

УДК 637.1, 579.67

Базовые аспекты сохранности биологической целостности природных поливидовых симбиотических бактериальных сообществ для производства кефира

О. В. Соколова, О. Б. Федотова*

*Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, г. Москва, Россия;
e-mail: O_fedotova@vnimi.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9516-6123>

Информация о статье Реферат

Поступила
в редакцию
09.04.2024;

принята
к публикации
06.05.2024

Ключевые слова:

целостность,
целостность
биосистемы,
кефирные грибки,
кефир,
замораживание,
защитные среды

Неотъемлемым этапом в технологии изготовления кефира является использование кефирных грибков, в ряде случаев на заводе необходимо сохранять их популяцию. Удобным способом является замораживание, но при прямой заморозке кефирные грибки теряют активность, а некоторые микроорганизмы отмирают. Использование веществ с криопротекторными свойствами может способствовать сохранению кефирных грибков в условиях прямой заморозки. В исследовании рассмотрены три среды, обладающие потенциалом протекции симбиоза кефирных грибков в субкриоскопических условиях: обезжиренное стерильное молоко, желатоза и стерильный раствор 30%-й сахарозы, и одна среда, являющаяся стрессовой, – стерильная дистиллированная вода. На предыдущих этапах исследований доказано, что резкая дефростация усугубляет стрессовые явления бактериального сообщества, в частности способствует гибели поверхностных лактококков, что ведет к дисбактериозу симбиоза. В работе впервые использована периодическая схема дефростации кефирных грибков в условиях защитных сред; применяли методы визуальной и органолептической оценки, проводили исследования микробиологических и физико-химических показателей молока после ферментации кефирными грибами кефирной закваски. Смены молока проводили по технологии культивирования кефирных грибков с ежедневными пассажами. Принято, что если по совокупности показателей кефирные грибки из экспериментальных групп в течение 7 суток коррелируют с показателями, детектированными для контрольной группы, которая не подвергалась замораживанию, то принимается, что кефирные грибки полностью восстановили жизнеспособность. В случае если этого не происходит, делается вывод о невозможности восстановления симбиоза. В результате исследований доказана перспективность применения исследованных веществ в качестве защитных сред и обоснована необходимость конструирования специализированных криопротекторных сред для прямого замораживания кефирных грибков в целях создания собственных банков культуры кефира. Подход позволит снизить использование бактериальных заменителей для кефира наподобие заквасок прямого внесения.

Для цитирования

Соколова О. В. и др. Базовые аспекты сохранности биологической целостности природных поливидовых симбиотических бактериальных сообществ для производства кефира. Вестник МГТУ. 2024. Т. 27, № 2. С. 256–264. DOI: <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2024-27-2-256-264>.

The biological integrity of natural poly-species symbiotic bacterial communities for the production of kefir: Basic aspects of the preservation

Olga V. Sokolova, Olga B. Fedotova*

*All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russia;
e-mail: O_fedotova@vnimi.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9516-6123>

Article info

Received
09.04.2024;

accepted
06.05.2024

Key words:

integrity,
integrity
of the biosystem,
kefir grains,
kefir, freezing,
protective
environments

Abstract

An integral step in kefir production technology is the use of kefir grains, but in some cases it is necessary to maintain their population at the plant. A convenient method is freezing, but with direct freezing, kefir grains lose activity and some microorganisms die off. The use of substances with cryoprotective properties can help preserve kefir grains under direct freezing conditions. The study has examined three environments that have the potential to protect the symbiosis of kefir grains under subcryoscopic conditions: skim sterile milk, gelatin and a sterile solution of 30 % sucrose, and one environment that is stressful – sterile distilled water. At previous stages of research, it was proven that sharp defrosting aggravates the stress phenomena of the bacterial community, in particular, promotes the death of surface lactococci which leads to dysbacteriosis of the symbiosis. The work used for the first time a periodic scheme for defrosting kefir grains in a protective environment; the methods of visual and organoleptic assessment have been applied, the studies of microbiological and physico-chemical parameters of milk after fermentation of kefir starter with kefir grains have been conducted. Milk changes have been carried out using the technology of cultivating kefir grains with daily passages. It is accepted that if based on a set of indicators kefir grains from the experimental groups within 7 days correlate with the indicators detected for the control group, which was not subjected to freezing, then it is accepted that the kefir grains have completely restored viability. If this does not happen, a conclusion is drawn that the symbiosis has not been restored. As a result of the research, the prospects for using the studied substances as protective media have been proven and the need to construct specialized cryoprotective media for direct freezing of kefir grains in order to create your own kefir culture banks has been substantiated. The approach will reduce the use of bacterial substitutes for kefir like direct fermentation starters.

