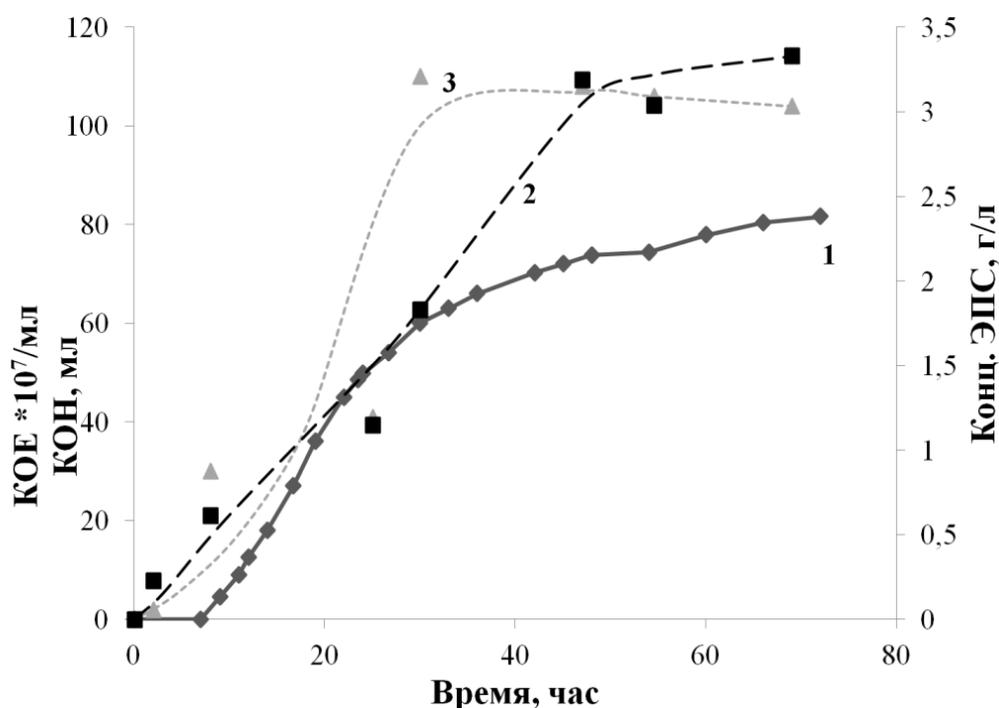


Рис. 3.20. Активность роста и синтеза экзополисахаридов бактериями *L.mesenteroides* на сыворотке с добавлением сахарозы с поддержанием pH 6.0, где кривая 1 – расход титранта КОН, мл; кривая 2 – концентрация ЭПС, г/л; 3 – КОЕ/мл.

На основании изучения динамики роста культуры *L.mesenteroides* и синтеза экзополисахаридов разработан режим периодического культивирования данных бактерий, обеспечивающий получение ЭПС в концентрации 3.4 г/л (табл. 3.20).

Таблица 3.20

Условия периодического культивирования *L.mesenteroides* на молочной сыворотке с добавлением сахарозы

Состав среды культивирования	молочная сыворотка с доб. 30 г/л сахарозы
рН среды	6.0
Температура, t ⁰	30°С
Перемешивание	80 об/мин
Количество посевного материала	~5.5–10 · 10 ⁸ КОЕ/мл (10%)
Время культивирования	48–50 час
Метод выделения ЭПС	Осаждение этанолом

В соответствии с разработанным лабораторным режимом (табл. 3.20) проведено культивирование *L.mesenteroides* на модифицированной среде с сахарозой в концентрации 40 г/л (рис. 3.21).

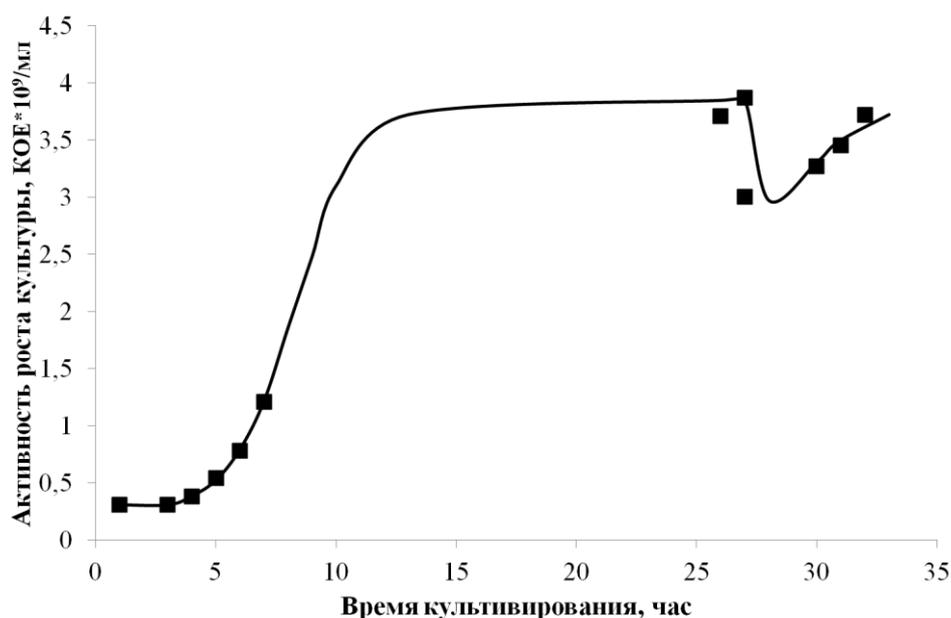


Рис. 3.21. Динамика роста культуры *L.mesenteroides* на модифицированной среде MRS с сахарозой

Сравнительная оценка активности роста культуры *L.mesenteroides* на модифицированной среде MRS с сахарозой в концентрации 40 г/л и на молочной сыворотке с добавлением сахарозы показала более высокую активность роста

культуры на модифицированной среде MRS. При этом были получены сравнимые показатели концентраций ЭПС, 3,64 г/л и 3,4 г/л на модифицированной среде MRS и молочной сыворотке с сахарозой, соответственно.

После 27ч культивирования из ферментера отбирали 1 л культуры и добавили 1 л свежей среды (рис. 3.21). При таком отъемно-доливном режиме, практически, не наблюдалось снижения активности роста культуры. По полученным данным была рассчитана удельная скорость роста культуры, равная $0,368 \text{ ч}^{-1}$.

Проведенные исследования показали, что ЭПС синтезируются молочнокислыми бактериями в процессе их роста, что дает основания полагать о возможности осуществления процесса синтеза ЭПС в непрерывных условиях. С этой целью было проведено культивирование культуры *L.mesenteroides* отъемно-доливным способом для определения удельной скорости роста и скорости протока среды в ферментере. Динамика роста культуры при данном режиме культивирования представлена на рис. 3.22.

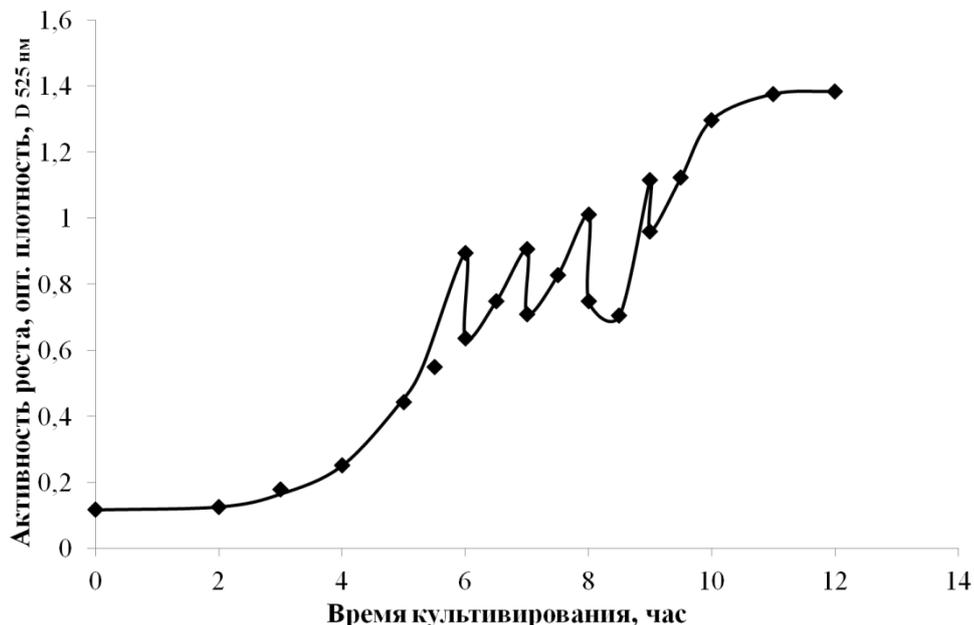


Рис. 3.22. Динамика роста культуры *L.mesenteroides* на модифицированной среде MRS с сахарозой при отъемно-доливном режиме.

При таком режиме культивирования активность роста культуры сохранялась, значения удельной скорости роста культуры были примерно равны

0.35 ч⁻¹. Полученные результаты являются основой для разработки непрерывного процесса культивирования *L.mesenteroides* для получения ЭПС (табл. 3.21).

Таблица 3.21

Предлагаемый непрерывный режим культивирования *L. mesenteroides*

Состав среды культивирования	Модифицированная среда MRS
рН среды	6.0
Температура, t ⁰	30 ⁰ С
Перемешивание	80 об/мин
Количество посевного материала	~ 3.5 · 10 ⁹ КОЕ/мл (10%)
Скорость протока (D)	~ 0.35 ч ⁻¹
Метод выделения ЭПС	Осаждение этанолом

ЭПС, синтезированные *L.mesenteroides*, были выделены из культуральной жидкости осаждением этанолом и высушены при использовании лиофильной сушки. Масса полученного лабораторного образца ЭПС составила ~16.5 г.

Полисахариды из кефирных грибков получали осаждением этанолом из воды после их нагревания и лиофильно высушивали. Масса полученного лабораторного образца ЭПС составила ~2 г.

3.4.4. Исследование свойств ЭПС, синтезированных чистой культурой *L. mesenteroides* и выделенных из кефирных грибков

По литературным данным известно, что полисахариды, образуемые кефирными грибками, обладают высокой биологической активностью и могут быть использованы в различных отраслях. Функциональная активность полисахаридов определяется не только их составом, но и другими физическими характеристиками, в частности их молекулярной массой. В связи с этим была проведена сравнительная оценка молекулярной массы и термодинамических параметров ЭПС, синтезированных *L. mesenteroides* и кефирными грибками, методом динамического и статистического светорассеивания на базе ИБХФ им. Н. М. Эмануэля РАН (табл. 3.22).

Полученные результаты показали, что полисахариды кефирных грибков (образец 1) и полисахариды, синтезированные *L. mesenteroides* (образец 2), имеют сходные значения молекулярных масс, однако отмечены некоторые различия полученных ЭПС. Так полисахарид *L. mesenteroides* имеет большее значение сродства к растворителю (вариабельный коэффициент A_2) и довольно высокую плотность, что могло бы свидетельствовать, о возможности образования ассоциатов этим ЭПС. Поэтому для определения молекулярной массы отдельных молекул ЭПС необходимо было разрушить ассоциаты. Для этого исследуемый образец был растворен в 50% растворе диметилсульфоксида (ДМСО) (образец №3), который разрушает все связи, кроме ковалентных. После обработки полисахарида ДМСО проводили аналогичные измерения. Результаты показали значительное снижение молекулярной массы этого образца ($2.3 \cdot 10^6$ Да) по сравнению с образцом, который не был растворен в ДМСО, то есть подтвердилось предположение о том, что ЭПС, синтезированный культурой *L. mesenteroides*, образует надмолекулярные ассоциаты.

Таблица 3.22

Молекулярные и термодинамические параметры ЭПС, синтезированных культурой *L. mesenteroides* и выделенных из кефирных грибков

ЭПС	$M_w \times 10^{-6}$ (Да)	$A_2 \times 10^5$ (см^3 моль г^{-2})	R_G (нм)	R_h (нм)	$\rho = R_G / R_h$	$d \times 10^3$ (г см^3)
ЭПС КГ (образец №1)	9.6	1.04	172	94.2	1.83	0.75
ЭПС <i>L. mesenteroides</i> (образец №2)	8.94	1.3	66.4	40.2	1.65	12.12
ЭПС <i>L. mesenteroides</i> (раств-ый в ДМСО) (образец №3)	2.29	1.97	81.7	97.5	0.84	1.66

Примечание: R_h – гидродинамический радиус; R_G - радиус инерции; d -средний диаметр молекул полимера.

Исходя из величины структурного параметра ρ , показывающего отношение гидродинамического радиуса к радиусу инерции, можно сделать вывод, что

экзополисахарид, синтезированный *L. mesenteroides* (образец №2) обладает сферической формой, что может влиять на его функциональную активность.

Исходя из полученных данных, можно полагать, что функциональная активность полисахаридов *L. mesenteroides* может отличаться от полисахарида кефирана из кефирных грибков. Что было подтверждено при исследовании способности образовывать полученными ЭПС полимерных пленок, поскольку в литературе имеются данные о возможности использования кефирана из кефирных грибков для получения биоразлагаемых пленок. Для приготовления биоразлагаемых пленок на основе полученных образцов экзополисахаридов в качестве пластификатора использовали глицерин. Использование глицерина обусловлено тем, что он является наиболее распространенным пластификатором в производстве деградируемых пленок [Piermaria et al., 2009; 2011; Ghasemlou et al., 2011]. В результате было показано, что пленки, полученные из кефирана, выделенного из кефирных грибков, по своим физическим свойствам отвечали требованиям, предъявляемым к таким пленкам.

Тогда как полисахарид, синтезированный чистой культурой *L. mesenteroides*, не образовывал пленок. Вероятнее всего это связано с его свойством образовывать ассоциаты сферической формы, что затрудняет образование полимерной структуры при создании пленок.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ЭПС, синтезированные чистой культурой *L. mesenteroides*, могут быть использованы для других целей (в фармацевтической, косметической, пищевой промышленности).

ВЫВОДЫ:

1. Исследована динамика роста и морфофизиологические свойства кефирных грибков, используемых на разных производствах. Не выявлено различий их функциональных свойств, отмечены различия их размеров и упругости, что учитывалось при растирании кефирных зерен при исследовании состава их микробного сообщества.

2. При использовании классических микробиологических методов с выделением чистых культур и их идентификации методом 16S рРНК определены доминирующие формы молочнокислых бактерий исследованных кефирных зерен: *L.lactis*, *L.mesenteroides*, *L.plantarum*, *L.sakei*, *Lactobacillus sp.* При этом выявлена трудность определения микробного профиля молочнокислых бактерий при использовании методов с выделением чистых культур ввиду мелкого размера схожих по морфологии их колоний и устойчивых симбиотических отношениях с дрожжами.

3. При сравнительной оценке микробного профиля кефирных грибков, используемых на разных молочных производствах (КГС, КГГ, КГМ), и культуральных жидкостей (заквасок) при их культивировании на молоке при использовании метода денатурирующего градиентного геля электрофореза (DGGE) (без выделения чистых культур) не выявлено различий в микробном составе доминирующих форм микроорганизмов.

4. При исследовании трофических взаимоотношений микробных компонентов кефирных грибков:

- выявлено присутствие двух физиологических групп молочнокислых бактерии (исследовано 33 изолята). Бактерий, обладающих β -галактозидазной активностью, использующих лактозу для молочнокислого брожения; и бактерий, не обладающих β -галактозидазной активностью, активно использующих глюкозу и галактозу для молочнокислого брожения;

- показано, что выделенные дрожжи (55 изолятов) не обладали β -галактозидазной активностью, для спиртового брожения не использовали лактозу, а активно использовали глюкозу и с низкой активностью галактозу.

5. При исследовании микробного профиля и функциональной активности кефирных грибков, длительное время (более 4-х лет) культивируемых на молоке, не содержащем лактозы, не выявлено элиминирования из системы микроорганизмов, использующих лактозу. Не выявлено различий в микробном профиле и функциональной активности по сравнению с кефирными зёрнами, культивируемыми на нативном молоке. Это свидетельствует о роли индуцибельного фермента β -галактозидазы в саморегуляции активности микробного сообщества кефирных грибков.

6. Результаты скрининга микробных компонентов кефирных грибков (исследовано 119 изолятов), синтезирующих экзополисахариды, показали способность синтеза экзополисахаридов разными видами молочнокислых бактерий обеих физиологических групп. Отмечено повышение активности синтеза экзополисахаридов на среде с сахарозой молочнокислыми бактериями, способными сбраживать сахарозу.

Отобраны культуры *L.lactis* и *L.mesenteroides*, как наиболее активные продуценты экзополисахаридов при культивировании их, соответственно, на среде с лактозой и сахарозой.

7. При исследовании динамики роста и синтеза экзополисахаридов культурами *L.lactis* и *L.mesenteroides* показано, что ЭПС синтезируются в процессе их роста. При использовании спектральных методов анализа установлено, что экзополисахариды, синтезируемые отобранными культурами, аналогичны по структуре экзополисахариду кефирану, синтезируемому кефирными грибками. А при использовании метода динамического и статистического светорассеивания показаны различия по их молекулярной массе.

8. Разработаны режимы периодического и непрерывного культивирования культуры *L.mesenteroides* на молочной сыворотке с сахарозой и модифицированной среде MRS с сахарозой, обеспечивающие уровень накопления ЭПС в среде до 3.5 г/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование закономерностей формирования и функционирования консорциумов микроорганизмов, являющихся основной формой существования микроорганизмов в природе, является актуальным не только для познания разнообразия закономерностей объединения микроорганизмов в ассоциативные культуры, но и для реализации промышленного потенциала используемых в практике консорциумов микроорганизмов, разработки способов их управления, а также для создания новых промышленно значимых консорциумов.

