

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2456>
<https://elibrary.ru/SOJITN>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Динамика изменения бактериального состава молочной основы в процессе ферментации



М. В. Грязнова¹, И. Ю. Буракова¹, Ю. Д. Смирнова¹,
Е. Ю. Нестерова^{1,2}, Н. С. Родионова¹, Е. С. Попов¹,
М. Ю. Сыромятников^{1,2,*}, В. Н. Попов^{1,2}

¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий^{ROR}, Воронеж, Россия

² Воронежский государственный университет^{ROR}, Воронеж, Россия

Поступила в редакцию: 27.02.2023

Принята после рецензирования: 03.05.2023

Принята к публикации: 06.06.2023

*М. Ю. Сыромятников: syromyatnikov@bio.vsu.ru,

<https://orcid.org/0000-0001-9028-0613>

М. В. Грязнова: <https://orcid.org/0000-0003-2076-3868>

И. Ю. Буракова: <https://orcid.org/0000-0002-5881-0845>

Ю. Д. Смирнова: <https://orcid.org/0000-0002-5820-1804>

Е. Ю. Нестерова: <https://orcid.org/0000-0003-0918-3547>

Н. С. Родионова: <https://orcid.org/0000-0002-6940-7998>

Е. С. Попов: <https://orcid.org/0000-0003-3303-3434>

В. Н. Попов: <https://orcid.org/0000-0003-1294-8686>

© М. В. Грязнова, И. Ю. Буракова, Ю. Д. Смирнова,

Е. Ю. Нестерова, Н. С. Родионова, Е. С. Попов,

М. Ю. Сыромятников, В. Н. Попов, 2023



Аннотация.

Пробиотическая закваска – это биопрепарат на основе молочнокислых бактерий. Метаболические характеристики заквасок имеют значение для свойств ферментированных продуктов и определения потенциальной активности микроорганизмов. Цель исследования заключалась в оценке бактериального состава заквасочной культуры в различные промежутки времени в процессе ферментации при приготовлении пробиотического кисломолочного продукта.

В исследовании использовали закваску для приготовления пробиотического кисломолочного продукта, включающую *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophiles*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactocaseibacillus casei*. Объектом ферментации являлось пастеризованное молоко. Отбор проб проводили на протяжении всего процесса ферментации (0, 3, 6, 9, 12, 15 и 18 ч). Для определения бактериального состава использовали метод секвенирования нового поколения, направленный на исследование V3 участка гена 16S рНК.

В процессе ферментации выявлено снижение *Bifidobacterium* и преобладание *Lactobacillus*. Пик их обильности в исследуемом субстрате составил 97,5 % на 15 ч ферментации. В каждой контрольной точке ферментации наблюдалось снижение численности *Streptococcus*. Род *Lactobacillus* заместил все другие роды бактерий, включая *Bifidobacterium*, что объясняется снижением pH в процессе ферментации. Для ферментации продолжительностью 18 ч были достигнуты оптимальные значения для увеличения численности рода *Lactobacillus* (pH = 4,2–4,4), но они оказались низкими для продуктивного роста *Bifidobacterium*.

Проведенное исследование продемонстрировало динамику изменения бактериального состава молочной основы в процессе ферментации. Высокопроизводительное секвенирование является хорошим инструментом для контроля процессов ферментации пробиотиков.

Ключевые слова. Микробиом, пробиотический кисломолочный продукт, ферментация, заквасочная бактериальная культура, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, секвенирование 16S рНК, индекс Шеннона, величина pH

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России)^{ROR} в рамках национального проекта «Наука» (проект FZGW-2020-0001, уникальный номер реестра государственных заданий 075001X39782002) и Российского научного фонда (РНФ)^{ROR} (проект № 21-74-00065) в части исследования биоразнообразия бактерий в закваске и продуктах ферментации.

Для цитирования: Динамика изменения бактериального состава молочной основы в процессе ферментации / М. В. Грязнова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 3. С. 554–564. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2456>

Bacterial Composition of Dairy Base during Fermentation



Mariya V. Gryaznova¹, Inna Yu. Burakova¹,
Yuliya D. Smirnova¹, Ekaterina Yu. Nesterova^{1,2},
Natalia S. Rodionova¹, Evgeniy S. Popov¹,
Mikhail Yu. Syromyatnikov^{1,2,*}, Vasily N. Popov^{1,2}

¹ Voronezh State University of Engineering Technologies^{ROR}, Voronezh, Russia

² Voronezh State University^{ROR}, Voronezh, Russia

Received: 27.02.2023

Revised: 03.05.2023

Accepted: 06.06.2023

*Mikhail Yu. Syromyatnikov: syromyatnikov@bio.vsu.ru,
<https://orcid.org/0000-0001-9028-0613>

Mariya V. Gryaznova: <https://orcid.org/0000-0003-2076-3868>

Inna Yu. Burakova: <https://orcid.org/0000-0002-5881-0845>

Yuliya D. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0002-5820-1804>

Ekaterina Yu. Nesterova: <https://orcid.org/0000-0003-0918-3547>

Natalia S. Rodionova: <https://orcid.org/0000-0002-6940-7998>

Evgeniy S. Popov: <https://orcid.org/0000-0003-3303-3434>

Vasily N. Popov: <https://orcid.org/0000-0003-1294-8686>

© M.V. Gryaznova, I.Yu. Burakova, Yu.D. Smirnova, E.Yu. Nesterova,
N.S. Rodionova, E.S. Popov, M.Yu. Syromyatnikov, V.N. Popov, 2023



Abstract.