For citation

Sokolova, O. V. et al. 2024. The biological integrity of natural poly-species symbiotic bacterial communities for the production of kefir: Basic aspects of the preservation. *Vestnik of MSTU*, 27(2), pp. 256–264. (In Russ.) DOI: <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2024-27-2-256-264>.

Введение

Уникальное богатство ассортимента молочных продуктов Российской Федерации невозможно представить себе без кефира. Для изготовления кефира необходимо использование кефирных грибов, которые являются единственной в природе биологической симбиотической системой с эмерджентными свойствами.

На настоящий момент (*Gao et al., 2016*) доказано, что в состав кефирных грибов входят 715 видов микроорганизмов, доминирующим из них является *Lactobacillus kefiranofaciens*. Примечательно, что в зависимости от условий содержания и места культивирования кефирных грибов их микробный состав может значительно различаться, но основной микробиом представлен относительно постоянным бактериальным составом. Исследователи кефирных грибов сходятся во мнении, что микрофлора кефирных грибов заселяет образуемый ими же полисахаридный матрикс, называемый кефиран. Основную роль в образовании кефирана отводят молочнокислым микроорганизмам, молочным дрожжам, бифидобактериям, уксуснокислым бактериям. Несмотря на длительное изучение процесса синтеза кефирана (*Enikeev, 2011*) и функционирование его микробиома, исследователи еще не полностью понимают механизмы взаимодействия внутри системы.

В процессе культивирования кефирных грибов увеличивается масса и объем кефирана, происходит прирост микрофлоры, эти визуальные проявления называют ростом кефирных грибов.

При правильном культивировании кефирных грибов продуктами жизнедеятельности симбиоза являются не только непосредственно кефиран и микроорганизмы, заселяющие его, но и большое количество культуральной жидкости, которая применяется непосредственно для заквашивания молока и производства кефира. Эта культуральная жидкость, называемая кефирной закваской, используется для непосредственного внесения в молоко или для создания пересадочной закваски. Любой из алгоритмов приводит к созданию кисломолочного напитка кефир.

В процессе жизнедеятельности микробиома кефирных грибов и многоступенчатого сбраживания молока образуется продукт кефир, который обладает спектром уникальных характеристик. Медицинские исследования, проводимые в разные годы (*Vieira et al., 2021; Rosa et al., 2017; Gooruee et al., 2024; Yilmaz et al., 2022; Salari et al., 2021; Данилова и др., 2016; Гаврилова и др., 2014*), подтвердили положительный эффект от употребления кефира.

Как уже описано выше, технология изготовления кефира требует многостадийного подхода, причем каждый из них сопряжен с определенными трудностями, что и приводит к отказу от работы с кефирными грибами на уровне заводов. Дрожжи, входящие в симбиоз, для других технологий молочных продуктов являются нежелательными, приводящими молочные продукты к стремительной порче и потере потребительской привлекательности. В процессе жизнедеятельности дрожжи ферментируют углеводы с образованием углекислого газа и кислот. В совокупности продукция приобретает неприятный вкус, аромат и внешний вид. Причем для кефира комплекс таких характеристик является желательным.

Во избежание попадания дрожжей из закваски для кефира на линии по производству других молочных продуктов для работы с кефирными грибами и кефирными заквасками выделяют отдельные линии и отдельные помещения в цеху, часто называемые "кефирный цех". Отказ от работы с кефирными грибами бывает также спровоцирован тем, что симбиоз крайне чувствителен ко множеству факторов, в результате чего происходит спонтанная потеря активности, что недопустимо в современных реалиях промышленной переработки молока.

Стоит отметить, что основополагающим условием культивирования кефирных грибов является применение молока, гарантированно свободного от наличия любых ингибирующих веществ, особенно антибиотиков.

Спонтанное снижение активности кефирных грибов приводит к тому, что закваска не продуцируется в количествах, необходимых для сквашивания требуемых объемов молока при производстве кефира. Эта проблема в совокупности с общей трудоемкостью процесса привела к широкому распространению заквасок прямого внесения для кефира и кефирных напитков. Такие закваски за счет подобранных микробных композиций придают кисломолочному напитку вкус, максимально приближенный к кефиру на кефирных грибах. Тем не менее ряд микробиологических показателей и органолептическая гамма такого напитка отличаются от кефира на кефирных грибах (*Фомичев, 2016*).

Некоторые предприятия идут по пути отказа от производства кефира, в то время как другие стремятся сохранить кефирные грибки и восстановить популяцию в случае вышеупомянутой потери активности. Помочь в этом может создание собственного банка замороженных кефирных грибов.

Технологии замораживания известны и широко применяются в мире (*Фомичев, 2016*), но кефирные грибки значительно отличаются от других микробных сообществ. Структура кефирного грибка представляет сложную комменсалистическую систему, в которой изменение физического состояния всего симбиоза часто носит фатальный характер для части микробиоты.