В работе в качестве объекта исследований для построения концептуальной модели, включающей изучение микробного профиля и потока веществ (основного ресурса) между компонентами, была использована эволюционно сложившаяся, функционально стабильная ассоциативная культура кефирных грибков, широко используемая в практических целях.

Результатом широких многолетних исследований кефирных грибков определена трофическая цепь метаболизма лактозы в кефирных грибах, отражающая вертикальную структуру сообщества, которая включает метаболизм лактозы в микроаэрофильных условиях содержащими эндо фермент β -галактозидаза молочнокислыми бактериями, с образованием молочной кислоты, используемой дрожжами в спиртовом брожении с образованием этилового спирта, окисляемого уксуснокислыми бактериями до уксусной кислоты в аэробных условиях. Авторами показаны симбиотические взаимоотношения молочнокислых бактерий и дрожжей, экстрацеллюлярные продукты метаболизма и автолиза которых являются факторами роста для молочнокислых бактерий [Феофилова, 1958; Хамнаева, 1987; Тулемисова, 2002; Артюхова, 2006 и др.].

Однако авторами описано большое разнообразие молочнокислых бактерий и дрожжей, выделяемых из кефирных грибков, используемых на разных производствах [Lopitz-Otsoa et al., 2006; Farnworth, Mainville, 2008], на основании чего можно было бы предполагать, что кефирные грибки являются системой, разные микробные структуры которой обладают одинаковыми функциями. При этом в каждой функциональной группе микроорганизмов, представленной

многими видами, в зависимости от условий одна и та же функция могла выполняться разными видами в соответствии с их эконическими. Устойчивость данной системы могла бы характеризоваться принципом дублирования, при котором возможна утрата структурных единиц до определенного предела, не приводящая к изменению функции [Lawton et al., 1994].

Однако представленные в литературе данные не дают оснований для подтверждения данного положения. Остается нерешенным вопрос о продуценте данной системы, о роли дрожжей в системе кефирных грибков, не выявлены горизонтальные трофические цепи, среди видов одного трофического уровня, особенно молочнокислых бактерий, являющихся основным микробным компонентом системы, определяющим ее функциональную активность.

При анализе литературных данных определения микробного состава кефирных грибков, проведенных в разные годы, следует учитывать трудности их интерпретации, в частности, необходимо учитывать используемые авторами методы идентификации выделенных чистых культур молочнокислых бактерий, поскольку многими авторами отмечается не только большое фенотипическое сходство их разных видов, но и близкое их генетическое родство [Королева, 1974; Елинов, Ларина, 1999; Ботина, 2011; Симон, 2009; Farnworth, Mainville, 2008].

В связи с этим, в данной работе в качестве основы для определения микробного профиля молочнокислых бактерий кефирных грибков и продуцента системы было использовано изучение функционального потенциала, выделенных микроорганизмов, и метода сравнительного определения микробного профиля кефирных грибков «без выделения чистых культур». Для определения трофических закономерностей использования лактозы микробными компонентами кефирных грибков все исследования проводились при культивировании кефирных грибков на молоке только при изменении содержания в нем основного ресурса, поступающего в систему, лактозы, или полной ее замены продуктами ферментативного ее гидролиза.

Описанные авторами [Postma, Roseman, 1976; Hickey et al., 1986; Thompson et al., 1985; Молотов и др., 1994] возможные пути метаболизма лактозы

микроорганизмами, а также экспериментальные результаты, полученные в данной работе, показывают возможность частичного поступления в окружающую среду продуктов ферментативного гидролиза лактозы, глюкозы и галактозы, что обосновывает возможность формирования в системе кефирных грибов горизонтальной трофической цепи на основе метабиотических взаимоотношений. Это положение было подтверждено определением присутствия в кефирных грибах двух физиологических групп молочнокислых бактерий, обладающих β -галактозидазной активностью и использующих лактозу для молочнокислого брожения и группы бактерий, использующих только глюкозу для молочнокислого брожения.

Выделенные дрожжи не обладали β -галактозидазной активностью, не использовали лактозу для спиртового брожения, а осуществляли активное спиртовое брожение при использовании глюкозы и с низкой активностью при использовании галактозы.

Длительное культивирование кефирных грибов (более 4-х лет) на молоке, не содержащем лактозу, а только продукты ее гидролиза, не привело к элиминированию из системы микробного компонента, способного использовать только лактозу для молочнокислого брожения. При этом микробный профиль, функциональная активность кефирных грибов и активность синтеза полисахаридов данных кефирных грибов не отличались от кефирных грибов, культивируемых на нативном молоке, содержащем лактозу. Исследования показали, что микроорганизмы, синтезирующие индуцибельный фермент β -галактозидаза при отсутствии в среде лактозы, переходят на использование глюкозы для молочнокислого брожения, что определяет роль этого фермента в стабилизации функциональной активности микробной системы кефирных грибов. Роль индуцибельного фермента в функциональной активности молочнокислых бактерий подтверждается полученными нами данными о сохранении активности молочнокислого брожения при переносе кефирных грибов и отдельных молочнокислых бактерий, культивируемых на молоке, содержащем лактозу на молоко, не содержащее лактозу и обратно. Это

подтверждается также результатами, полученными рядом авторов об активности молочнокислого брожения при культивировании на молоке культур молочнокислых бактерий, выделенных с листьев растений [Рамонова и др., 2008]. Представленные в работе результаты исследований явились основой для разработки концептуальной модели ассоциативной культуры кефирных грибков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова А.А. Разработка закваски для йогурта, обладающей низкой постокислительной активностью и продуцирующей экзополисахариды. Автореф. дис. на соиск. уч. ст. к.т.н.: Москва – 2013. – 26 с.
2. Артюхова С.И. Научно-экспериментальное обоснование новых биотехнологий синбиотических молочных продуктов. Автореф. дис. на соиск. уч. ст. д.т.н.: Улан-Удэ – 2006. – 44 с
3. Артюхова С.И. Использование пробиотиков и пребиотиков в биотехнологии производства биопродуктов / С.И. Артюхова, Ю.А. Гаврилова. – Омск: Изд-во ОмГТУ. – 2010. – 112 с.
4. Артюхова С.И. Изучение синтеза экзополисахаридов молочнокислыми палочками при различных температурах культивирования / С.И. Артюхова, Е.В. Моторная // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 6 – С. 80.
5. Бартон Д. Общая органическая химия. Т.11. Липиды, углеводы, макромолекулы, биосинтез / Д. Бартон, У.Д. Оллис. – М.: Химия, 1986. –736 с.
6. Беллами Л. Инфракрасные спектры молекул. – М.: Издательство иностранной литературы, 1957. – 444 с.
7. Бондаренко В.М. Пробиотики и механизмы их лечебного действия / В.М. Бондаренко, Р.П. Чупринина, Ж.И. Аладышева и др. // Экспериментальная клиническая гастроэнтерология. – 2004. – №3. – С.83–87.
8. Ботвинко И.В. Экзополisahариды сапротрофных микобактерий и условия их биосинтеза. Автореф. дис. на соиск. уч. степ. к.б.н. М.: Биологический факультет МГУ. – 1984.
9. Ботина С.Г. Использование штаммов молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды, в производстве кисломолочных продуктов питания / С.Г. Ботина, И.В. Рожкова, В.Ф. Семенихина // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2010. – № 1. – С. 38– 40.
10. Ботина С.Г. Штаммы *Streptococcus thermophilus*, продуцирующие экзополисахариды / С.Г. Ботина, И.В. Рожкова, В.Ф. Семенихина // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2010. – №2. – С. 33–35.

11. Ботина С.Г. Молекулярно биологические подходы к отбору бактериальных культур при создании заквасок для биотехнологии. Автореф. дис. на соиск. уч. степ. д.б.н.: Москва – 2011. – 46 с.
12. Ганина В.И. β -галактозидазная активность молочнокислых бактерий и бифидобактерий / В.И. Ганина, Л.В. Калинина, Е.В. Большакова // Молочная промышленность. – 2002. – №8. – С. 36–37.
13. Ганина В.И. Плазмидный профиль штаммов молочнокислых бактерий, продуцирующих экзополисахариды / В.И. Ганина, Т.В. Рожкова, М.А. Тренина, Ю.А. Рыбаков // Известия вузов. Пищевая технология. – 2005. – №4. – С. 37–39.
14. Ганина В.И. Анализ зарубежных исследований в области молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды / В.И. Ганина, Т.В. Рожкова // Изв. вузов. Пищ. технол. – 2005. – № 5–6. – С. 65–66.
15. Ганина В.И. Интегрированный подход к созданию отечественных стартовых культур прямого внесения / В.И. Ганина, Н.В. Ананьева, Т.В. Рожкова // Молочная промышленность. – 2005. – № 11. – С. 23–24.
16. Гейс А. Бактериоцины молочнокислых бактерий / А. Гейс, Е. Ринг, М. Тойбер // XXI Международный молочный конгресс. Краткие сообщения. Т. 1. Кн. 2. – М., 1982. – С. 222–223.
17. ГОСТ Р 52093 – 2003. Действующий стандарт на кефир
18. Градова Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н.Б. Градова, Е.С. Бабусенко, И.Б. Горнова. – М.: ДеЛи принт, 2004. – 144 с.
19. Дерябин В.В. Кислый экзополисахарид облигатно-метилотрофных бактерий *Methulobacillus methulophilus* ВСБ-792 (ЦМППМ-В-1946) / В.В. Дерябин, Л.А. Старухина, А.И. Усов, С.В. Яроцкий // Биотехнология. – 1986. – №5. – С. 22–27.
20. Дидух Н.А. К вопросу производства ферментированных молочных напитков диабетического назначения / Н.А. Дидух, Н.А. Могиланская // Молочна промисловість. – 2008. – №3 (46). – С. 44–47.
21. Елинов Н.П. Микробиота природной ассоциации «Тибетский рис» / Н.П. Елинов, О.Г. Ларина // Проблемы медицинской микологии. – 1999. – Т.1. – №1. – С. 51–56.
22. Еникеев Р.Р. Влияние условий накопления бактериальных полисахаридов при производстве кефира / Р.Р. Еникеев, Д.Н. Бобошко, А.В. Зимичев // Известия вузов. Пищевая технология. – 2010. – № 5–6. – С. 17–19.

23. Еникеев Р.Р. Описание, биосинтез и биологическое действие полисахарида кефирных грибов – кефирана / Р.Р. Еникеев // Биофармацевтический журнал. – 2011. – Т. 3. – №3. – С. 11–18
24. Еникеев Р.Р. Разработка технологии производства кефира с повышенным содержанием полисахарида кефирана. Автореф. дис. на соиск. уч. степ. к.т.н.: Самара – 2011. – 19 с.
25. Еремина И.А. Учебное пособие Микробиология молока и молочных продуктов. – Кемерово, 2004. – 80 с.
26. Еремина О.Ю. Кисломолочные напитки с крупяными концентратами / О.Ю. Еремина, Т.Н. Иванова // Пищевая промышленность. – 2009. – №3. – С. 55–56.
27. Журина М.В. Визуализация внеклеточного полимерного матрикса биопленок *Chromobacterium violaceum* с помощью микроскопических методов / М.В. Журина, Н.А. Кострикина, Е.Ю. Паршина, Е.А. Стрелкова, А.И. Юсипович, Г.В. Максимов, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – №4. – С. 502–509.
28. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. – М.: Наука, 2003. – 348 с.
29. Зигангирова Н.А. Роль молочнокислых бактерий в распространении генов лекарственной устойчивости среди здоровых людей / Н.А. Зигангирова, Е.А. Токарская, Б.С. Народницкий, А.Л. Гинцбург, В.А. Тутельян // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – №2. – С. 106–109.
30. Зипаев Д.В. От чего зависит состав кефирных грибов / Д.В. Зипаев, Е.Ю. Руденко, А.В. Зимичев // Молочная промышленность. – 2008. – № 3. – С. 56–58.
31. Кадырова Р.Г. Тонкослойная хроматография. Идентификация и разделение углеводов, витаминов и токсичных соединений. – Казань: Казанский гос. энергетический ун-т, 2010. – 95 с.
32. Каллистова А.Ю. Изучение микробного сообщества активных илов Московских очистных сооружений / А.Ю. Каллистова, Н.В. Пименов, М.Н. Козлов, Ю.А. Николаев, А.Г. Дорофеев, В.Г. Асеева, В.А. Грачев, Е.В. Менько, Ю.Ю. Берестовская, А.Н. Ножевникова, М.В. Кевбрина // Микробиология. – 2014. – Т. 83. – № 5. – С. 615–625.
33. Касаткина А.Н. Способы повышения биологической ценности зерновой дробины / А.Н. Касаткина, Е.А. Лещина, Н.Б. Градова // Комбикорма. – 2008. – №5. – С. 51–52.

34. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования/ Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука. – 1975. – 384 с.
35. Козырева И.И. Видовое разнообразие микрофлоры кефирных грибков в Северной Осетии и практическое использование ее представителей. Автореф. дис. на соиск. уч. степ. к.б.н.: Владикавказ – 2011. – 23 с.
36. Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем // Пер. с нем. –М.: Мир, 2000. – 469 с.
37. Королев С.А. Основы технической микробиологии молочного дела. – М.: Пищевая промышленность, 1974. – 344 с.
38. Котова И.Б. Анаэробные микробные сообщества, разрушающие азокрасители и их производные. Автореф. дис. на соиск. уч. степ. д-ра биол. наук.: Москва – 2013. – 50 с.
39. Кочетков Н.К. Химия углеводов / Н.К. Кочетков, А.Ф. Бочков, Б.А. Дмитриев, А.И. Усов, О.С. Чижов, В.Н. Шibaев. – М.: Химия, 1967. – 672 с.
40. Ларина О.Г. Микробиология природной ассоциации «Тибетский рис». Автореф. дис. на соиск. уч. степ. к.б.н.: Санкт-Петербург – 2000. – 25 с.
41. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функций клетки / Пер. с англ. Под ред. А.А. Баева, Я.М. Варшавского. – М.: Мир, 1976. – 960 с.
42. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1967. – 436 с.
43. Молотов С.В. Получение и свойства мутантов молочнокислых стрептококков, дефектных по способности к утилизации глюкозы / С.В. Молотов, Р.А. Алхимова, Н.В. Пименова, В.В. Суходолец // Биотехнология. – 1994. – №11–12. – С. 9–12.
44. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд. Центр «Академия», 2005. – 608 с.
45. Никитин В.М. Химия древесины и целлюлозы / В.М. Никитин, А.В.Оболенская, В.П. Щеголев. – М.: Лесная промышленность, 1978. – 368 с.
46. Новокшенов А. А. Клиническая эффективность и воздействие на микробиоценоз кишечника пробиотика Аципол в комплексной терапии острых кишечных инфекций у детей / А.А. Новокшенов, Н.В. Соколова, Т.В. Бережкова, А.А. Сахарова, Т.С. Ларина // Педиатрия. – 2007. – Т. 86. – №. 2. – С. 87-92.

47. Олескин А.В. Технологическая биоэнергетика / А.В. Олескин В.Д. Самуилов. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 192 с.
48. Определитель бактерий Берджи. Т. 1: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997.– 432 с.
49. Определитель бактерий Берджи. Т. 2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997.– 368 с.
50. Панкрушина А.Н. Биотехнологические и биохимические пути изучения механизмов регуляции биосинтетических, ростовых и коммуникационных процессов бактериальных клеток. Автореф. дис. на соиск. уч. степ. д.б.н.: Москва – 2002. – 45 с.
51. Пат. 2450021 РФ /Способ получения кефирана / Еникеев Р.Р., Зимичев А.В., Кашаев А.Г., Пащенко Д.И. // Патентообладатель ГОУ ВПО «Самарский государственный технический университет». № 2010104593/13; заявл. 09.02.2010; опубл. 10.05.2012. бюл. №13.
52. Пахомов Ю.Д. Экспериментальный подход к получению некультивируемых клеток *L.lactis* / Ю.Д. Пахомов, С.К. Белусь, Л.П. Блинкова, Л.Г. Стоянова, Е.А. Устюгова // Материалы международной конференции «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2011. – М.: Макс Пресс. – Т. 2. – С. 21–25.
53. Петрушевский В.В. Производство сахаристых веществ / В.В. Петрушевский, Е.Г. Бондарь, Е.В. Винокурова. – К.: Урожай, 1989. – 168с.
54. Петухова Е.В. Микробиология пищевых производств: учебное пособие / Е.В. Петухова, А.Ю. Крыницкая, Л.Э. Ржечицкая. – Казань: Изд-во Казан. гос. технол. ун-та, 2008. – 152 с.
55. Потапов А.Г. Биоразлагаемые полимеры – вперед в будущее / А.Г. Потапов, В.Н. Пармон // Экология и промышленность. – 2010. – №5. – С. 4–8.
56. Прудникова С.В. Экологическая роль полигидроксиалканоатов – аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами / С.В. Прудникова, Т.Г. Волова. – Красноярск: Красноярский писатель, 2012. – 184 с.
57. Рамонова З.Г. Напитки на основе молочной сыворотки / З.Г. Рамонова, Р.Г. Кабисов, Б.Г. Цугкиев // Молочная промышленность. – 2008. – №11. – С. 55.