Probiotic starters are a biological product based on lactic acid bacteria. Their metabolic characteristics determine the properties of the final products. This study evaluated the bacterial composition of a starter culture at various time intervals during the fermentation of a probiotic dairy product.

The starter consisted of *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophiles*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactocaseibacillus casei*. Pasteurized milk served as the object of fermentation. The starter culture was activated in sterilized skimmed milk. Sampling occurred throughout the entire fermentation process (0, 3, 6, 9, 12, 15, and 18 h). To determine the microbiome of the substrates, the authors used the next-generation high-throughput sequencing that targeted V3 of 16S rRNA gene.

The fermentation resulted in a decrease in *Bifidobacterium* and an increase in *Lactobacillus*, which peaked (97.5%) after 15 h of fermentation. Each sampling showed that the count of *Streptococcus* went down. Eventually, *Lactobacillus* replaced all other genera, including *Bifidobacterium*, probably, as a result of pH going down during fermentation. The optimal values for the proliferation of *Lactobacillus* (pH = 4.2–4.4), which were registered after 18 h, turned out to be too low for the productive growth of *Bifidobacterium*.

The research demonstrated the changes in the bacterial composition of the dairy base during fermentation. The high-throughput sequencing proved to be an efficient tool in controlling probiotic fermentation processes.

Keywords. Bacterial composition, probiotic dairy product, fermentation, starter bacterial culture, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, 16S rRNA sequencing, Shannon index, pH value

Funding. The research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minobrnauki)^{ROR} as part of the national project “Science” (FZGW-2020-0001, register no. 075001X39782002) and by the Russian Science Foundation (RSF)^{ROR} (project no. 21-74-00065) as part of studies of biodiversity of bacterial starter culture and fermentation products.

For citation: Gryaznova MV, Burakova IYu, Smirnova YuD, Nesterova EYu, Rodionova NS, Popov ES, *et al.* Bacterial Composition of Dairy Base during Fermentation. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(3):554–564. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2456>

Введение

Ферментация – это биотехнологический метод, возникший из-за необходимости сохранения пищевых продуктов [1]. Закваска представляет собой

сложный микробный биопрепарат, основу которого составляют представители молочнокислых бактерий. Их ферментация придает готовому продукту такие характерные черты, как вкус и высокие

органолептические качества. Молочнокислые бактерии представляют интерес для пищевой промышленности, т. к. производят молочную кислоту в процессе брожения [2, 3]. Это соединение может ингибировать развитие патогенных микроорганизмов и микроорганизмов, вызывающих порчу продукции и способных снизить качество готового продукта, что способствует увеличению срока годности ферментированных пищевых продуктов [1]. Метаболические характеристики заквасок являются ключевыми для конечных свойств ферментированных продуктов [4, 5].

В состав закваски для приготовления пробиотиков входят такие бактерии, как *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Бактерии должны быть жизнеспособными, а общая нагрузка двух видов должна составлять 10^7 КОЕ/г [6]. Хотя эти два вида являются основными для производства кисломолочных продуктов, могут встречаться и другие виды молочнокислых бактерий [7].

Использование в закваске бактерий для ускорения процесса ферментации, таких как *S. salivarius* ssp. *thermophilus* и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, обладает преимуществом, т. к. эти два рода находятся в симбиотических отношениях при производстве йогурта [8]. Однако из-за образования ингибирующих соединений и/или конкуренции за питательные вещества *S. salivarius* ssp. *thermophilus* и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* при производстве йогурта могут снижать жизнеспособность пробиотических штаммов, добавленных в эти продукты [9, 10].

В пищевой промышленности наибольшее количество продуктов и напитков с пробиотиками производится с использованием молочной основы из-за того, что молочные продукты являются хорошим материалом для доставки пробиотиков человеку [11]. Пробиотики на основе лактобактерий обладают такими важными свойствами, как высокая толерантность к кислоте и желчи, способность фиксироваться на поверхности кишечника, нечувствительность к низким значениям pH и желудочному соку, антимикробная активность, нечувствительность к антибиотикам, удаление холестерина и продукции экзополисахаридов в организме [12].

Lactobacillus acidophilus и *Lacticaseibacillus casei* (предыдущее название *Lactobacillus casei*) – грамположительные пробиотические бактерии, широко используемые в промышленности. Их способность увеличивать бактериальную нагрузку и сокращать время ферментации делает их выгодными для производителей [13].