В 60–70-х годах XX в. проводились исследования по режимам криоконсервирования кефирных грибов, в результате которых были разработаны режимы сублимирования кефирных биомасс, которые не приводят к гибели важных с точки зрения технологии и органолептики микроорганизмов и к разрушению кефирана. Технология была запатентована (*Способ...*, 1978) и не претерпела значительных изменений по настоящий момент.

В условиях действующих предприятий, особенно крупных, постановка технологий сублимирования кефирных грибов не представляется возможной в связи с нерациональностью и высокой трудоемкостью. Эта технология энергозатратна, требует специального оборудования и особых условий проведения работы по сушке, а также специализированного персонала по обеспечению процесса.

Высушивание как при повышенных, так и при пониженных температурах ведет к гибели части микробиома кефирных грибов, что приводит в свою очередь к потере целостности биосистемы. Такие кефирные грибки не восстанавливают активность и фактически деградируют после размораживания.

Негативным является и проявление микробиального дисбаланса внутри целостной биосистемы. Именно поэтому в случае применения технологий замораживания для бактериальных биомасс перспективно применение так называемых "защитных сред" (*Соколова, 2018*).

Вышеизложенные предпосылки легли в основу рабочей гипотезы о возможности предотвращения отмирания отдельных видов микроорганизмов при замораживании кефирных грибов в условиях защитных сред, что позволит сохранить целостность биосистемы.

Цель работы – исследовать сохранность симбиотических бактериальных сообществ для производства кефира в условиях заморозки с применением защитных сред.

Материалы и методы

Предпосылкой исследования является потребность смоделировать условия, которые возможно реализовать на предприятиях в случае необходимости резервирования кефирных грибов или создания их криобанка. В связи с этим представляет интерес изучение влияния различных сред для заморозки на выживаемость кефирных грибов и восстанавливаемость их после дефростации.

Из-за специфики межмикробного взаимодействия внутри целостной системы кефирных грибов для оценки выживаемости использовался подход шокового замораживания с различными веществами, обладающими криопротекторным потенциалом с последующей щадящей дефростацией и оценке комплекса характеристик.

Объектами исследования являлись кефирные грибки, не подвергавшиеся замораживанию и замороженные без веществ, обладающих криопротекторным потенциалом, называемые далее защитными средами. В качестве защитных сред были выбраны:

- обезжиренное стерильное молоко,
- желатоза стерильная,
- сахароза – 30%-й раствор стерильный.

В качестве отрицательного контрольного образца использовали кефирные грибки, замороженные в стрессовой среде. Предназначение стрессовой среды – усилить негативные явления, проявляющиеся в период хранения при температурах ниже субмикроскопических вплоть до экстремальных. В качестве стрессовой среды использовали стерильную дистиллированную воду. Учитывая, что вода имеет свойство образовывать кристаллы льда, которые согласно рабочей гипотезе приведут к разрыву и разрушению кефирных грибов, использование именно такой среды позволит спровоцировать наиболее негативную ситуацию в условиях заморозки.

Для удобства использовали условные обозначения для наименования защитных и стрессовой среды. Кефирные грибки, которые подвергали заморозке в стрессовой среде стерильной дистиллированной воды в работе названы группа "стресс"; три экспериментальные среды с потенциалом защитного действия названы "сах30", "мм" и "жел", что является стерильным 30%-м раствором лактозы мелкокристаллической ХЧ, обезжиренным стерильным молоком (обезжиренное стерильное молоко получали методом автоклавирования при температуре 110 °С в течение 3 мин) и желатозой соответственно. Контрольным образцом (контрольной группой) являлся кефирный грибок, который продолжали культивировать по принятой технологии.

Навески кефирных грибов в асептических условиях помещали в полимерные пакеты для отбора проб, в которых смешивали с защитными и стрессовой средами, после чего замораживали.

Поскольку кефирные грибки образуют кефиран разной формы и объема, сложно сделать равную выборку из биомассы без травмирования тела кефирных грибов. По этой причине было принято решение использовать объемно-массовые соотношения кефирных грибов к защитным средам. Исходя из предыдущего опыта работы с кефирными грибами, было определено соотношение кефирных грибов в защитной среде как 1 : 2. От культивируемого кефирного грибка отбирали части с массой приблизительно 30 г, помещали

в асептических условиях в стерильные пакеты для отбора проб, заливали эквивалентным объемом среды в соответствии с пропорцией таким образом, чтобы грибки были полностью покрыты средой и замораживали при температуре -18 ± 1 °С. Отсчет времени начала хранения в условиях заморозки считалось через три часа после постановки образцов. Образцы кефирных грибков в экспериментальных средах выдерживали при этой температуре 30 суток, после чего дефростировали в периодическом режиме.