58. Рожкова Т.В. Биотехнология стартовых культур на основе молочнокислых бактерий, синтезирующих полисахариды. Дис. на соиск. уч. степ. к.т.н. / 05.18.07 / Москва – РГБ. – 2006. – 159 с.
59. Рябцева С.А. Исследование процесса культивирования кефирных грибков / С.А. Рябцева, М.В. Маловичко // Материалы 2-ой Всероссийской научно-технической конференции «Современные достижения биотехнологии». – Ставрополь. – 2002. – Т. 2. – С. 128.
60. Свирежев Ю.М. Устойчивость биологических сообществ / Ю.М. Свирежев, Д.О. Логофет. – М.: Наука, 1978. – 352 с.
61. Сетров М.И. Организация биосистем. – Л.: Наука, 1971. – 275 с.
62. Симон Н.А. Биотехнологические аспекты внутривидовой вариативности молочнокислых бактерий. Дис. на соиск. уч. степ. к.б.н.: Москва – 2009. – 152 с.
63. Синтез олигосахаридов по обращенной реакции гидролиза, катализируемой бета-галактозидазой, при высоких концентрациях субстрата и температуре / *Biotechnology Letters*. – 1987. – Vol. 9. – N.4 – P. 243–248. // Микробиологическая промышленность за рубежом. Экспресс-информация. – 1987. – вып. 21. – С. 22–23.
64. Советский энциклопедический словарь // Гл. ред. А. М. Прохоров. 4-е изд. – М. – Сов. Энциклопедия. – 1986. – 1600 с., ил.
65. Стоянова Л.Г. Новые бактериоцины лактококков и их практическое использование. Дис. на соиск. уч. степ. д.б.н.: Москва – 2008. – 399 с.
66. Сухих О.А. Получение препарата грибной β -галактозидазы для коррекции лактозной недостаточности. Дисс. на соиск. уч. степ. к.б.н.: Москва – 2007. – 177 с.
67. Тихомирова О.М. Противогрибковая активность микроорганизмов природной ассоциации «тибетский рис» / О.М. Тихомирова, Е.А. Иванова // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т.13. – № 4. – С. 39–42.
68. Тихомирова О.М. Антагонизм микроорганизмов природной ассоциации «тибетский рис» в отношении некоторых мицелиальных грибов / О.М. Тихомирова, Е.А. Иванова // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т.15. – № 3. – С. 55–59.

69. Тулемисова Ж.К. Микробиологические основы создания и использования биопрепаратов пробиотического действия. Дисс. на соиск. уч. степ. д.б.н.: Республика Казахстан, Алматы – 2002. – 210 с.
70. Устюгова Е.А. Изучение антибиотического комплекса, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 вариант - К / Е.А. Устюгова, Г.Б. Федорова, Г.С. Катруха, Л.Г. Стоянова // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – №5. – С. 644–650.
71. Феофилова Е.П. Микрофлора кефирного зерна // Микробиология. – 1958. – Т. 27. – № 2. – С. 229–234.
72. Фильчакова С.А. Разработка технологии получения биомассы кефирных грибков с целью использования ее в производстве кисломолочных продуктов. Дис. на соиск. уч. степ. к.т.н.: Москва – 1999. – 134 с.
73. Фильчакова С.А. Влияние режимов культивирования кефирной закваски на видовой состав микрофлоры / Фильчакова С.А. // Сб. науч. тр. Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ-75 лет): М, 2004. – С. 316–323.
74. Фильчакова С.А. Микробиологический состав кефирных грибков и кефирной закваски / С.А. Фильчакова // Переработка молока. – 2005. – №7. – С. 28.
75. Хамагаева И.С. Подбор условий культивирования симбиотической закваски для производства кефира / И.С. Хамагаева, Е.В. Ванданова // Пища. Экология. Качество: тр. 4 междунар. науч.-практ. конф. СО РАСХН, ГНУ СибНИПТИП. Новосибирск, 2004. – С. 95–98.
76. Хамнаева Н. И. Кефирные грибки, особенности культивирования, микробный состав, разновидности. // Молочная промышленность. – 1987. – №7. – С.49.
77. Хамнаева Н.И. Способ получения кисломолочного напитка из сыворотки / Н.И. Хамнаева, А.М. Шалыгина, В.Ж. Циренов // Известия вузов. Пищевая технология. – 2000. – №4. – С. 118.
78. Хамнаева Н.И. Научные и практические основы использования биотехнологических свойств кефирных грибков. Автореф. дис. на соиск. уч. степ. д.т.н.: Москва – 2001. – 47 с.
79. Хамнаева Н.И. Исследование свойств лактозосбраживающих дрожжей, выделенных из природных источников / Н.И. Хамнаева, Ч.Б. Доржиева // Вестник ВСГТУ. – 2006. – № 4. – С. 55–60.

80. Хамнаева Н.И. О направлениях использования микробной ассоциации кефирных грибков / Н.И. Хамнаева, Т.Г. Павлова // Материалы конференции «Успехи современного естествознания». – 2010. – № 3. – С. 98–99.
81. Харченко И.В. Роль сопутствующей микрофлоры при производстве гаприна в районе нижнего Поволжья. Дис. на соиск. уч. степ. к.б.н.: Волгоград – 1993. – 131 с.
82. Хмель И.А. Quorum-sensing регуляция экспрессии генов: фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – № 4. – С. 457–464.
83. Шлегель Г. Общая микробиология: Пер. с нем. / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
84. Abraham A.G. Characterization of kefir grains in cows' milk and soya milk / A.G. Abraham, G.L. de Antoni // Journal of Dairy Research. – 1999. – V. 66. – P. 327–333.
85. Ahmed Z. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir – Part II / Z. Ahmed, Y. Wang, N.Anjum, A. Ahmad, S.T. Khan // Food Hydrocolloids. – 2013. – V. 30. – P. 343–350.
86. Angulo L. Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain) / L. Angulo, E. Lopez, C. Lema // J. Dairy Res. – 1993. – V. 60. – P. 263–267.
87. Arihara K. Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus kefir* in kefir grains / K. Arihara, T. Toba, S. Adachi // International Journal of Food Microbiology. – 1990. – V. 11. – № 2. – P. 127–134.
88. Ayala-Hernandez I. Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media composition / I. Ayala-Hernandez, A. Hassan, H.D. Goff, R. Mira de Orduna, M. Corredig // Int. Dairy J. – 2008. – V. 18. – № 12. – P. 1109–1118.
89. Bosch A. Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy / A. Bosch, M.A. Golowczyc, A.G. Abraham, G.L. Garrote, G.L. de Antoni, O. Yantorno // Int. J. Food Microbiol. – 2006. – V. 111. – P. 280–287.
90. Cheirsilp B. Modelling and optimization of environmental conditions for kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens* / B. Cheirsilp, H. Shimizu, S. Shioya // Appl Microbiol Biotechnol. – 2001. – V. 57. – P. 639–646.

91. Cheirsilp B. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* / B. Cheirsilp, H. Shimizu, S. Shioya // Journal of Biotechnology. – 2003. – V. 100. – P. 43–53.
92. Cheirsilp B. Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in Mixed Culture for Kefir Production / B. Cheirsilp, H. Shoji, H. Shimizu, S. Shioya // J. of Bioscience and Bioengineering. – 2003. – V. 96. – № 3 – P. 279–284.
93. Cheirsilp B. Kinetic modeling of kefir production in mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* / B. Cheirsilp, H. Shimizu, S. Shioya // Process Biochemistry. – 2007. – V. 42. – P. 570–579.
94. Cheirsilp B. Use of whey lactose from dairy industry for economical kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts / B. Cheirsilp, S. Radchabut // New Biotechnology. – 2011. – V. 28. – №6. – P. 574–580.
95. Chen K.S. Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose / K.S. Chen, J.Y. Houngh // Enzyme and Microbiol. Technol. – 1985. – V. 7. – No 10. – P. 510–514.
96. Chen H.-C. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods / H.-C. Chen, S.-Y. Wang, M.-J. Chen // Food Microbiology. – 2008. – V. 25. – P. 492–501.
97. Chen T.-H. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains / T.-H. Chen, S.-Y. Wang, K.-N. Chen, J.-R. Liu, M.-J. Chen // Journal of Dairy Science. – 2009. – V. 92. – № 7. – P. 3002–3013.
98. Chen Y.P. *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis in vitro and in vivo / Y.P. Chen, P.J. Hsiao, W.S. Hong, T.Y. Dai, M.J. Chen // Journal of Dairy Science. – 2012. – V. 95. – № 1. – P. 63–74.
99. Cogan T.M. Characterization of lactic acid bacteria in artisanal dairy products / T.M. Cogan, M. Beuvier, B. Bianchi-Salvadori, P.S. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gomez, R. Gomez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M.C. Rea, E. Rodriguez // J. Dairy Res. – 1997. – V. 64. – P. 409–421.
100. Cooper D.G. Surface-active compounds from microorganisms / D.G. Cooper, J.E. Zajic // Adv. Appl. Microbiol. – 1980. – №26. – P. 229–253.
101. Day-Donal F. Lipopolysaccharide variability in *Pseudomonas aeruginosa* / F. Day-Donal, M.L. Marceau-Day // Curr. Microbiol. – 1982. – V. 7. – №2. – P. 93–98.

102. Dabour N. Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461 / N. Dabour, G. LaPointe // Appl Environ Microbiol. – 2005. – V.71. – N.11. – P. 7414–7425.
103. Degeest B. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria / B. Degeest, F. Vaningelgem, L. de Vuyst // International Dairy Journal. – 2001. – V. 11. – P. 747–757.
104. Degeest B. Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations / B. Degeest, F. Mozzi, L. de Vuyst // International Journal of Food Microbiology. – 2002. – V. 79. – P. 161–174.
105. Eden P.A. Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* Using Polymerase Chain Reaction-Amplified 16S rRNA-Specific DNA / P.A. Eden, T.M. Schmidt, R.P. Blakemore, N.R. Pace // Int J. Syst. Bacteriol. – 1991. – V.41. – №2. – P. 324–325.
106. Esnaashari S.S. Preparation and characterization of kefiran electrospun nanofibers / S.S. Esnaashari, S. Rezaei, E. Mirzaei, H. Afshari, S.M. Rezaayat, R. Faridi-Majidi // International Journal of Biological Macromolecules. – 2014. – V. 70. – P. 50–56.
107. Farnworth E.R. Kefir – a complex probiotic / E.R. Farnworth // Food Science and Technology Bulletin. Functional Foods. – 2006. – V.2 – P. 1–17.
108. Farnworth E.R. Kefir – A Fermented Milk Product / E.R. Farnworth, I. Mainville // Handbook of Fermented Functional Foods. Second Edition. – 2008. – NW, Taylor & Francis Group, LLC. – P 89–127.
109. Ferreira I.M. Short communication: Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins / I.M. Ferreira, O. Pinho, D. Monteiro, S. Faria, S. Cruz, A. Perreira, A.C. Roque, P. Tavares // Journal of Dairy Science. – 2010. – V. 93. – № 1. – P. 27–31.
110. Frengova G. I. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains / G.I. Frengova, E.D. Simova, D.M. Beshkova, Z.I. Simov // Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences. – 2002. – V. 57. – № 9–10. – P. 805–810.
111. Fujisawa T. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. Isolated from Kefir Grains / T. Fujisawa, S. Adachi, T. Toba, K. Arihara, T. Mitsuoka // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1988. – V. 38. – № 1. – P. 12–14.

112. Gancel F. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants / F. Gancel, G. Novel // Journal of Dairy Science. – 1994. – V. 77. – №3. – P. 689–695.
113. Gao J. Culture Condition Optimization of Tibetan Kefir Grains by Response Surface Methodology / J. Gao, F. Gu, H. Ruan, Q. Chen, J. He, G. He // Procedia Engineering. – 2012. – V. 37. – P. 132–136
114. Garofalo C. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions / C. Garofalo, A. Osimani, V. Milanović, L. Aquilanti, F. De Filippis, G. Stellato, S. Di Mauro, B. Turchetti, P. Buzzini, D. Ercolini, F. Clementi // Food Microbiology. – 2015. – V. 49. – P. 123–133.
115. Garrote G.L. Preservation of kefir grains, a comparative study / G.L. Garrote, A.G. Abrham, G.L. de Antoni // Lebensm. Wiss. Technol. – 1997. – V. 30. – P. 77–84.
116. Garrote G.L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains / G.L. Garrote, A.G. Abrham, G.L. de Antoni // Journal of Dairy Research. – 2001. – V. 68. – P. 639–652.
117. Ghasemlou M. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefiran / M. Ghasemlou, F. Khodaiyan, A. Oromiehie // Carbohydrate Polymers. – 2011. – V. 84. – № 1. – P. 477–483.
118. Ghasemlou M. Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grains / M. Ghasemlou, F. Khodaiyan, A. Oromiehie, M.S. Yarmand // Food Chemistry. – 2011. – V. 127. – P. 1496–1502.
119. Ghasemlou M. Structural investigation and response surface optimization for improvement of kefiran production yield from low-cost culture medium / M. Ghasemlou, F. Khodaiyan, K. Jahanbin, S.M.T. Gharibzahedi, S. Taheri // Food Chemistry. – 2012. – V. 133. – P. 383–389.
120. Gobbetti M. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids / M. Gobbetti, A. Corsetti, J. Rossi // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1994. – V. 10. – № 3. – P. 275–279.
121. Grønnevik H. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage / H. Grønnevik, M. Falstad, J. A. Narvhus // International Dairy Journal. – 2011. – V. 21. – № 9. – P. 601–606.

122. Gul O. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture / O. Gul, M. Mortas, I. Atalar, M. Dervisoglu, T. Kahyaoglu // *Journal of Dairy Science*. – 2015. – V. 98. – № 3. – P. 1517–1525.
123. Guzel-Seydim Z. Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains / Z. Guzel-Seydim, T. Kok-Tas, B. Ertekin-Filiz, A.C. Seydim // *Journal of Dairy Science*. – 2011. – V. 94. – № 3. – P. 1239–1242.
124. Harran T. Microbial Exopolysaccharides / T. Harran, B. Panilaitis, D. Kaplan // *Prokaryotes*. Chapter 3.3. – 2006. – P. 766–776.
125. Harta O. Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter / O. Harta, M. Iconomopoulou, A. Bekatorou, P. Nigam, M. Kontominas, A.A. Koutinas // *Food Chemistry*. – 2004. – V. 88. – P. 237–242.
126. Hickey M.W. Transport and Metabolism of Lactose, Glucose, and Galactose in Homofermentative Lactobacilli / M.W. Hickey, A.J. Hillier, G.R. Jago // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1986. – V. 51. – No 4. – P. 825–831.
127. Hsieh H.-H. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains / H.-H. Hsieh, S.-Y. Wang, T.-L. Chen, Y.-L. Huang, M.-J. Chen // *International Journal of Food Microbiology*. – 2012. – V. 157. – № 1. – P. 73–81.
128. Irigoyen A. Microbiological physiochemical and sensory characteristics of kefir during storage / A. Irigoyen, I. Arana, M. Castiella, P. Torre, F.C. Ibanes // *Food Chemistry*. – 2005. – V. 90. – P. 613–620.
129. Jianzhong Z. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis / Z. Jianzhong, L. Xiaoli, J. Hanhub, D. Mingsheng // *Food Microbiology*. – 2009. – V. 26. – P. 770–775.
130. Kandler O. *Lactobacillus kefir* sp. Nov., A component of the microflora of kefir / O. Kandler, P. Kunath // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1983. – V. 4. – P. 286–294.
131. Kwon O.-K. Inhibitory Effect of Kefiran on Ovalbumin-induced Lung Inflammation in a Murine Model of Asthma / O.-K. Know, K.-S. Ahn, M.-Y. Lee, S.-Y. Kim, B.-Y. Park, M.-K. Kim, I.-Y. Lee, S.-R. Oh, H.-K. Lee // *Archives of Pharmacal Research*. – 2008. – V. 31. – № 12. – P. 1590–1596.

132. Kök-Taş T. Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir / T. Kök-Taş, A. C. Seydim, B. Özer, Z. B. Guzel-Seydim // *Journal of Dairy Science*. – 2013. – V. 96. – № 2. – P. 780–789.
133. Koroleva N.S. Technology of kefir and kumys / *Bull. Int. Dairy Fed.* – 1988. – № 227. – P. 96–100.
134. Korsak N. Short communication: Evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments / N. Korsak, B. Taminiau, M. Leclercq, C. Nezer, S. Crevecoeur, C. Ferauche, E. Detry, V. Delcenserie, G. Daube // *Journal of Dairy Science*. – 2015. – T. 98. – №. 6. – C. 3684–3689.
135. Kourkoutas Y. Continuous whey fermentation using kefir yeast immobilized on delignified cellulosic material / Y. Kourkoutas, C. Psarianos, A.A. Koutinas, M. Kanellaki, I.M. Banat, R. Marchant // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – V. 50. – P. 2543–2547.
136. Kourkoutas Y. Evaluation of freeze-dried kefir coculture as starter in feta-type cheese production / Y. Kourkoutas, P. Kandyliis., P. Panas, J.S.G. Dooley, P. Nigam, A.A. Koutinas // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72. – P. 6124–6135.
137. La Riviere J.W.M. Kefiran, a Novel Polysaccharide Produced in the Kefir Grain by *Lactobacillus bravis* / J.W.M. la Riviere, P. Kooiman, K. Schmidt // *Archiv fur Microbiologie*. – 1967. – V. 59. – P. 269–278.
138. Lasagno M. Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment / M. Lasagno, V. Beoleito, F. Sesma, R. Raya, D. Font, A Eraso // *New Microbiol.* – 2002. – V. 25. – №.1. – P. 37–44.
139. Laws A.P. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria / A.P. Laws, V.M. Marshall // *International Dairy Journal*. – 2011. – V. 11. – P. 709–721.
140. Lawton J.H. What do species do in ecosystems? / J.H. Lawton // *Oikos*. – 1994. – P. 367–374.
141. Lee N.-K. Partial characterisization of lactocin NK, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK, isolated from Jeon-gal / N.-K. Lee, H.-D. Paik // *Food Microbiol.* – 2001. – V. 18. – P. 17–24.