Для этого вначале замороженные пакеты с образцами переносили в условия околонулевой температуры минус 1–2 °С для постепенной адаптации к нормальной температуре. Через 12 ч приступали к реализации периодической схемы. Для этого образцы дефростировали в режиме, при котором чередовали выдерживание кефирных грибков равными промежутками времени по 1–1,5 ч поочередно при температуре 22–24 °С и при температуре 8–10 °С. Ступенчатый режим позволял избежать резкого перепада температур. После полного оттаивания грибки экспонировали в течение 14–16 ч при температуре 8–10 °С.

Для восстановления жизнеспособности кефирных грибков создавались условия культивирования по принятой технологии. Для этого кефирные грибки несколько раз промывали пастеризованным охлажденным молоком для удаления остатков защитных сред и стрессовой среды, после чего помещали в обезжиренное пастеризованное охлажденное молоко при комнатной температуре. К применению в эксперименте допускали только молоко, которое было изначально проверено на отсутствие ингибирующих веществ и антибиотиков. Пастеризовали молоко при температуре 85 ± 1 °С, после чего охлаждали до температуры 20–25 °С и использовали в эксперименте.

Количество кефирных грибков к молоку составляло приблизительно 1 : 10. Ежедневно производили смену молока и органолептический анализ аналогичный тому, который проводили после дефростации. Также производили контрольные взвешивания для регистрации изменения массы кефирных грибков.

Молоко, сброженное кефирными грибами, по сути, должно представлять собой закваску на кефирных грибах. В нем проводили исследования органолептических показателей, микробиологическое исследование для определения количества дрожжей и осуществляли микроскопическое исследование микропрепаратов, изготовленных из кефирной закваски для косвенной оценки соответствия микробиома требуемым параметрам для кефирной закваски и кефира.

Исследования сброженного молока (кефирной закваски) проводили после отцеживания грибков. Поскольку на ход исследования может оказывать влияние нахождение в молоке углекислого газа, перед проведением исследований кефирную закваску прогревали на водяной бане с температурой 35 ± 1 °С в течение 10–15 мин, после чего охлаждали до температуры 20–24 °С, затем проводили микробиологические исследования.

Для определения количества дрожжей осуществляли посеы глубинным способом на питательную среду Сабуро агар 0,1 и 0,01 г кефирной закваски, после чего термостатировали посеы при 24 ± 1 °С в течение 3 суток, просматривали чашки Петри, не переворачивая для осуществления предварительного контроля, далее термостатировали при той же температуре еще 2 суток и производили окончательный подсчет результатов.

Сброженное молоко (кефирную закваску) подвергали анализу на общее содержание молочнокислых микроорганизмов. Исследование проводили двумя методами в соответствии с ГОСТ 32901 "Молоко и молочная продукция"¹. Использовали два режима термостатирования: в соответствии с ГОСТ температура инкубирования для мезофильных молочнокислых микроорганизмов – 32 ± 1 °С и температура изготовления кефира – 22–24 °С.

Для анализа с использованием стерильного обезжиренного молока проводили посеы разведений с 4 по 9 в две параллельные пробирки на каждое разведение. Посевы инкубировали при вышеуказанных температурах 32 ± 1 °С и 22–24 °С в течение 3 сут, после чего учитывали результаты и высчитывали НВЧ (наиболее вероятное число).

Из контрольной группы (которая не подвергалась замораживанию) были отобраны кефирные грибки массой приблизительно 30 г и помещены в те же температурно-временные условия, что и экспериментальные образцы на всех этапах, начиная с этапа экспонирования при температуре 8–10 °С в течение 14–16 ч.

При смене молока ежедневно проводили визуальный и органолептический анализ по выборочным показателям: внешний вид, запах, плотность грибков, наличие и распределение слизи, смываемость слизи, запах, в некоторых случаях дополнительно определяли вкус кефирной закваски. Для проведения органолептического анализа формировали мини-группы из трех человек, которые участвовали на равных в описывании всех органолептических характеристик. В результатах исследования приведены обобщенные результаты наблюдений.

¹ ГОСТ 32901-2014. Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа. М., 2015.

Первичные фоновые замеры включали в себя также определение массы кефирных грибков при каждой смене молока. Для определения массы грибков использовали одноразовые стерильные чашки Петри, на которых производили взвешивание кефирных грибков.

В процессе ежедневного культивирования велся журнал комплексной оценки изменения состояния кефирных грибков. В данном исследовании было принято, что точкой восстановления считается момент, когда кефирные грибки из экспериментальных групп показывают процентно-равные увеличения массы в сравнении с контрольной группой, а показатели кефирной закваски (молока после сбраживания) сравниваются с показателями контрольной группы. Если в течение 6–7 смен молока в условиях ежесуточных пассажей положительной динамики не отмечалось, то принималось, что кефирные грибки не восстанавливаются после замораживания.

Результаты и обсуждение

Отмечено, что перед началом процедуры дефростации все образцы имели оттенок желтизны, некоторыми воспринимаемый как слабо зеленоватый. Это является нормальным явлением для молока, и не представляет интереса для исследования. После дефростации окрашивание нивелировалось во всех образцах кроме группы "жел". Эта защитная среда оказала влияние на внешний вид грибков, что проявилось в виде желтоватого оттенка дефростированных образцов в то время, как остальные образцы имели белый цвет без оттенка. Вероятно, это связано с тем, что использованная желатоза имела достаточно яркое желтое окрашивание, что передалось на кефирные грибки. Примечательно, что внешний вид всех кефирных грибков после дефростирования отличался (табл. 1).

Таблица 1. Результаты фонового визуального и органолептического анализа кефирных грибков
Table 1. Results of background visual and organoleptic analysis of kefir grains

| Наименование образца | Результаты визуального осмотра | Фотография образца ² |
|--|--|--|
| Контрольный образец (контрольная группа) | Кефирные грибки оформленные, крупные, белые, равномерно покрыты белой слизью (слизь не липкая), при встряхивании на просмотровой дренажной поверхности слизь остается на грибках, грибки не разделяются на отдельные образования. Запах типичный для кефирных грибков, островатый, молочный, с тонами брожения. Консистенция кефирных грибков железистая, плотная |  |
| Кефирные грибки группы "стресс" | Грибки мельче, чем в контрольной группе, оформленные, очень плотные, белые с зеленоватым оттенком, выглядят сухими, слизи нет, но поверхность увлажненная. При встряхивании на дренажной просмотровой поверхности, разделяются на мелкие отдельные образования. Запах слабый, превалирует дрожжевой тон, чувствуется тон уксуса (видимо за счет наличия уксуснокислых бактерий). Консистенция кефирных грибков избыточно плотная |  |

² Фото авторов.

| | | |
|---------------------------------------|---|--|
| <p>Кефирные грибки группы "мм"</p> | <p>Грибки мелковатые, плохо оформленные, белые, слегка покрыты беловатой слизью, при помещении грибков на просмотровую дренажную поверхность слизь стекает, но грибки не разделяются на отдельные образования. Запах молочный, слабо ощущается дрожжевой запах. В общих чертах запах охарактеризован как "слабовыраженный". Консистенция кефирных грибков дряблая, плотности практически нет</p> |  |
| <p>Кефирные грибки группы "жел"</p> | <p>Грибки разного размера, оформленные, желтоватые, поверхность увлажненная, но не покрытая слизью. На просмотровой дренажной поверхности разделяются на крупные отдельные образования, в то время как мелкие образования не разделяются между собой. Запах молочный с посторонней нотой, ощущается типичный, но слабый запах кефира с присущей остротой. Консистенция кефирных грибков зависит от размера образования. Мелкие образования железистые, крупные – более рыхлые</p> |  |
| <p>Кефирные грибки группы "сах30"</p> | <p>Грибки мелкие, белые, покрыты прозрачно-беловатой слизью, на просмотровой дренажной поверхности грибки не разделяются на отдельные образования, но слизь стекает с их поверхности. Запах молочный, присущий кефиру, но сильно ощущается дрожжевой тон. Консистенция плотная, несмотря на то что грибки мелкие</p> |  |

На этапе анализа полученных данных фоновой органолептической оценки можно предположить, что воздействие желатозы на кефирные грибки носит отрицательный характер, так как в образцах группы "стресс" и группы "жел" органолептическая картина была схожей. В частности, кефирные грибки – наиболее мелкие из всех исследуемых, окрашивание, изначально принятое за переход пигмента желатозы, возможно, является признаком биологического изменения кефирных грибков, так как такое же окрашивание отмечается в образцах группы "стресс".

Исследование изменения массы кефирных грибков оказалось непоказательным в условиях такой короткой продолжительности восстановления биосистемы. Примечательно, что несмотря на небольшое увеличение биомассы кефирных грибков, значительно изменялся внешний вид в экспериментальных группах.

Так, в частности, в контрольной группе "жел" отмечено исчезновение желтизны после второго пассажа, а уже на четвертом пассаже обнаружено, что кефирные грибки полностью покрыты слизью, хотя

при фоновой оценке внешний вид этой экспериментальной группы был охарактеризован как наиболее приближенный к контрольной, что могло свидетельствовать о гибели поверхностной микрофлоры, отвечающей за внешнее слизьеобразование. При этом активность восстановления внешнего вида опровергает предыдущее мнение.