142. Lee M.-Y. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model / M.-Y. Lee, K.-S. Ahn, O.-K. Kwon, M.-J. Kim, M.-K. Kim, I.-Y. Lee, S.-R. Oh, H.-K. Lee // *Immunobiology*. – 2007. – V. 212. – Issue 8. – P. 647–654.
143. Leite A.M.O. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis / A.M.O. Leite, B. Mayo, C.T.C.C. Rachid, R.S. Peixoto, J.T. Silva, V.M.F. Paschoalin, S. Delgado // *Food Microbiology*. – 2012. – V. 31. – № 2. – P. 215–221.
144. Leite A.M.O. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes / A.M.O. Leite, D.C.A. Leite, E.M. del Aguila, T.S. Alvares, R.S. Peixoto, M.A.L. Miguel, J.T. Silva, V.M.F. Paschoalin // *Journal of Dairy Science*. – 2013. – V. 96. – № 7. – P. 4149–4159.
145. Libudzisz Z. Kefir production in Poland / Z. Libudzisz, A. Piatkiewicz // *Dairy Ind. Int.* – 1990. – V. 55. – P. 31–33.
146. Lin C-W. Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan / C-W. Lin, H-L Chen., J-R. Liu // *Aust. J. Dairy Technol.* – 1999. – V. 54. – P. 14–18.
147. Lopitz-Otsoa F. Kefir-a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities / F. Lopitz-Otsoa, A. Rementeria, N. Enguezabal, J. Garaizar // *Rev. Iberoam Micol.* – 2006. – V. 23. – P. 67–74.
148. Macedo M.G. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate / M.G. Macedo, C. Lacroix, N.J. Gardner, C.P. Champagne // *International Dairy Journal*. – 2002. – V. 12. – P. 419–426.
149. Maeda H. Structural Characterization and Biological Activities of an Exopolisaccharide Kefiran Produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B^T / H. Maeda, X. Zhu, S. Suzuki, K. Suzuki, S. Ktamura // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – V. 52. – P. 5533–5538.
150. (2) Maeda H. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation / H. Maeda, X. Zhu, K. Omuraa, S. Suzuki, S Kitamura // *Bio Factors*. – 2004. – V. 22. – P. 197–200.
151. Maeda H. Effects of kefiran-feeding on fecal cholesterol excretion, hepatic injury and intestinal histamine concentration in rats / H. Maeda, H. Mizumoto, M. Suzuki, K. Tsuji // *Bioscience Microflora*. – 2005. – V. 24. – №2. – P. 35–40.

152. Medrano M. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors / M. Medrano, P.F. Perez, A.G. Abraham // International Journal of Food Microbiology. – 2008. – V. 122. – P. 1–7.
153. Medrano M. Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection / M. Medrano, M.F. Hamet, A.G. Abraham, P.F. Perez // Antonie van Leeuwenhoek. – 2009. – V. 96. – P. 505–513.
154. Medrano M. Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model / M. Medrano, S.M. Racedo, I.S. Rolny, A.G. Abraham, P.F. Perez // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2011. – V. 59. – P. 5299–5304.
155. Miao J. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei subsp. tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China / J. Miao, H. Guo, Y. Ou, G. Liu, X. Fang, Z. Liao, C. Ke, Y. Chen, L. Zhao, Y. Cao // Food Control. – 2014. – V. 42. – P. 48–53.
156. Miguel M.G. da C.P. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods / M.G. da C.P. Miguel, P.G. Cardoso, L. de A. Lago, R.F. Schwan // Food Research International. – 2010. – V. 43. – № 5. – P. 1523–1528.
157. Micheli L. Isolation and characterization of ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran / L. Micheli, D. Uccelletti, C. Palleschi, V. Crescenzi // Appl Microbiol Biotechnol. – 1999. – V. 53. – P. 69–74.
158. Molska I. Electron microscopic studies on structure and microflora of kefir grains / I. Molska, J. Kocon, S. Zmarlicki // Acta Aliment. Pol. – 1980. – V. 6. – P. 145–154.
159. Moore C.A. Comparison of plastic and plankton in North Pacific Central Gyre / C.A. Moore, S.L. Moore, M.K. Leecaster, S.B. Weisberg // Marine Pollution Bulletin. – 2001. – V. 42. – P. 1297–1300.
160. Motedayen A.A. Development and characterization of composite films made of kefiran and starch / A.A. Motedayen, F. Khodaiyan, E.A. Salehi // Food Chemistry. – 2013. – V. 136. – P. 1231–1238.
161. Murofushi M. Immunopotentiative effect of polysaccharide from Kefir grain, KGF-C, administered orally in mice / M. Murofushi, J. Mizuguchi, K. Aibara, T. Matuhasi // Immunopharmacology. – 1986. – V. 12. – № 1. – P. – 29–35.

162. Ninane V. Variability of the microbial abundance of a kefir grain starter cultivated in partially controlled conditions / V. Ninane, G. Berben, J.-M. Romnee, R. Oger // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2005. – V. 9. – №3. – P. 191–194.
163. Otes S. Kefir: Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects / S. Otes, O. Cagindi // *Pakistan Journal of Nutrition.* – 2003. – V. 2. – № 2. – P. 54–59.
164. Pan D. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12 / D. Pan, X. Mei // *Carbohydrate Polymers.* – 2010. – V. 80. – P. 908–914.
165. Pidoux M. Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation / M. Pidoux, V.M. Marshall, Z.B. Brooker // *Journal of Applied Bacteriology.* – 1990. – V. 69. – №3. – P.311–320.
166. Piermaria J.A. Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain / J.A. Piermaria, M.L. de la Canal, A.G. Abraham // *Food Hydrocolloids.* – 2008. – V. 22. – P. 1520–1527.
167. Piermaria J.A. Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization / J.A. Piermaria, A. Pinotti, M.A. Garcia, A.G. Abraham // *Food Hydrocolloids.* – 2009. – V. 23. – P. 684–690.
168. Piermaria J. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy / J. Piermaria, A. Bosch, A. Pinotti, O. Yantorno, M.A. Garcia, A.G. Abraham // *Food Hydrocolloids.* – 2011. – V. 25. – P. 1261–1269.
169. Pintado M.E. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains / M.E. Pintado, J.A. Lopes da Silva, P.B. Fernandes, F.X. Malcata, T.A. Hogg // *Int. J. Food Sci. Technol.* – 1996. – V. 31. – P. 15–26.
170. Plessas S. Bread making using kefir grains and baker's yeast / S. Plessas, L. Pherson, A. Bekatorou, P. Nigam, A.A. Koutinas // *Food Chem.* – 2005. – V. 93. – P. 585–589.
171. Postma P.W. The bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system / P.W. Postma, S. Roseman // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Biomembranes.* – 1976. – V. 457. – №. 3. – P. 213–257.
172. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // *J. Cell. Biol.* – 1963. – V. 17. – P. 208–213.
173. Ribosomal Database Project II (<http://www.cme.msu.edu>).

174. Rimada P.S. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation / P.S. Rimada, A.G. Abrham // *Journal of Dairy Research*. – 2001. – V. 68. – P. 653–661.
175. Rodrigues K.L. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract / K.L. Rodrigues, L.R.G. Caputo, J.C.T. Carvalho, J. Evangelista, J.M. Schneedorf // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2005. – V. 25(5). – P. 404–408.
176. Rodrigues K.L. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract / K.L. Rodrigues, J.C.T. Carvalho, J.M. Schneedorf // *Inflammopharmacology*. – 2005. – V. 13. – №5–6. – P. 485–492.
177. Rogosa M. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli / M. Rogosa, J.A. Mitchell, R.F. Wiseman // *J. Bacteriol.* – 1951. – V. 62. – P. 132–133.
178. Sandford P.A. Industrial utilization of polysaccharides / P.A. Sandford, J.K. Baird // *The polyccharides*. – London; N.Y.: Acad. Press, 1983. – V. 2. – 607 p.
179. Schoevers A. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase / A. Schoevers, T.J. Britz // *International Journal of Dairy Technology*. – 2003. – V. 56. – № 3. – P. 183–187.
180. Senini L. EPS phenotype and genotype in *Streptococcus thermophilus* strains of dairy origin / L. Senini, G. Ricci, P.L. Manachini, D. Mora // *Annals of Microbiology*. – 2004. – V. 54. – No 1. – P. 59–71.
181. Simova E. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them / E. Simova, D. Beshkova, A. Angelov, Ts. Hristozova, G. Frengova, Z. Spasov // *J. Ind. Micro. Biotechnol.* – 2002. – V. 28. – P. 1–6.
182. Simova E. Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them / E. Simova, Z. Simov, D. Beshkova, G. Frengova, Z. Dimitrov, Z. Spasov // *International Journal of Food Microbiology*. – 2006. – V. 107. – № 2. – P. 112–123.
183. Stadie J. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir / J. Stadie, A. Gulitz, M.A. Ehrmann, R.F. Vogel // *Food Microbiology*. – 2013. – V. 35. – № 2. – P. 92–98.
184. Stingle F. Unraveling the Function of Glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6 / F. Stingle, J. W. Newell, J. R. Neeser // *Journal of Bacteriology*. – 1999. – V. 181. – №. 20. – P. 6354–6360.

185. Tada S. Fed-Batch Coculture of *Lactobacillus kefiranofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for Effective Production of Kefiran / S. Tada, Y. Katakura, K. Ninomiya, S. Shioya // Journal of bioscience and bioengineering. – 2007. – V. 103. № 6. – P. 557–562.
186. Takizawa S. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., Two New Species from Kefir Grains / S. Takizawa, S. Kojima, S. Tamura, S. Fujinaga, Y. Benno, T. Nakase // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1994. – V. 44. – № 3. – P. 435–439.
187. Tanabe S. PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in albatross from the North Pacific and Southern Oceans: Levels, patterns, and toxicological implications / S. Tanabe, M. Watanabe, T.B. Minh, T. Kunisue, S. Nakanishi, H. Ono, H. Tanaka // Environmental Science & Technology. – 2004. – V. 38. – P. 403–413.
188. Thompson J. Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: studies with a mutant lacking glucokinase and mannose-transferase activities / J. Thompson, B.M. Chassy, W. Egan // J. Bacteriol. – 1985. – V. 162. – P. 217–233.
189. Toba T. A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains / T. Toba, S. Abe, K. Arihara, S. Adachi // Agricultural and Biological Chemistry. – 1986. – V. 50. – P. 2673–2674.
190. Urdaneta E. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats / E. Urdaneta, J. Barrenetxe, P. Aranguren, A. Irigoyen, F. Marzo, F.C. Ibáñez // Nutrition Research. – 2007. – V. 27. – № 10. – P. 653–658.
191. Vademuthu E.B. Multiple bacteriocin producing *Lactococcus* and composition / E.B. Vademuthu, J.T. Henderson, P.A. Vandenberg // 1994. Pat. US. № 5,348,881. C1.C12N/12,435/252.3 435/252.4
192. Vinderola G. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity / G. Vinderola, G. Perdígón, J. Duarte, E. Farnworth, C. Matar // Cytokine. – 2006. – V. 36. – № 5–6. – P. 254–260.
193. Wang S.-Y. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain / S.-Y. Wang, K.-N. Chen, Y.-M. Lo, M.-L. Chiang, H.-C. Chen, J.-R. Liu, M.-J. Chen // Food Microbiology. – 2012. – V. 32. – № 2. – P. 274–285.
194. Wang Y. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir/ Y. Wang, Z. Ahmed, W.

Feng, C. Li, S. Song // International Journal of Biological Macromolecules. – 2008. – V. 43. – № 3. – P. 283–288.

195. Wang Y. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir / Y. Wang, C. Li, P. Liu, Z. Ahmed, P. Xiao, X. Bai // Carbohydrate Polymers. – 2010. – V. 82. – P. 895–903.

196. Wang M. Modification of characteristics of kefiran by changing the carbon source of *Lactobacillus kefiranofaciens* / M. Wang, J. Bi // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2008. – V. 88. – P. 763–769.

197. Witthuhn R.C. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains / R.C. Witthuhn, T. Schoeman, T. Britz // Int. J. Dairy Technol. – 2004. – V. 57. – P. 33–37.

198. Witthuhn R.C. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation / R.C. Witthuhn, T. Schoeman, T. Britz // Int. J. Dairy Technol. – 2005. – V. 15. – P. 383–389.

199. Witthuhn R.C. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of Kefir grains / R.C. Witthuhn, T. Schoeman, A. Cilliers, T.J. Britz // Food Microbiol. – 2005. – V. 22. – P. 337–344.

200. Wulijideligen S. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in airag, an alcoholic fermented milk / S. Wulijideligen, K. Arakawa, M. Miyamoto, T. Miyamoto // Animal Science Journal. – 2013. – V. 84. – P. 66–74.

201. Xie N. Kefir yeasts enhance probiotic potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: The positive effects of coaggregation between the two strains / N. Xie, T. Zhou, B. Li // Food Research International. – 2012. – V. 45. – № 1. – P. 394–401.

202. Xu R. Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT / R. Xu, S. Ma, Y. Wang, L. Liu, P. Li // African Journal of Microbiology Research. – 2010. – V. 4 – №9. – P. 783–795.

203. Yaman H. Isolation of Lactobacilli from a commercial Polish kefir grain / H. Yaman // Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. – 2004. – V. 10. – №1. – P. 99–102.

204. Yeesang C. Sago starch as a low-cost carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefiranofaciens* / C. Yeesang, S. Chanthachum, B. Cheirsilp // World J Microbiol Biotechnol. 2008. – V. 24. – P. 1195–1201.

205. Yokoi H. Optimum culture conditions for production of kefir by *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains / H. Yokoi, T. Watanabe // J. Ferment. Bioeng. – 1992. – №74. – P. 327–329.
206. Yüksekdağ Z.N Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic / Z.N Yüksekdağ, Y Beyatli, B Aslim // LWT – Food Science and Technology. – 2004. – V. 37. – № 6. – P. 663–667.
207. Zajsek K. Characterisation of the exopolysaccharide kefir produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains / K. Zajsek, M. Kolar, A. Gorsek // Int. J. Dairy Technol. – 2011. – V. 64. – №4. – P. 544–548.
208. Zajsek K. Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains / K. Zajsek, A. Gorsek, M. Kolar // Food Chemistry. – 2013. – V. 139 – P. 970–977.
209. Zavala L. Gelling ability of kefir in the presence of sucrose and fructose and physicochemical characterization of the resulting cryogels / L. Zavala, P. Roberti, J.A. Piermaria, A.G. Abraham // Journal of Food Science and Technology. – 2014. – P. 1–9.
210. Zolfi M. Characterization of the new biodegradable WPI/clay nanocomposite films based on kefir exopolysaccharide / M. Zolfi, F. Khodaiyan, M. Mousavi, M. Hashemi // Journal of Food Science and Technology. – 2014. – V. 52. – №. 6. – P. 3485–3493.

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОБНЫХ КОМПОНЕНТОВ
КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ**

Высев 2009 г

Таблица I.A

**Функциональная активность различных видов молочнокислых бактерий,
выделенных из кефирных зерен**

Родовая принадлежность	Усл.назв	lac -		lac+		β-галакт. акт-ть
		Хар-р сгустка	°Т	Хар-р сгустка	°Т	
<i>Lactobacillus sp</i>	C1, C9	+++	82-89	+++	42-61	±
<i>Leuconostoc gelidum</i>	C3(2)	+++	64	+++	76	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	C5, C7	+++	61-66	+++	76	+
	M17(2)			-	40	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	C6	++++	70	++++	84	+
<i>Lactococcus lactis</i>	C11(2), C14, M10(2)	+++	56-79	+++	80-89	+
<i>Lactobacillus sakei</i>	M1	++++	65	++	77	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	C8	-	22	-	24-26	-
	M11	+-	53			
<i>Lactobacillus otakiensis</i>	M3	-	22	-	21	-
<i>Lactobacillus kefir</i>	M5, M12(2)	+-	53-73	-	20-24	-
Не идентифицированные кокковые формы	C2	-	22	+	67	+
	C10	-	21	++	70	+

Таблица I.B

Характеристика дрожжевых изолятов, выделенных из кефирных зерен

Усл.об.	Морфология колоний	Микроскопирование	Спиртовое брожение			
			Время, сут.	Доля объема, занимаемого пузырьком газа		
				глюкоза	галактоза	лактоза
С3 (1)	1-5 мм, бежеватые, матовые, выпуклые, край ровный.	овальные клетки	I	1/7	0	0
			II	1	0	0
			III	1	0	0
С4	Шарообразные, мелкие	мелкие		0	0	0

	d~1мм, ярко-белые, выпуклые, края ровные	вытянутые клетки	I II III	1/7 1/3	1/5 1/3	0 0
С11 (1)	2-6 мм, матовые, кремовые, выпуклые, середина приподнята, край ровный	овальные клетки	I II III	1/6 1/2 1/2	0 0 0	0 0 0
М4	Круглые с неровными краями, большие (d~8мм), бежеватобелые, матовые, непрозрачные, немного выпуклые	клетки непоавильной формы	I II III	0 1/6 1/6	0 0 0	0 0 0
М6	Круглая, большая, белая, матовая, выпуклая, рельефная	овальные почкующиеся клетки	I II III	1/2 1 1	0 0 0	0 0 0
М7	Круглые, края ровные, d~5мм, матово-белые, непрозрачные, плоские	круглые, овальные клетки	I II III	1/3 1/2 1	0 0 0	0 0 0
М8 (1)	Круглые, маленькие, белые, непрозрачные, выпуклые (~М3)	вытянутые мелкие клетки	I II III	0 1/6 1/5	0 1/10 1/3,5	0 0 0
М10 (1)	d – 2-3мм, чуть бежевые, матовые, выпуклы, край немного шероховат	клетки неправильной формы	I II III	1/2,5 1/2 1/2	0 0 0	0 0 0
М13	Круглые, среднего размера, матово-белые, непрозрачные, плоские, края ровные	круглые, овальные клетки	I II III	1/3 1/2 1	0 0 0	0 0 0
М14 (1)	Круглые, мелкие (d~1мм), ярко-белые, непрозрачные, выпуклые	мелкие вытянутые клетки	I II III	0 1/7 1/3	0 1/5 1/3	0 0 0
М17 (1)	Круглые, небольшие, немного выпуклые, шероховатые, матово белесые	клетки неправильной формы	I II III	1/3 1/2 1/2	0 0 0	0 0 0