Микроскопические исследования сброженного молока (кефирной закваски) выявили, что во всех образцах присутствовала типичная для кефирной закваски микроскопическая картина. В микропрепаратах обнаружены дрожжевые клетки, кокки, в том числе диплококки и стрептококки, палочки разной длины и толщины, короткие цепочки палочек. Распределение микрофлоры было различным, в большом количестве полей микропирование осложнилось наличием крупных неклеточных образований. Предположительно этими образованиями были полисахаридные фрагменты кефирана или частицы казеиновых сгустков.

Отмечена низкая концентрация в полях зрения мазков в образцах группы "стресс", что также подтверждает аспекты редукции в результате замораживания в стрессовых условиях.

При исследовании количества дрожжей (табл. 2) вели регистрацию результатов, однако особенностью посева для контрольной группы являлось изменение условий инкубирования в связи с высокой активностью дрожжевой кефирной микрофлоры. Посевы прекратили инкубировать после 3 суток, так как количество и размер колоний после такой инкубации уже позволяли сделать учет результатов.

Таблица 2. Результаты исследования количества дрожжей как показателя зрелости кефирной закваски
Table 2. Results of studying the amount of yeast as an indicator of the kefir starter maturity

| Условное наименование экспериментальных образцов | Количество дрожжей кефирной закваски | | | | | | | |
|--|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | фон | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| контрольная группа | $2,3 \times 10^4$ | $3,8 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^4$ | $2,7 \times 10^4$ | $6,4 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^4$ | $3,6 \times 10^4$ | $5,2 \times 10^4$ |
| группа "стресс" | $4,0 \times 10^2$ | $3,8 \times 10^2$ | $4,1 \times 10^2$ | $2,3 \times 10^2$ | $5,4 \times 10^2$ | $7,3 \times 10^2$ | $1,8 \times 10^3$ | $6,2 \times 10^3$ |
| группа "сах30" | $2,1 \times 10^3$ | $5,8 \times 10^3$ | $2,4 \times 10^3$ | $2,1 \times 10^3$ | $9,4 \times 10^2$ | $1,1 \times 10^3$ | $3,4 \times 10^3$ | $1,3 \times 10^4$ |
| группа "мм" | $1,1 \times 10^3$ | $1,1 \times 10^3$ | $3,8 \times 10^3$ | $2,4 \times 10^3$ | $5,7 \times 10^3$ | $1,4 \times 10^4$ | $2,3 \times 10^4$ | $1,8 \times 10^4$ |
| группа "жел" | $2,5 \times 10^3$ | $3,3 \times 10^3$ | $4,6 \times 10^3$ | $5,3 \times 10^3$ | $8,6 \times 10^3$ | $1,0 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^4$ |

В контрольной группе во всех измерениях количество дрожжей составляло более 1×10^4 КОЕ/г, что подтверждает зрелость кефирной закваски и указывает на активное развитие кефирных грибков.

В экспериментальных образцах группы "стресс" количество дрожжей с 1 по 5 сутки не превышало $7,3 \times 10^2$ КОЕ/г, а далее поднялось и достигло $6,2 \times 10^3$ КОЕ/г на момент последнего пассажа. Несмотря на то что данное значение приближено к минимально допустимому значению по ТР ТС 031/2013 "О безопасности молока и молочной продукции"³, в случае если бы эту кефирную закваску использовали для приготовления кефира, количество микрофлоры и активность закваски не позволили бы получить продукт должного качества.

Самое большое количество дрожжей было отмечено в образцах группы "сах30", причем в первые два пассажа количество дрожжей в отдельных образцах достигало $5,8 \times 10^3$ КОЕ/г, после чего снизилось почти на порядок, затем опять стало расти, сравнявшись с показателями контрольной группы. Предположительно это связано с тем, что невзирая на промывку в матрице оставалась сахароза, которая являлась субстратом для роста и развития дрожжей. После двух пассажей остаточная сахароза вымылась из матрикса, что сопровождалось понижением активности дрожжей, после чего симбиоз начал функционировать с обычной для кефирных грибков интенсивностью.

Кефирные грибки групп "мм" и "жел" характеризовались схожим характером нарастания количества дрожжей. Первые два пассажа количество дрожжей составляло $(1-2,5) \times 10^3$ КОЕ/г, при каждом следующем пассаже количество возрастало, и после пятого пассажа превысило требуемые значения – более 1×10^4 КОЕ/г.