**Физиологическая активность бактериальных компонентов кефирных зерен
КГС lac+ и КГС lac-**

№ пп	усл. назв.	Титруемая кислотность на средах с сахарами, °Т							°Т на моло ке	β-гал. акт- ть
		лакт.	глюк.	галакт.	сахар.	фрукт.	мальт.	мелас са		
КГС lac-										
1	СтБ/л1	56	56	44	70	106	52	73	38	+
2	СтБ/л2	19	29	20	18	22	22	20	17	-
3	СтБ/л3	23	55	31	21	28	27	30	20	-
4	СтБ/л5 ₍₁₎	25	48	29	50	83	45	90	25	-
5	СтБ/л5 ₍₂₎	26	85	25	78	76	44	87	23	+
6	СтБ/л6	18	37	22	20	21	20	25	17	+
7	СтБ/л7	27	55	32	72	79	57	86	17	+
8	СтБ/л8	19	50	23	19	20	21	25	20	-
9	СтБ/л9	22	30	25	22	22	30	35	18	-
10	СтБ/л10	23	56	25	22	27	26	30	21	-
11	СтБ/л11	20	65	25	20	23	22	25	19	-
12	СтБ/л12	18	59	30	57	62	54	79	65-25	+
13	СтБ/л13	22	66	30	65	74	45	75	20	+
14	СтБ/л14	25	57	26	16	26	23	29	25	+
15	СтБ/л15	54	64	55	57	64	55	80	110- 165	+
16	СтБ/л16	25	56	22	21	56	22	26	24	+
КГС lac+										
17	СтЛак+2	20	45	25	19	21	20	25	19	-
18	СтЛак+3	40	52	42	60	82	56	80	57-69	-
19	СтЛак+4	19	45	24	20	25	22	33	19	-
20	СтЛак+5	20	27	27	24	28	27	37	18	-
21	СтЛак+6	20	34	23	20	34	20	25	9	-
22	СтЛак+7	36	72	39	60	64	57	80	69-97	+
23	СтЛак+8	20	38	30	20	24	28	25	20	-
24	СтЛак+11	20	48	23	19	23	22	30	20	-
25	СтЛак+12 ₍₁₎	19	36	21	17	21	22	23	10	-
26	СтЛак+12 ₍₂₎	37	50	35	59	84	50	75	53-61	-
27	СтЛак+13	18	42	25	19	19	20	25	20	-
28	СтЛак+14	21	20	25	20	29	41	40	23- 113	+
29	СтЛак+15	23	50	45	25	45	23	30	18	+
30	СтЛак+16	20	22	22	18	59	22	43	20-53	+
31	СтЛак+17	20	20	22	19	24	21	38	113- 18	+
32	СтЛак+18	21	50	31	22	27	28	34	19	-
33	СтЛак+19	18	60	27	20	24	23	25	62-10	-
34	Среда	19-24	19-20	20-22	17-20	19-25	20-23	≈30	19-20	

Функциональная активность изолятов, выделенных из КГ лас+ и КГ лас-

Номер изолята	Усл. обозн.	Время обр-я сгустка, сут.	Хар-р сгуст.	pH	°Т	β-гал. акт-ть	Среда с рут.кр.	Молоч. агар
КГ лас+								
1	1+	-	-	6.79	17	-	3	2
2	2+	1	++++	4.40	86	+-	0 желт.	
3	3+	1	++++	4.36	86	-	2-3	0
4	6+	1	++++	4.33	92	-	3	3
5	8+	2	++++	4.36	86	-	1	0
6	9+	-	-	6.80	17	+-	2	-
7	10+	-	-	6.71	19	+-	3 кр.	0
8	11+	-	-	7.36	9	-	3 кр.	
9	12+	-	-	6.95	13	-	2 ор.	
10	13+	-	-	6.65	18			-
11	14+	-	-	6.82	15	+	2	-
12	15+	2	++++	4.36	85	-	1	0
13	16+	2	++++	4.38	80	+-	1	0
14	17+	-	-	6.97	14	-	-	
15	18+	-	-	6.86	16	-		
КГ лас-								
1	1-	2	++++	4.37	84	+-	1	0
2	3-	6	++-	6.83	16	-	3	
3	5-	-	-	6.55	18	+		
4	6-	1	++++	4.40	84	-	1	0
5	9-	1	++++	4.38	84	+	1	0
6	11-	-	-	6.66	16	±		
7	13-	1-2	++++	4.38	90	+-	0 желт. 2	0
8	14-	1-2	++++	4.60	78	+-	0 желт. 2	0
9	15-	-	-	6.84	16	+	3	-
10	16-	-	-	6.83	16	+	3	-
11	17-	-	-	6.80	16	+	3	
12	18-	-	-	6.82	15	+	3 кр.	
13	19-	-	-	6.76	17	+	3	
14	20-	-	-	6.80	16	+	3	
15	21-	8	±-	6.14	32	+-	3	-
16	22-	-	-	6.82	15		-	-
17	24-	-	-	6.66	16	-		
18	25-	-	-	6.85	16			-
20	26-	-	-	6.48	21	+	2 глянц.	3
21	27-	2	++++	4.54	77	+-	0 желт. 3	0
22	28-	2	++++	4.37	88	-	0	
23	30-	-	-	6.90	15	-	-	
24	31-	8	±-	6.06	32	+-	3 кр.	
25	32-	-	-	6.54	18	-	2	0
КЖ лас-								

1	1-кж	-	-	6.75	16	-	2 глянци.	-
2	2-кж	5	+++	4.47	80	-	0	-
3	3-кж	-	-	6.89	17	-	2	1
4	4-кж	8	±-	5.81	38	- (±)	2 глянци.	<i>Leuc. mesenteroides</i>
5	5-кж	8	±-	5.88	35	- (±)	2 ор.	0
6	6-кж	8	±-	5.89	36	- (±)	2 глянци.	0
7	7-кж	6	++-	7.14	24	-	3 кр.	2
8	8-кж	-	-	6.79	17	-	0	
9	9-кж	5	++++	4.46	87	-	0	1
10	10-кж	-	-	6.87	15	-	3 кр.	1
11	11-кж	1	++++	4.39	84	+-	0 глянци.	<i>Lactococcus lactis</i>
12	12-кж	2	++++	4.39	85	-	0	-
13	13-кж	-	-	6.73	17	-		
14	15-кж	1	++++	4.62	73	-	0 желт.	0
КЖ lac+								
1	1+кж	5	++++	4.40	82	-	0	-
2	2+кж	-	-	7.35	10		3 кр.	1
3	3+кж	-	-	7.25	11		3 кр.	1
4	4+кж	-	-	6.70	17			-
5	5+кж	-	-	7.35	10	-	3 кр.	
6	6+кж	-	-	6.94	15	-	2 ор.	
7	7+кж	-	-	7.36	10	-	2 ор.	
8	9+кж	1	++++	4.36	85	+-	3 кр. 1	1
9	12+кж	2	++++	4.37	85	+-		-

Примечание: для среды с рутениевым красным значения от 0 до 3 характеризуют интенсивность окраски колоний: 0 – не окрашены, 3 – ярко окрашены; для твердой среды с молоком (молочный агар) значения от 0 до 3 характеризуют зону просветления на чашках вокруг колоний (наличие протеолитической активности).

Высев 2013 г

Таблица I.Д

Функциональная активность изолятов, выделенных из КГ lac+ и КГ lac-

изоляты	Время обр-я сгустка, сут	Хар-р сгустка	pH	°Т	β-гал. акт-ть	Среда с рут.кр.	Молоч. агар	идентификация	
КГ lac-1	-	-	6.36	19	+	3	-		1
КГ lac-2	-	-	6.57	16	+		-		
КГ lac-3	-	-	6.56	16	+	3	-	<i>L.otakiensis</i>	
КГ lac-4	-	-	6.19	22	+		-		
КГ lac-5	13 / -	+++ /-	5.57/ 6.3	40/21	+	3	-	C3(2)	2
КГ lac-6	11-12	+++	4.45	98	+	3 крас.	0	<i>L.otakiensis</i>	
КГ lac-15	12	+++	4.81	85	+-	2	2		

КГ lac-20	14	+-	5.08	66	+	3 крас.	1		
КГ lac-16	-	-	6.70	15		2	1	С8	3
КГ lac-17	-	-	6.65	16	-	2	1	Укб	
КГ lac-19	-	-	6.64	17	-	3 крас.	2	укб	
КГ lac+1	- / 14	- / ±	6.22/ 5.3	20/48	+	3	-		1
КГ lac+2	-	-	6.13	24	+	3	-	<i>L.otakiensis</i>	
КГ lac+3	-	-	6.55	17	+	3	-		
КГ lac+4	-	-	6.50/ 5.9	16/26	+	3	-		
КГ lac+15	-	-	6.42	19	+-	2	0		
КГ lac+16	-	-	6.62	14	+	0-2	3		
КГ lac+5	12	++++	5.66	39	+	3	-	С3(2)	2
КГ lac+6	14	+++±	4.85	76	+	3	-	<i>L.sunki</i>	
КГ lac+7	11-12	+++	4.52	91	+	3	-	<i>L.otakiensis</i>	
КГ lac+8	14	+++±-	4.95	70	+	3	-		
КГ lac+14	14	+±-	5.07	65	+-	1	0		
КГ lac+9	11	+++	6.71	12	-	0	2		
КГ lac+10	11	+++	6.52	18	-	0	3		4
КГ lac+11	11	+++	6.66	16		0	3		
КГ lac+12	11-12	+++	6.85	12	-	0	3	<i>B.subtilis</i>	
КГ lac+13	11	+++	6.75	16	-	0	3		
КГ lac+17	11	+++	6.62	17	-	0	3		
КГ lac+18	-	-	6.61	16	-		0	Не укб	
КГ lac+ 1 ^{t=37°C}	-	-	6.3	21	-	2	0-1		
КГ lac+ 2 ^{t=37°C}	-	-	6.31	20	-	2	0-1		
КГ lac+ 3 ^{t=37°C}	-	-	7.09	20		0	3		
КЖ lac-4	5-6	+++	4.85	66	+-	0	3		2
КЖ lac-1	14	±	5.26	50	-	1 глянц.	0		5
КЖ lac-5	14	±	5.21	53	-	1 глянц.	0		
КЖ lac-8	14	+++	5.07	63	-	1 глянц.	-		
КЖ lac-9	14	+++	5.07	64	-	1 глянц.	-		
КЖ lac-2	-	-	6.60	15	-	1	0	Укб	
КЖ lac-3	-	-	6.65	14	-	1	0	укб	
КЖ lac-6	-	-	6.64	13	-	2	0	Укб	
КЖ lac-7	-	-	6.59	15	-		0	Укб	
КЖ lac-14	-	-	6.57	16	-	1	0	Не укб	
КЖ lac-15	11	+++	6.72	16	-	0	3		4
КЖ lac- 1 ^{t=37°C}	-	-	6.3	19	+				1
КЖ lac-	-	-	6.35	20	+				

2 ^{t=37°C}									
КЖ lac- 3 ^{t=37°C}	-	-	6.3	19	+				
КЖ lac- 4 ^{t=37°C}	8	-	5.75	28	-				5
КЖ lac+17	12	++-	4.89	70	+	3	-		2
КЖ lac+13	-	-	6.55	16	+	3	-		1
КЖ lac+16	-	-	6.55	16	+	2	-		
КЖ lac+2	-	-	6.58	15	-	1	0	Укб	3
КЖ lac+6	-	-	7.17	8	-	0	3	Не укб	
КЖ lac+7	-	-	6.61	16	-	1	0	Укб	
КЖ lac+10	-	-	6.63	16	-		0	Укб	
КЖ lac+11	-	-	6.71	15	-	0	4	Не укб	
КЖ lac+12	-	-	6.66	15	-		0	Не укб	
КЖ lac+14	-	-	6.61	15	-	2	0		
КЖ lac+ 2 ^{t=37°C}	-	-	6.35	18	+				1
КЖ lac+ 3 ^{t=37°C}	-	-	6.36	19	+				
КЖ lac+ 5 ^{t=37°C}	-	-	6.36	19	+				

Примечание: укб – уксуснокислые бактерии.

**СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ МЕТОДОМ
ИК-СПЕКТРОСКОПИИ**

Исследования проводили на базе ФБГУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН.

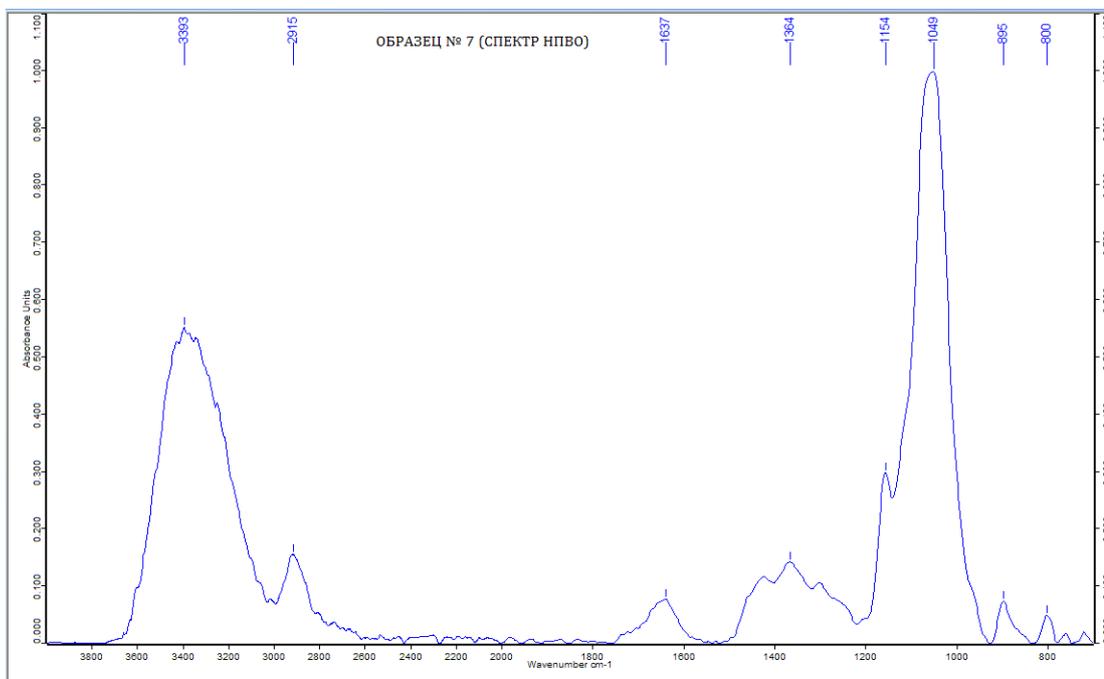


Рис. II.A. Спектр НПВО для образца №7 – ЭПС из КГлас+.

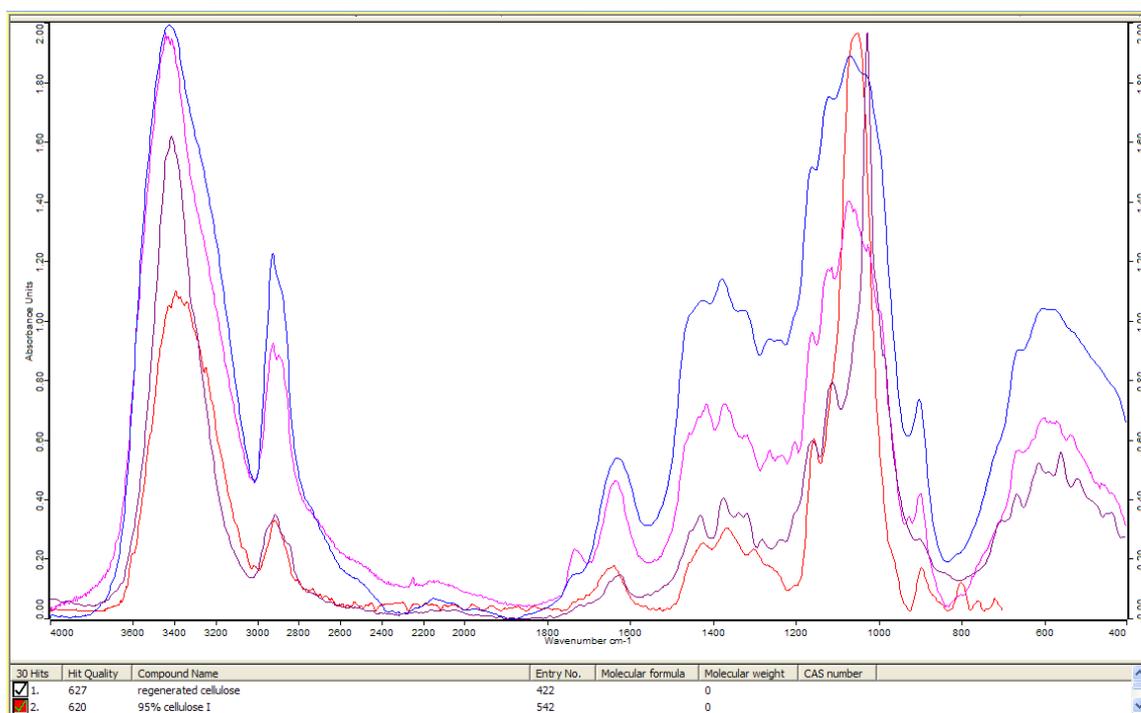


Рис. II.B. Результаты библиотечного поиска для образца №7 – ЭПС из КГлас+ (спектр НПВО). Машина предлагает несколько типов регенерированной целлюлозы и 95%-ную целлюлозу.