Проведенные исследования количества молочнокислых микроорганизмов в кефирной закваске оказались недостаточно показательными. Не было отмечено значимой динамики в процессе восстановления кефирных грибков. Это может быть связано с большим количеством микроорганизмов, входящих в симбиоз. В результате их жизнедеятельности проявляется положительный результат на пробирках со стерильным обезжиренным молоком, учитываемый при учете результатов методом НВЧ. В процессе наблюдений отмечено, что несмотря на одинаковый результат, внешний вид посевов значительно отличался. Так, в пробах, инкубируемых при температуре 22–24 °С, образованный сгусток имел однородную, но немного пузырящуюся структуру, в то время, как пробы, инкубируемые при температуре 32 ± 1 °С, имели выражено бродящий вид. При сопоставлении результатов наблюдений при исследовании количества молочнокислых микроорганизмов с результатами исследования количества дрожжей проведена корреляция между количеством дрожжей и внешним видом пробирок, засеянных для исследования количества молочнокислых микроорганизмов. Вероятно, такой внешний вид был вызван развитием дрожжевой микрофлоры. Количество молочнокислых

³ Технический регламент Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции" (ТР ТС 031/2013). С изменениями на 23 сентября 2022 года.

микроорганизмов во всех образцах – и контрольном, и экспериментальных – составляло от $1,1 \times 10^7$ до $2,5 \times 10^9$ КОЕ/г. Учитывая, что требование ТР ТС 031/2013 "О безопасности молока и молочной продукции"⁴ не распространяется на закваску для кефира и содержит требование к количеству молочнокислых микроорганизмов в кисломолочных напитках (в том числе в кефире) – не менее 1×10^7 КОЕ/г, все образцы молока от кефирных грибков могут быть позиционированы как соответствующие требованию для кефира.

Заключение

Подтверждена рабочая гипотеза о криопротекторных свойствах защитных сред для замораживания кефирных грибков. Исследования доказали, что использование 30%-го раствора сахарозы, обезжиренного молока и желатозы повышают выживаемость кефирных грибков и позволяют ускорить их регенерацию. Доказана перспективность использования защитных сред для замораживания кефирных грибков в целях резервирования или создания банка кефирных грибков на предприятии. В последующих исследованиях целесообразна разработка специализированной среды с криопротекторными свойствами для прямого замораживания кефирных грибков в условиях предприятий.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Библиографический список

- Гаврилова Н. Н., Баркова М. В. О кефире и его пользе // Сетевой научный журнал ОрелГАУ. 2014. № 2(3). С. 3–4. EDN: TKQUNR.
- Данилова О. А., Грязина Ф. И., Евсюткина Е. А. Полезные свойства кефира и требования к его качеству // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства. 2016. № 18. С. 121–123. EDN: WYKSKZ.
- Соколова О. В. Перспективный подход к резервированию кефирных грибков в условиях заморозки // Научное обеспечение инновационных технологий производства и хранения сельскохозяйственной и пищевой продукции : сб. материалов I Междунар. науч.-практ. конф., Краснодар, 9–23 апреля 2018 г. Краснодар : ГНУ ВНИИТТИ, 2018 г. С. 366–370. EDN: UWXMSE.
- Способ консервирования кефирных грибков : № 2431605/28-13 : А. с. № 599787 СССР, МПК А23С 9/12 / заявлено 16.12.1976 : опубликовано 30.03.1978 / И. В. Лагода, Л. А. Банникова, Н. А. Бавина, И. В. Рожкова [и др.] ; заявитель ВНИИМ. 6 с.
- Фомичев Ю. П. Кефир и кефирный продукт. История, характеристика, свойства, технология, экспертиза. Дубровицы, 2016. 40 с.
- de Oliveira Filho J. G., de Oliveira Silva C., Egea M. B., de Azeredo H. M. C. [et al.]. Employing alternative culture media in kefir exopolysaccharide production: Impact on microbial diversity, physicochemical properties, and bioactivities // International Journal of Biological Macromolecules. 2023. Vol. 246. Article number: 125648. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125648>.
- Enikeev R. R. Characterization, biosynthesis and biological effect of the kefir grains polysaccharide – kefiran // Биофармацевтический журнал. 2011. Т. 3, № 3. С. 11–18. EDN: OJJFLV.
- Gao X., Li B. Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review // Cogent Food & Agriculture. 2016. Vol. 2, Iss. 1. Article number: 1272152. DOI: <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1272152>.
- Gooruee R., Pahlavani N., Hadi V., Hadi S. Evaluation of the effect of kefir supplementation on inflammatory markers and clinical and hematological indices in COVID-19 patients; a randomized double-blinded clinical trial // Advances in Integrative Medicine. 2024. Vol. 11, Iss. 1. P. 10–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aimed.2023.10.006>.
- Rosa D. D., Dias M. M. S., Grześkowiak Ł. M., Reis S. A. [et al.]. Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits // Nutrition Research Reviews. 2017. Vol. 30, Iss. 1. P. 82–96. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0954422416000275>.
- Salari A., Ghodrati S., Gheflati A., Jarahi L. [et al.]. Effect of kefir beverage consumption on glycemic control: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials // Complementary Therapies in Clinical Practice. 2021. Vol. 44. Article number: 101443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2021.101443>.
- Vieira C. P., Rosario A. I. L. S., Lelis C. A., Rekowski B. S. S. [et al.]. Bioactive compounds from kefir and their potential benefits on health: A systematic review and meta-analysis // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2021. Vol. 2021. Article number: 9081738. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/9081738>.
- Yilmaz B., Sharma H., Melekoglu E., Ozogul F. Recent developments in dairy kefir-derived lactic acid bacteria and their health benefits // Food Bioscience. 2022. Vol. 46. Article number: 101592. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101592>.