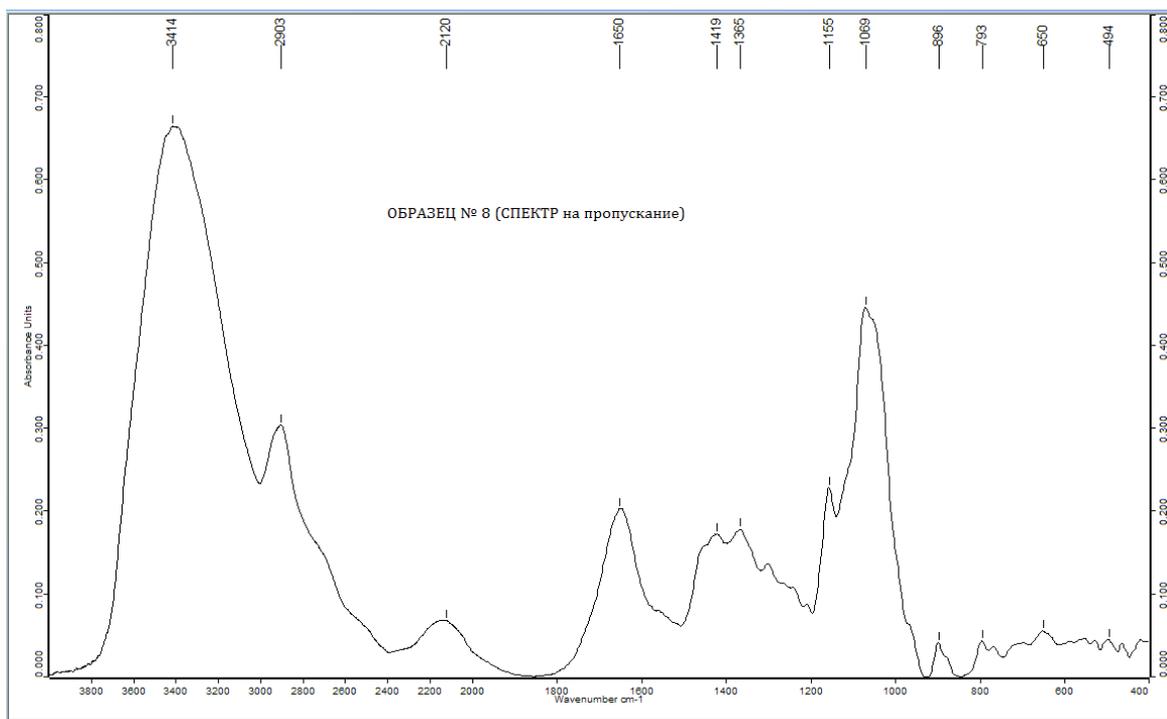


Рис. II.В. Спектр на пропускание для образца №8 – ЭПС из КГлас-.

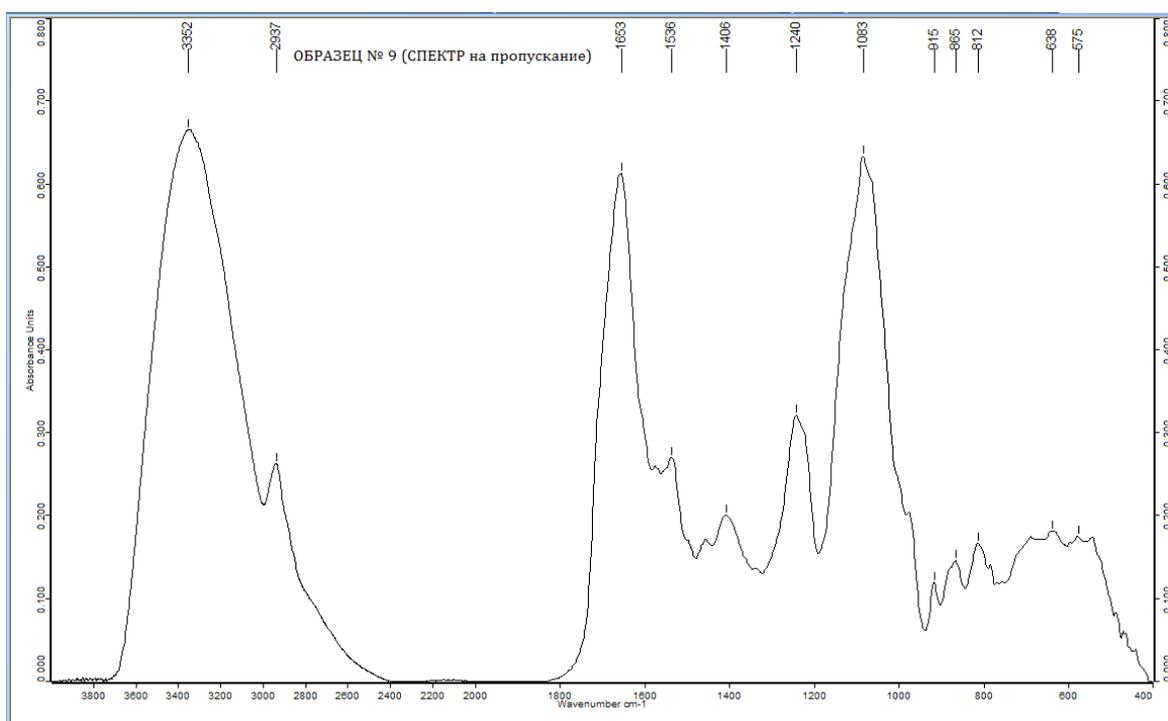


Рис. II.Г. Спектр на пропускание для образца №9 – ЭПС, синтезированные культурой *Lactococcus lactis* на среде MRS с лактозой.

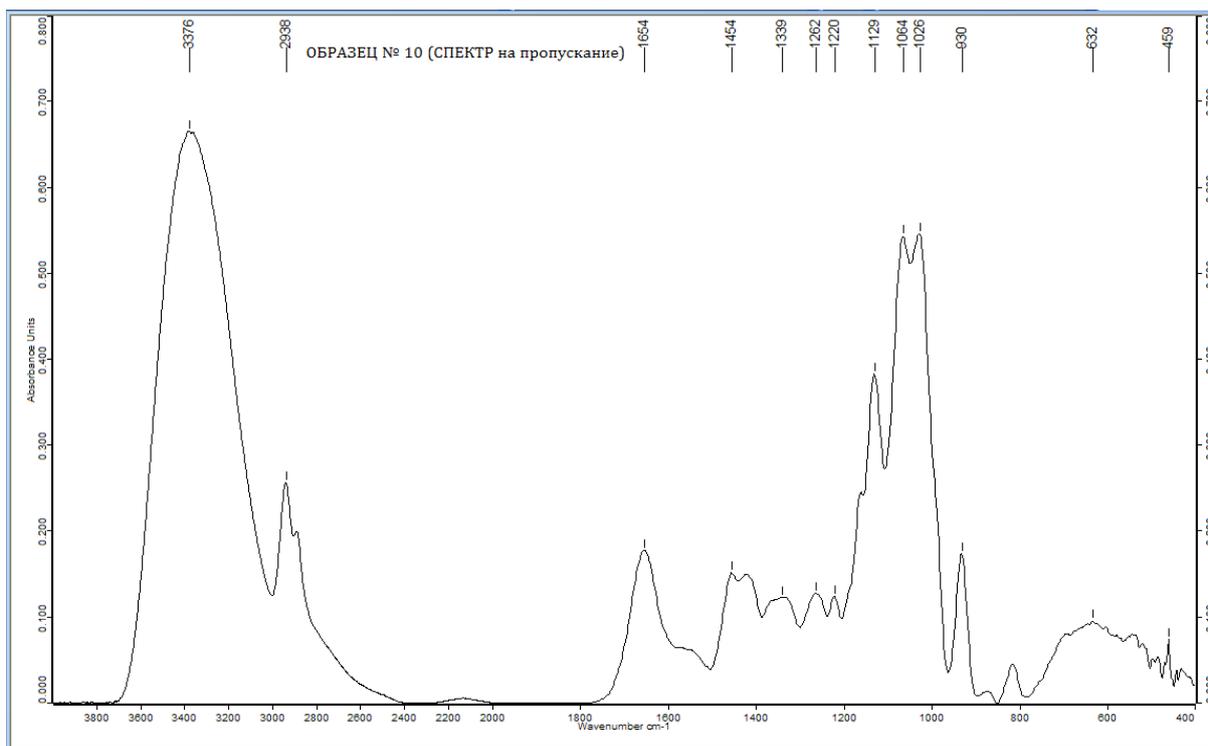


Рис. II.Д. Спектр на пропускание для образца №10 – ЭПС, синтезированные культурой *Leuconostoc mesenteroides* на среде MRS сахарозой.

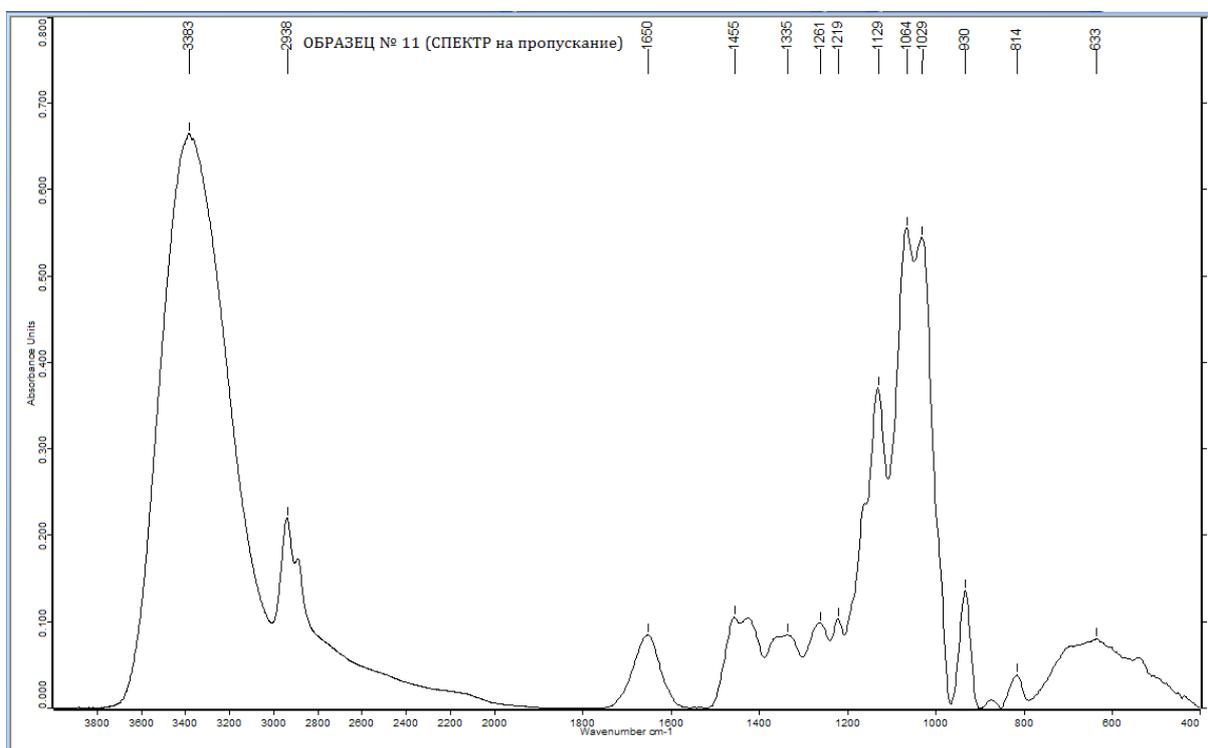


Рис. II.Е. Спектр на пропускание для образца №11 – ЭПС, синтезированные культурой *Lactococcus lactis* на среде MRS с сахарозой.