⁴ Технический регламент Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции" (ТР ТС 031/2013). С изменениями на 23 сентября 2022 года.

References

- Gavrilova, N. N., Barkova, M. V. 2014. About kefir and its benefits. *Setevoy nauchnyy zhurnal OrelGAU*, 2(3), pp. 3–4. EDN: TKQUHR. (In Russ.)
- Danilova, O. A., Gryazina, F. I., Evsyutkina, E. A. 2016. Useful properties of kefir and requirements for its quality. *Aktual'nyye voprosy sovershenstvovaniya tekhnologii proizvodstva i pererabotki produktsii sel'skogo khozyaystva*, 18, pp. 121–123. EDN: WYKSKZ. (In Russ.)
- Sokolova, O. V. 2018. A promising approach to reserving kefir grains under freezing conditions. Coll. of articles of the I Intern. scien.-pract. conf. *Scientific support of innovative technologies for the production and storage of agricultural and food products*, 9–23 April, 2018. Krasnodar, pp. 366–370. EDN: UWXMSE. (In Russ.)
- Lagoda, I. V., Bannikova, L. A., Bavina, N. A., Rozhkova, I. V. et al. All-Russian Dairy Research Institute. 1978. Method for preserving kefir grains, Russian Federation, Pat. 2431605. (In Russ.)
- Fomichev, Yu. P. 2016. Kefir and kefir product. History, characteristics, properties, technology, expertise. Dubrovitsy. (In Russ.)
- de Oliveira, Filho J. G., de Oliveira, Silva C., Egea, M. B., de Azeredo, H. M. C. et al. 2023. Employing alternative culture media in kefir exopolysaccharide production: Impact on microbial diversity, physicochemical properties, and bioactivities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 246. Article number: 125648. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125648>.
- Enikeev, R. R. 2011. Characterization, biosynthesis and biological effect of the kefir grains polysaccharide – kefiran. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*, 3(3), pp. 11–18. EDN: OJJFLV.
- Gao, X., Li, B. 2016. Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1). Article number: 1272152. DOI: <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1272152>.
- Gooruee, R., Pahlavani, N., Hadi, V., Hadi, S. 2024. Evaluation of the effect of kefir supplementation on inflammatory markers and clinical and hematological indices in COVID-19 patients; a randomized double-blinded clinical trial. *Advances in Integrative Medicine*, 11(1), pp. 10–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aimed.2023.10.006>.
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, L. M., Reis, S. A. et al. 2017. Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), pp. 82–96. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0954422416000275>.
- Salari, A., Ghodrati, S., Gheflati, A., Jarahi, L. et al. 2021. Effect of kefir beverage consumption on glycemic control: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 44. Article number: 101443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2021.101443>.
- Vieira, C. P., Rosario, A. I. L. S., Lelis, C. A., Rekowsky, B. S. S. et al. 2021. Bioactive compounds from kefir and their potential benefits on health: A systematic review and meta-analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. Article number: 9081738. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/9081738>.
- Yilmaz, B., Sharma, H., Melekoglu, E., Ozogul, F. 2022. Recent developments in dairy kefir-derived lactic acid bacteria and their health benefits. *Food Bioscience*, 46. Article number: 101592. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101592>.

Сведения об авторах

Соколова Ольга Вячеславовна – ул. Люсиновская, 35/7, г. Москва, Россия, 115093; Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, канд. техн. наук, соискатель; e-mail: ol.moloko@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9516-6123>

Olga V. Sokolova – 35/7 Lyusinovskaya Str., Moscow, Russia, 115093; All-Russian Dairy Research Institute, Cand. Sci. (Engineering), Applicant; e-mail: ol.moloko@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9516-6123>

Федотова Ольга Борисовна – ул. Люсиновская, 35/7, г. Москва, Россия, 115093; Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, д-р техн. наук, вед. науч. сотрудник; e-mail: O_fedotova@vnimi.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9516-6123>

Olga B. Fedotova – 35/7 Lyusinovskaya Str., Moscow, Russia, 115093; All-Russian Dairy Research Institute, Dr. Sci. (Engineering), Leading Scientific Researcher; e-mail: O_fedotova@vnimi.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9516-6123>