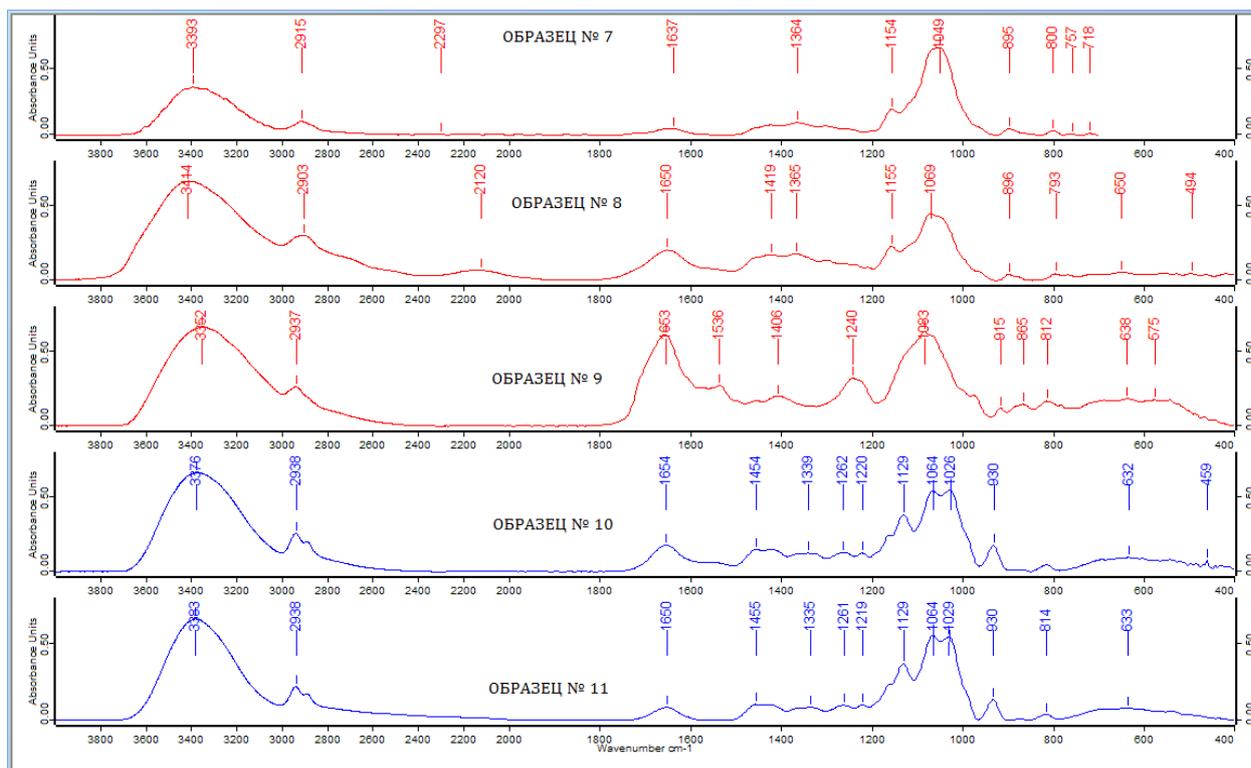
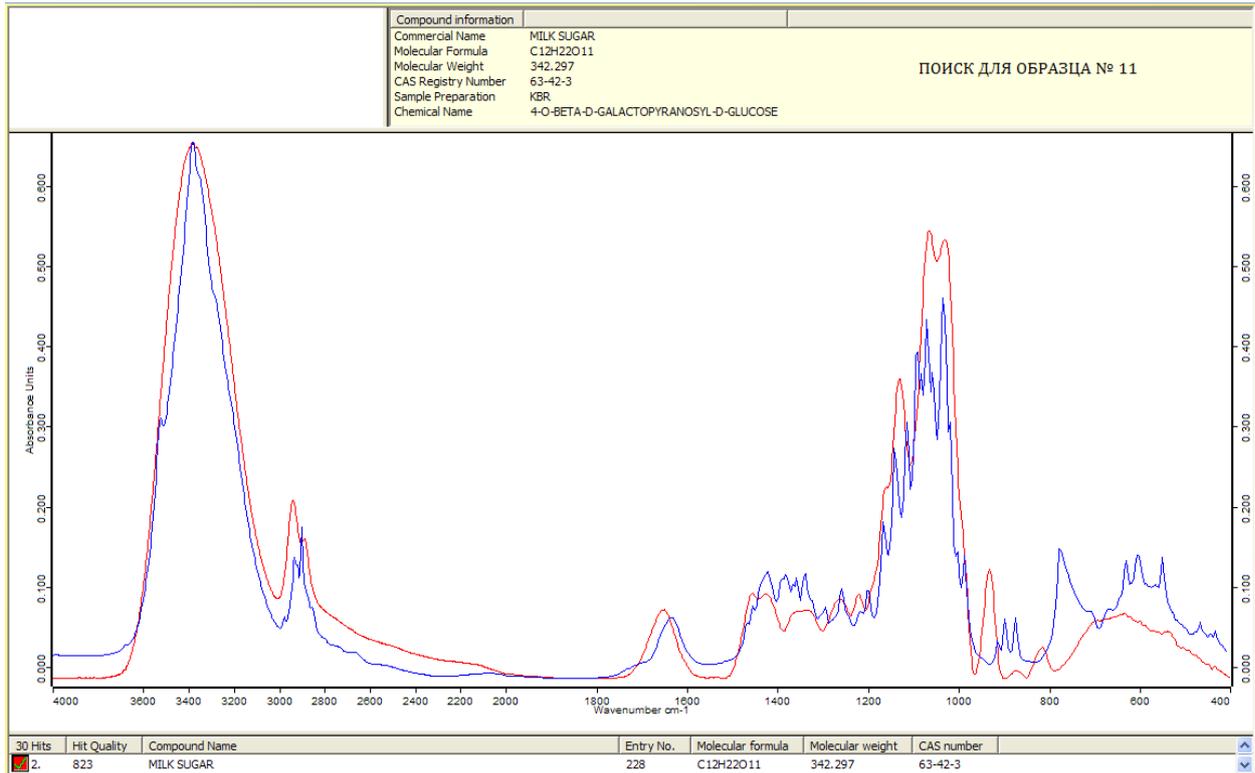
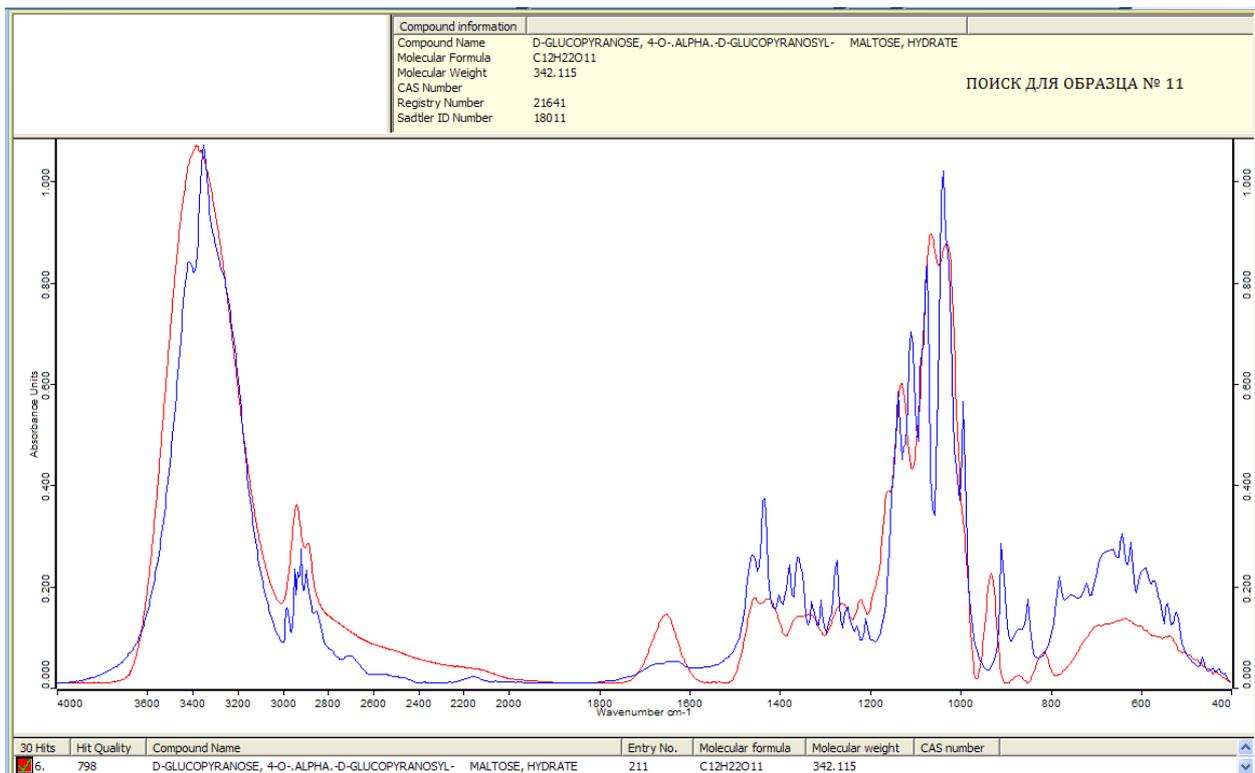
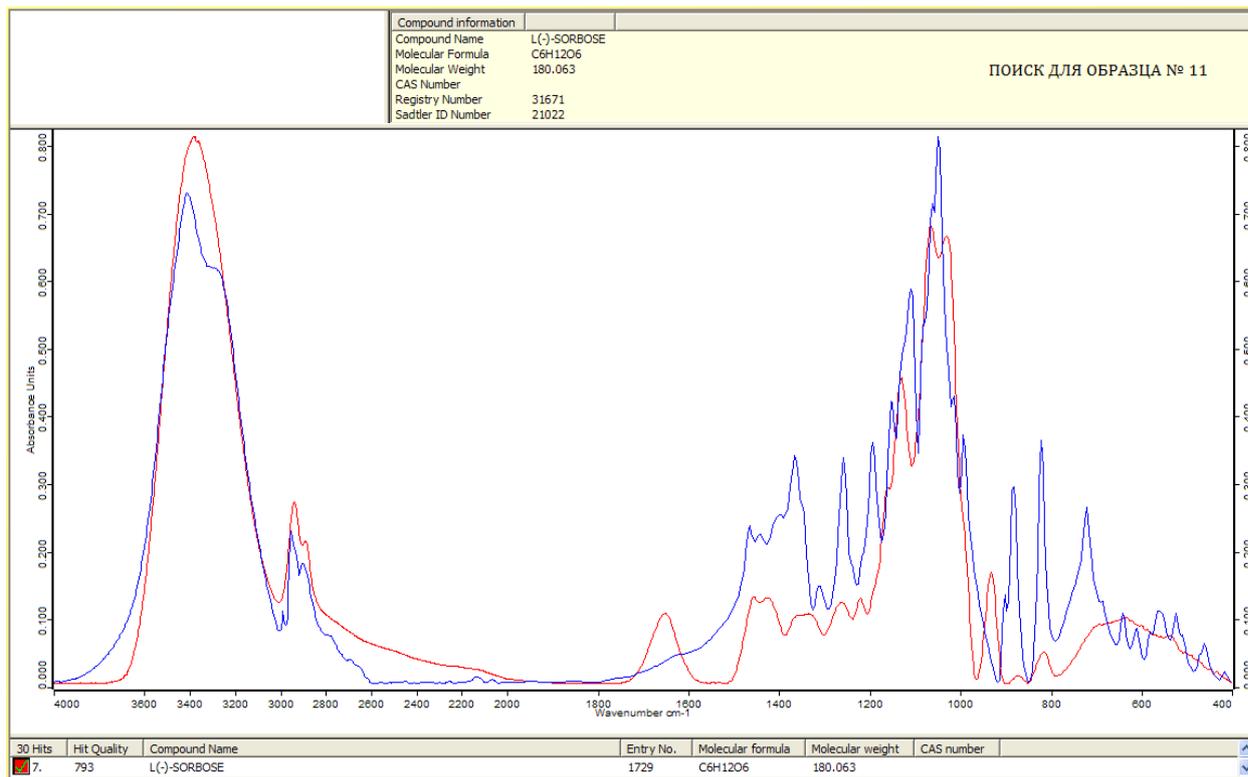
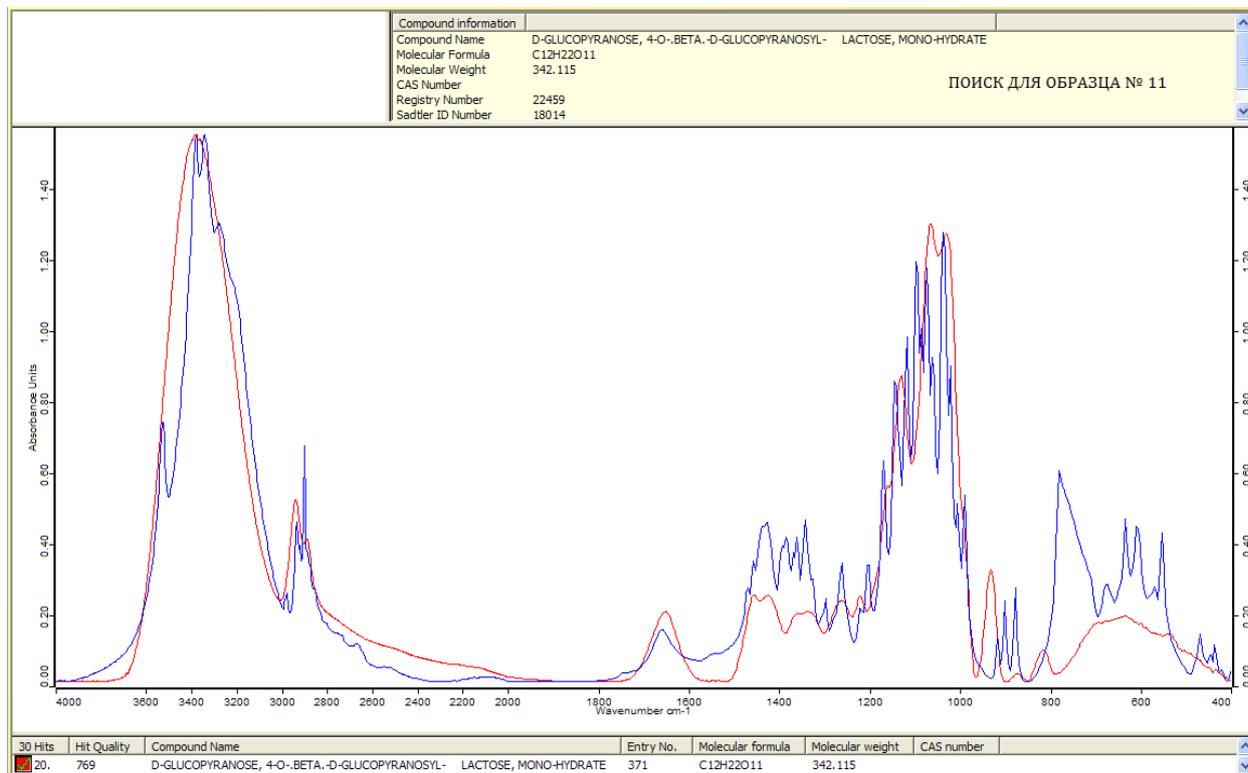


Рис. П.Ж. ИК-спектры образцов:

- образец №7 – ЭПС из КГлас+;
- образец №8 – ЭПС из КГлас-;
- образец №9 – ЭПС, синтезированные культурой *Lactococcus lactis* на среде MRS с лактозой;
- образец №10 – ЭПС, синтезированные культурой *Leuconostoc mesenteroides* на среде MRS сахарозой;
- образец №11 – ЭПС, синтезированные культурой *Lactococcus lactis* на среде MRS с сахарозой.

a**б**

B**Г**

Д

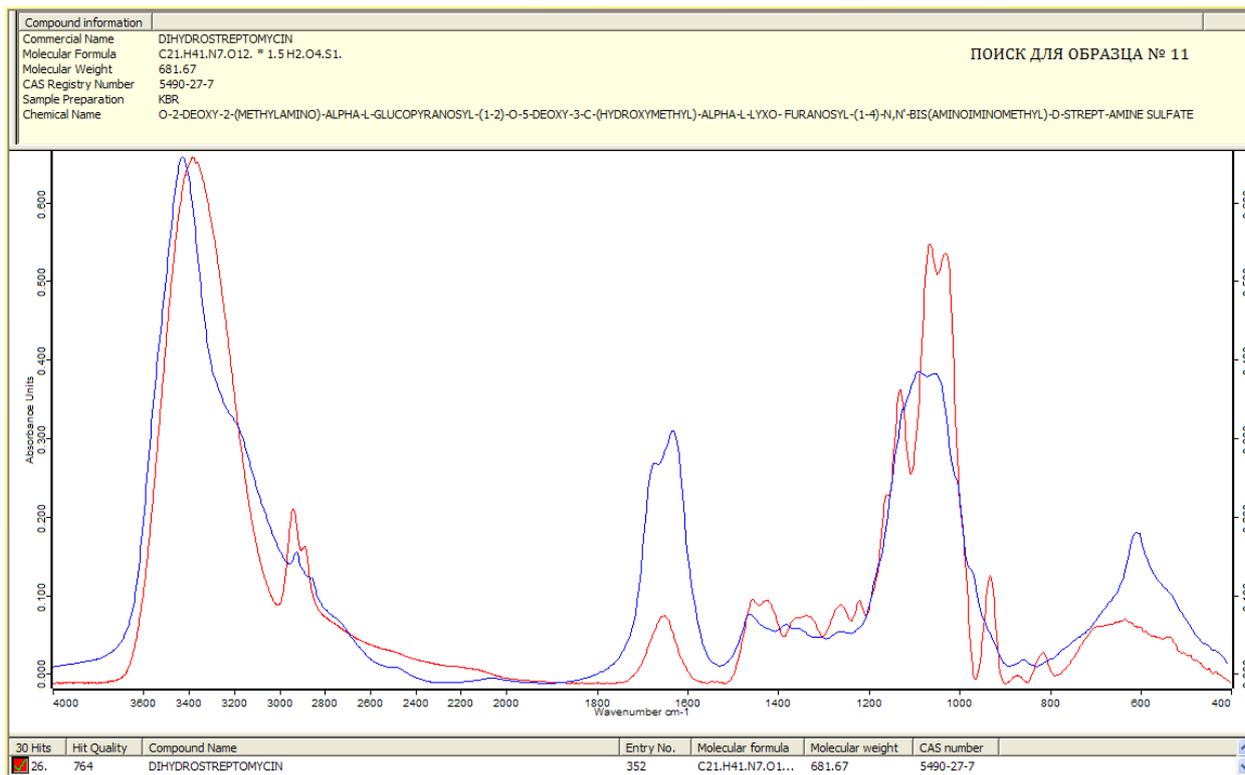


Рис. II.3 а-д. Примеры библиотечного поиска для образца №11 – ЭПС синтезированные культурой *Lactococcus lactis* на среде MRS с сахарозой.

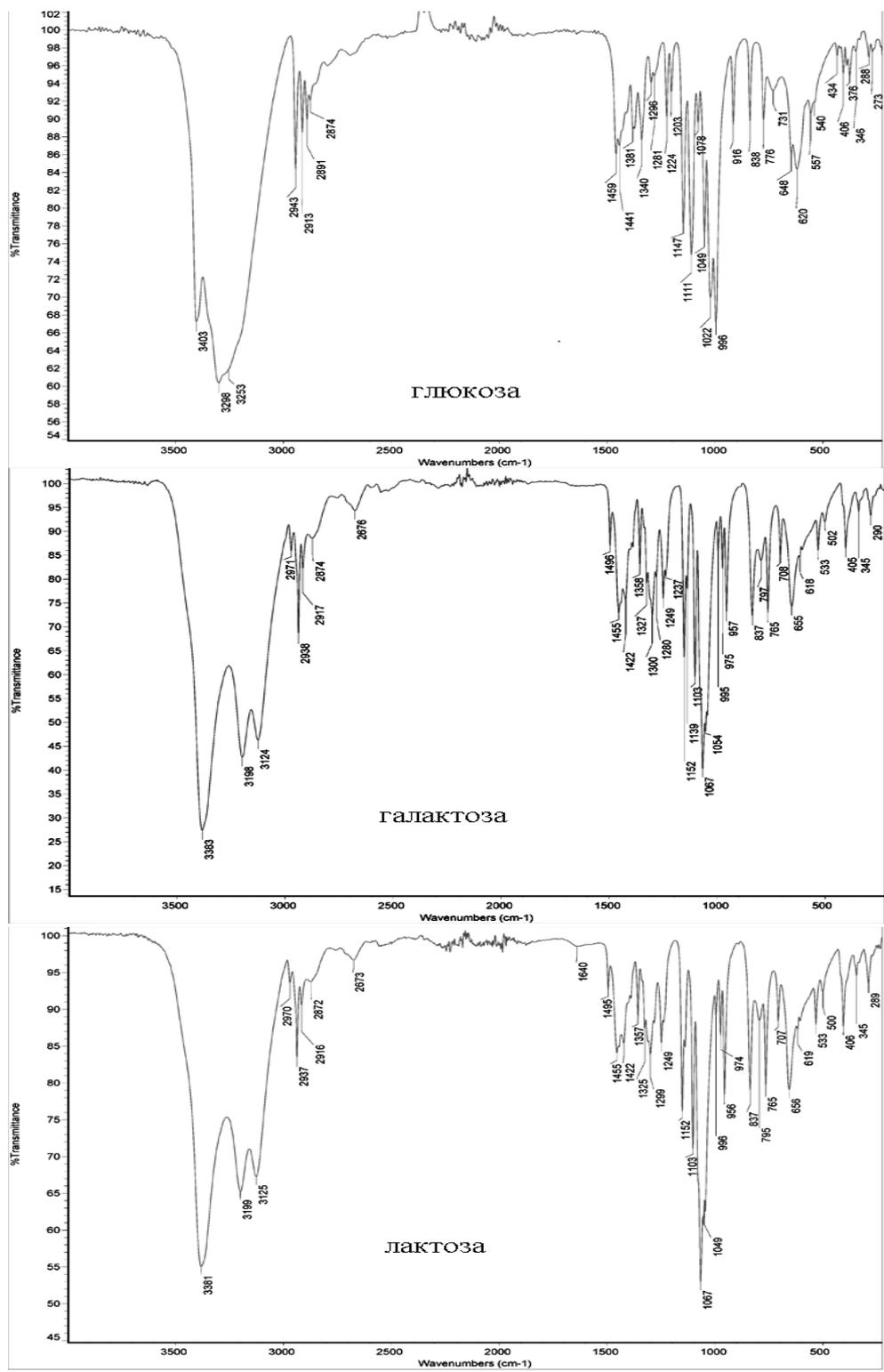


Рис. II.И. ИК-спектры индивидуальных сахаров: глюкозы, галактозы, лактозы.

ИК-СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭПС

Исследования проводили на базе ЦКП РХТУ им. Д.И. Менделеева

Методика измерений: навеска бромида калия массой 0.2220 г тщательно перемешивается с навеской образца (0.0026 г). Далее смесь помещают в пресс-форму и изготавливают круглую таблетку диаметром 12 мм, после чего снимают ИК-спектр чистого бромида калия (как фон) и ИК-спектр таблеток с исследуемыми веществами.

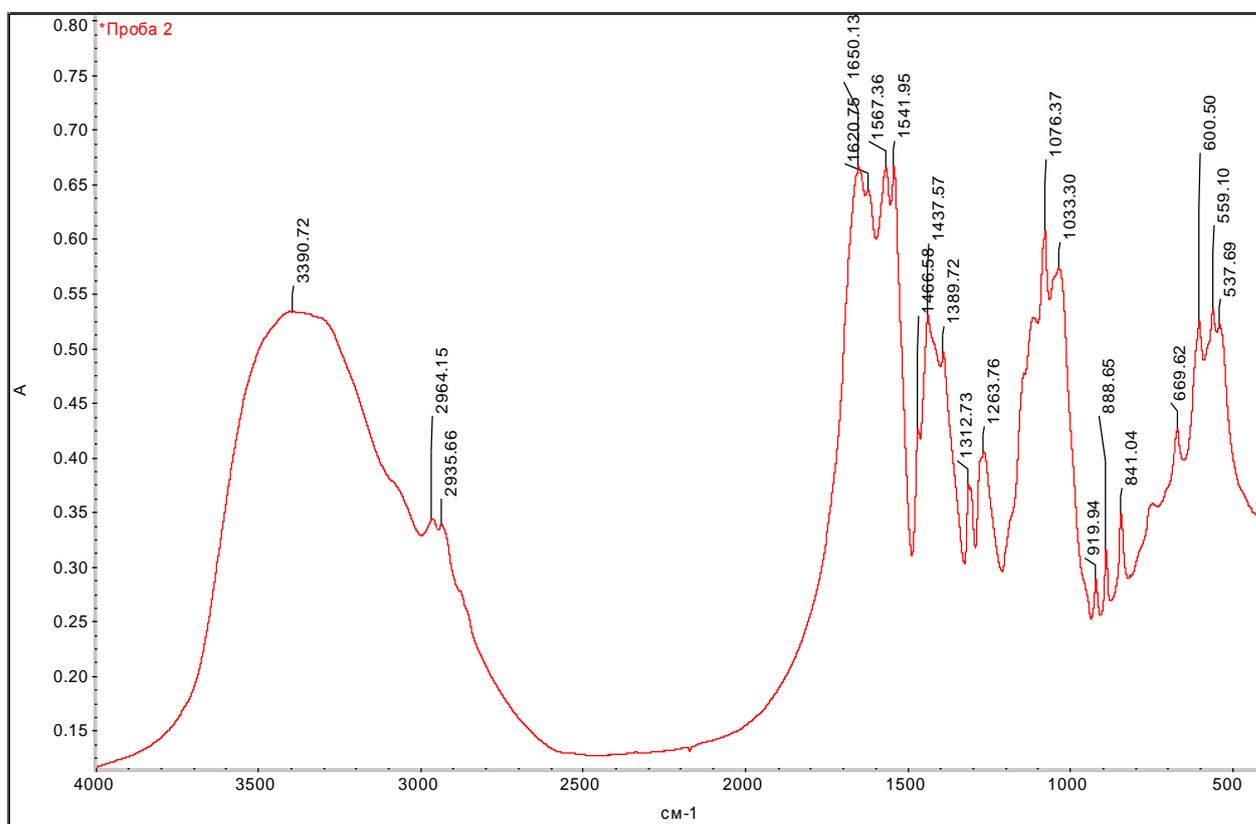


Рис. III.A. ИК-спектр пробы 2 – ЭПС, синтезированные культурой *L.lactis* на молочной сыворотке

Пт Окт 10 13:08:47 2014 (GMT+03:00)

ПОИСК ПИКОВ:

Спектр: *Проба 2

Область: 4000.00 400.00

Порог: 0.117

Чувствительность 75

Таблица пиков:

Положение:	537.69	Интенсивность:	0.520
Положение:	559.10	Интенсивность:	0.535
Положение:	600.50	Интенсивность:	0.523

Положение:	669.62	Интенсивность:	0.425
Положение:	841.04	Интенсивность:	0.348
Положение:	888.65	Интенсивность:	0.313
Положение:	919.94	Интенсивность:	0.287
Положение:	1033.30	Интенсивность:	0.572
Положение:	1076.37	Интенсивность:	0.607
Положение:	1263.76	Интенсивность:	0.404
Положение:	1312.73	Интенсивность:	0.374
Положение:	1389.72	Интенсивность:	0.495
Положение:	1437.57	Интенсивность:	0.529
Положение:	1466.58	Интенсивность:	0.425
Положение:	1541.95	Интенсивность:	0.666
Положение:	1567.36	Интенсивность:	0.664
Положение:	1620.75	Интенсивность:	0.644
Положение:	1650.13	Интенсивность:	0.665
Положение:	2935.66	Интенсивность:	0.337
Положение:	2964.15	Интенсивность:	0.343
Положение:	3390.72	Интенсивность:	0.532

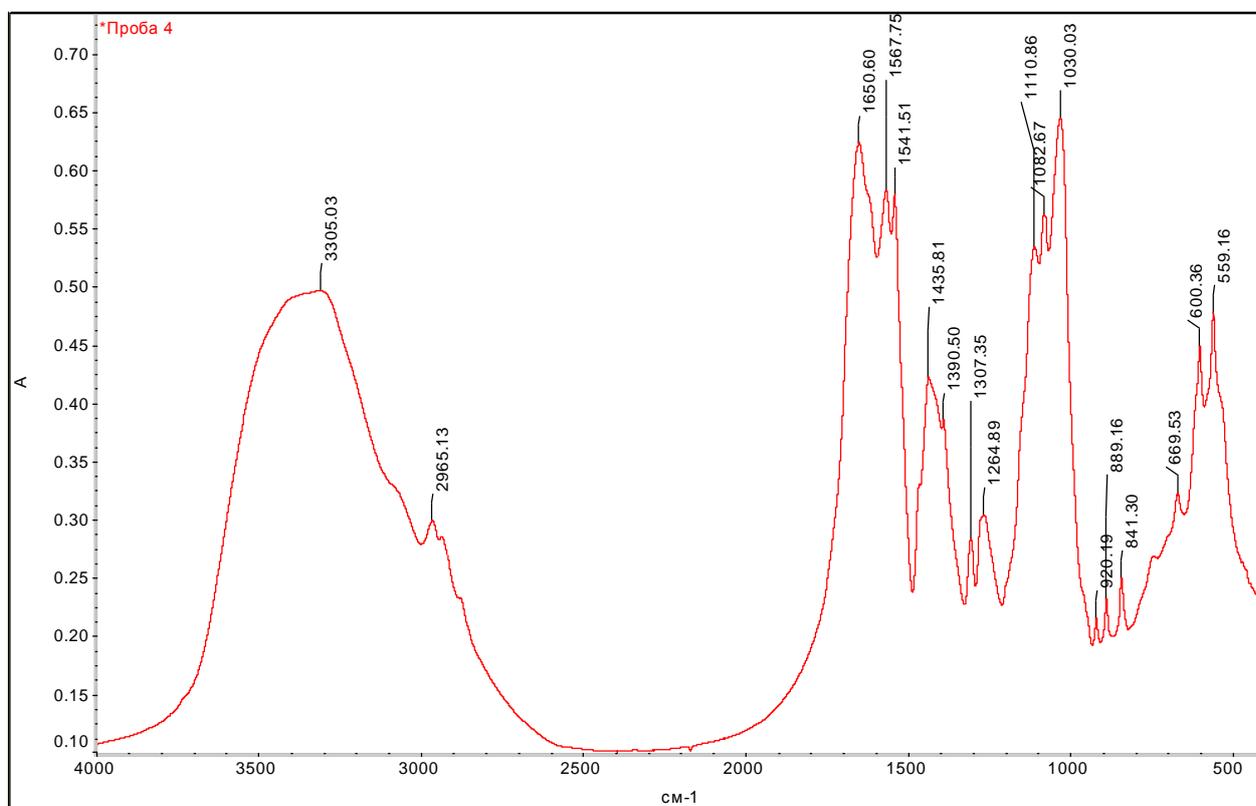


Рис. III.Б. ИК-спектр пробы 4 – ЭПС, синтезированные культурой *L.mesenteroides* на молочной сыворотке

Пт Окт 10 13:09:44 2014 (GMT+03:00)

ПОИСК ПИКОВ:

Спектр: *Проба 4
 Область: 4000.00 400.00
 Порог: 0.100
 Чувствительность 75
 Таблица пиков:

Положение:	559.16	Интенсивность:	0.477
Положение:	600.36	Интенсивность:	0.448
Положение:	669.53	Интенсивность:	0.322

Положение:	841.30	Интенсивность:	0.249
Положение:	889.16	Интенсивность:	0.231
Положение:	920.19	Интенсивность:	0.214
Положение:	1030.03	Интенсивность:	0.644
Положение:	1082.67	Интенсивность:	0.561
Положение:	1110.86	Интенсивность:	0.534
Положение:	1264.89	Интенсивность:	0.303
Положение:	1307.35	Интенсивность:	0.283
Положение:	1390.50	Интенсивность:	0.384
Положение:	1435.81	Интенсивность:	0.421
Положение:	1541.51	Интенсивность:	0.579
Положение:	1567.75	Интенсивность:	0.582
Положение:	1650.60	Интенсивность:	0.623
Положение:	2965.13	Интенсивность:	0.298
Положение:	3305.03	Интенсивность:	0.495

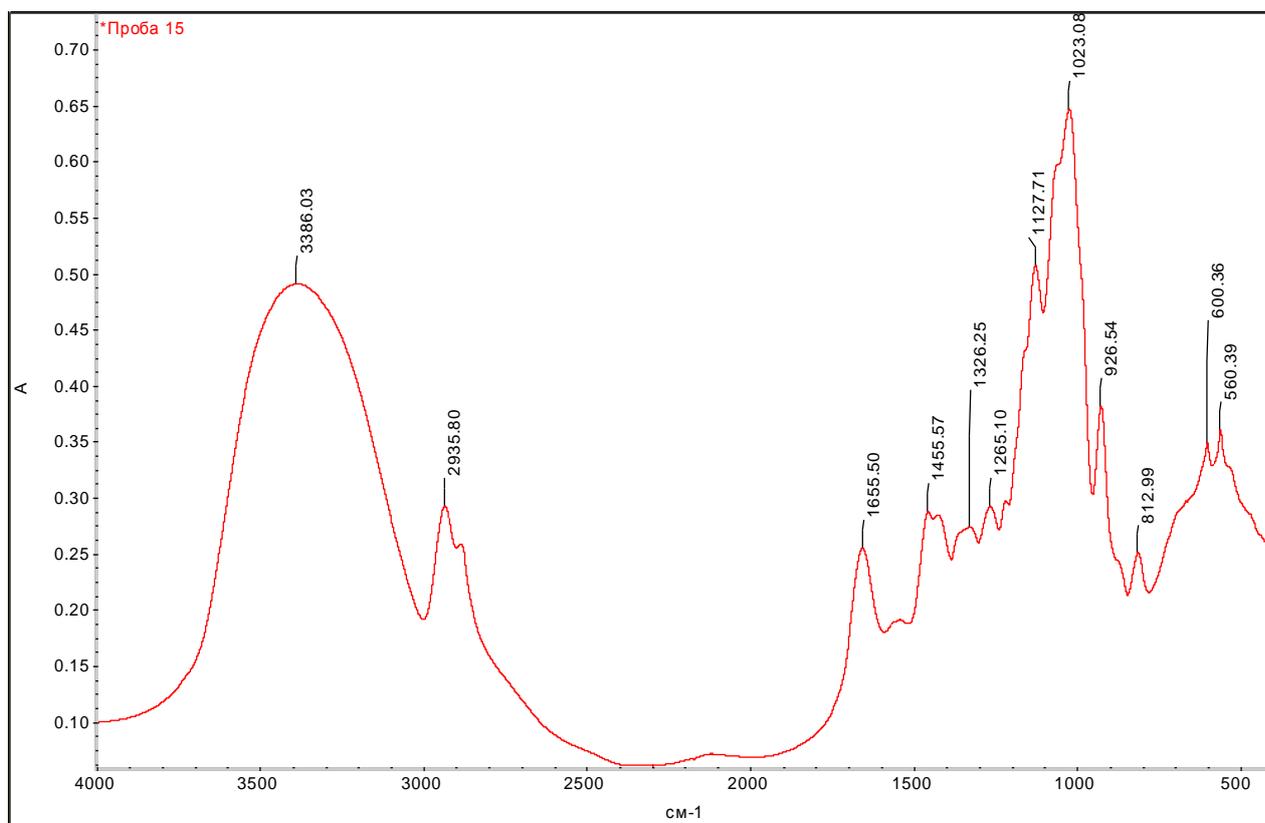


Рис. III.B. ИК-спектр пробы 15 – ЭПС, синтезированные *L.mesenteroides* на молочной сыворотке с добавлением 30 г/л сахарозы (периодическое культивирование при pH 6.0).

Пт Окт 10 13:10:41 2014 (GMT+03:00)

ПОИСК ПИКОВ:

Спектр: *Проба 15
 Область: 4000.00 400.00
 Порог: 0.060
 Чувствительность 75

Таблица пиков:

Положение:	560.39	Интенсивность:	0.360
Положение:	600.36	Интенсивность:	0.348
Положение:	812.99	Интенсивность:	0.250
Положение:	926.54	Интенсивность:	0.381
Положение:	1023.08	Интенсивность:	0.646

Положение:	1127.71	Интенсивность:	0.506
Положение:	1265.10	Интенсивность:	0.291
Положение:	1326.25	Интенсивность:	0.273
Положение:	1455.57	Интенсивность:	0.287
Положение:	1655.50	Интенсивность:	0.254
Положение:	2935.80	Интенсивность:	0.291
Положение:	3386.03	Интенсивность:	0.490

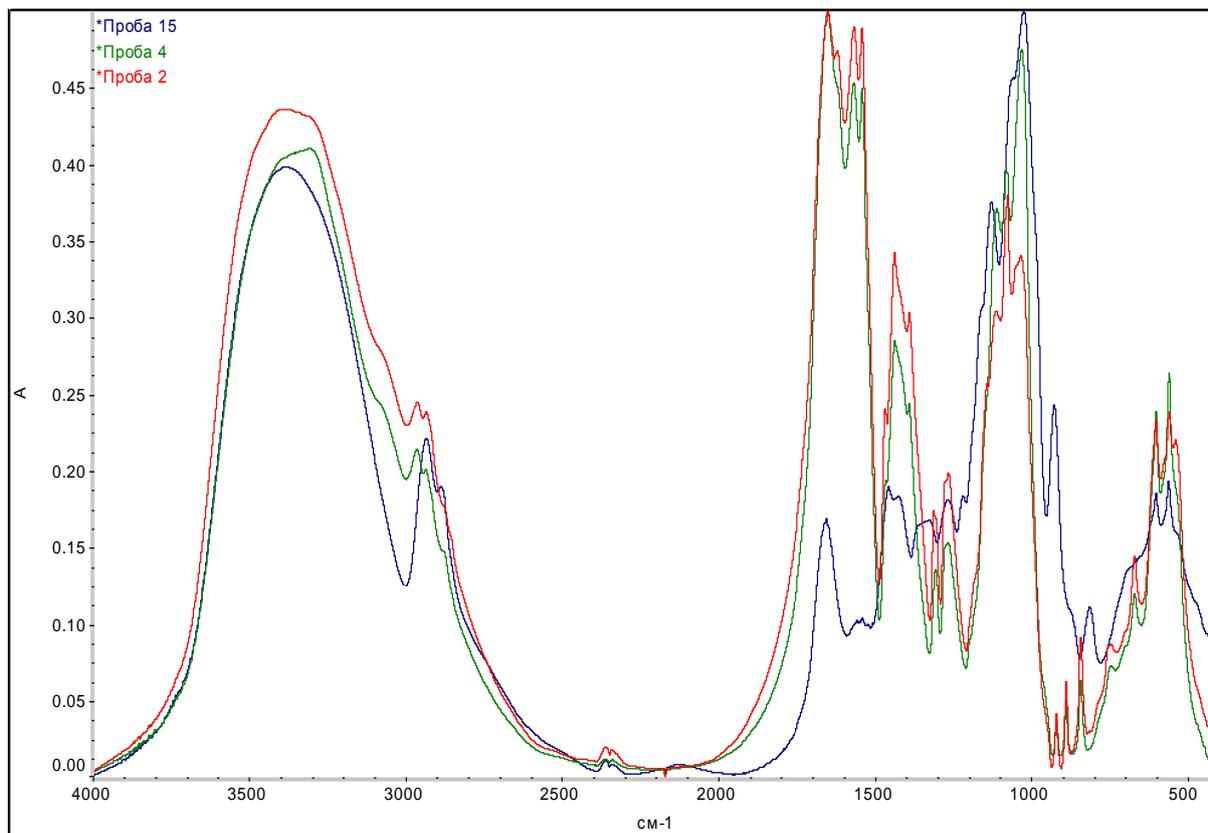
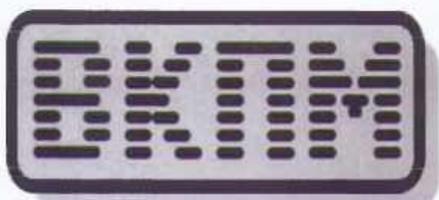


Рис. III.Г. Сравнение ИК-спектров трех образцов:

- проба 2 – ЭПС, синтезированные культурой *L.lactis* на молочной сыворотке;
- проба 4 – ЭПС, синтезированные культурой *L.mesenteroides* на молочной сыворотке;
- проба 15 – ЭПС, синтезированные *L.mesenteroides* на молочной сыворотке с добавлением 30 г/л сахарозы (периодическое культивирование при рН 6.0).



**Всероссийская Коллекция
Промышленных Микроорганизмов
ФГУП ГосНИИГенетика**

Россия, Москва, 117545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ФГУП ГосНИИГенетика - ВКПМ;
т. (095) 3151210; факс: (095) 3151210; Эл. почта: vkpm@genetika.ru;

Форма ВКПМ-ВР/4

№ 11942

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ)
ФГУП ГосНИИГенетика приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Leuconostoc mesenteroides 8

Дата депонирования: 06 апреля 2015 года

Депозитор: Российский химико-технологический университет
им. Д.И. Менделеева

Продукт, продуцируемый штаммом (область применения штамма):
Полисахарид кефиран

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-11942

Директор ВКПМ
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.