Бактерии рода *Bifidobacterium* часто используют для производства пробиотических продуктов, т. к. они являются прототипом пробиотиков, в норме обитающих в желудочно-кишечном тракте человека, а также обладают разнообразными механизмами

резистентности к желчным кислотам, что важно для появления пробиотического действия [14, 15]. *Bifidobacterium* способны подавлять рост условно-патогенных бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* и *Bacillus subtilis* [15]. Исследования пробиотических свойств бифидобактерий, добавляемых в детское питание, продемонстрировали их положительное влияние на детей с аллергией, диареей и другими заболеваниями [16].

К преимуществам *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* для здоровья человека относится способность снижать уровень холестерина в сыворотке крови, обеспечивать защиту от колоректального рака, регулировать время прохождения через кишечник и запоры, уменьшать воспаление кишечника за счет поддержания благоприятного баланса микробиоты [17].

Bifidobacterium longum – это бифидобактерии, обладающие высоким потреблением фруктозы и скоростью разложения олигофруктозы, а также способные к частичному расщеплению инулина [18]. Этот род бактерий является одним из доминирующих для микробиоты желудочно-кишечного тракта человека, поэтому может иметь потенциал в качестве пробиотиков [19].

Изучение микробного состава закваски актуально для определения потенциальной активности микроорганизмов в ней [20]. Различные кислоты и ферменты, продуцируемые микробной культурой, влияют на вкус, консистенцию и срок годности готового продукта [21]. Микроорганизмы, используемые для производства продуктов молочной кислоты, в том числе добавленные в качестве пробиотиков, могут влиять на микробиом кишечника человека [22].

Однако зачастую неясно, в каких количествах остаются полезные бактерии после процесса ферментации в конечном кисломолочном продукте. Цель данного исследования заключалась в оценке бактериального состава пробиотического кисломолочного продукта в различные промежутки времени (0, 3, 6, 9, 12, 15 и 18 ч) ферментации с помощью высокопроизводительного секвенирования нового поколения.

Объекты и методы исследования

Объекты исследования. В состав закваски для приготовления пробиотического кисломолочного продукта входили следующие бактерии: *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (10^6 КОЕ/г), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (10^9 КОЕ/г), *Bifidobacterium bifidum* (10^9 КОЕ/г), *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (10^9 КОЕ/г), *Bifidobacterium longum* (10^9 КОЕ/г), *Lactobacillus acidophilus* (10^9 КОЕ/г) и *Lacticaseibacillus casei* (10^9 КОЕ/г). Культуры бактерий, используемых в качестве закваски, были ранее изолированы из кисломолочных продуктов и депонированы в микробиологическом музее Воро-

нежского государственного университета инженерных технологий (ВГУИТ). Бактерии предварительно были проверены на способность роста в питательной среде на основе обезжиренного молока.

Все этапы исследования были проведены на базе лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий ВГУИТ.

Ферментация. Закваску активировали в 100 мл стерилизованного (температура 121 ± 2 °C, выдержка 13 ± 2 мин) и охлажденного до температуры 39 ± 1 °C обезжиренного молока с последующим внесением 0,7 г сухой закваски. Для активации микробных клеток закваску тщательно перемешивали и выдерживали 4,0 ч при температуре 37 ± 1 °C. Через 1 и 2 ч после начала активации суспензию бактерий снова перемешивали (встряхиванием) для равномерного распределения бактериальных клеток по массе. Полученную активированную закваску (без образования сгустка) сразу после активации добавляли при перемешивании в пастеризованное (92 ± 2 °C, выдержка 2–8 мин) и охлажденное (37 – 42 °C) молоко в количестве не менее 0,5 мл/кг ферментированной смеси.

Отбор проб проводили на протяжении всего процесса ферментации. Контрольные точки: сразу после внесения бактериальной культуры в пастеризованное молоко (0 ч) и через 3, 6, 9, 12, 15 и 18 ч ферментации. Был проанализирован состав исходной закваски и молока, используемых для приготовления конечного продукта.

Конечный химический состав пробиотического кисломолочного продукта: жиры – 1,2 г/100 г, белки – 2,8 г/100 г, углеводы – 10,5 г/100 г, энергетическая ценность – 64,0 ккал/100 г.

Секвенирование участка гена 16S рПНК. В начале работы по подготовке библиотек секвенирования из полученных образцов выделяли тотальную ДНК с помощью коммерческого набора Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу.

Для метода секвенирования на платформе Ion Torrent PGM был выбран анализ гипервариабельной области V3 гена 16S рПНК.

Амплификацию этого участка проводили с использованием универсальных праймеров (337F 5'-GACTCCTACGGGAGGCGWGCAG-3' и 518R 5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3') и набора 5X Screen Mix-HS Master Mix (Евроген, Россия). ПЦР-анализ проводили в следующих условиях: денатурация при 94 °C в течение 4 мин; 35 циклов денатурации при 94 °C в течение 30 с; отжиг праймера при 53 °C в течение 30 с и удлинение при 72 °C в течение 30 с. Затем продукты ПЦР очищали с использованием магнитных частиц AMPureXP (BeckmanCoulter, США).

Из очищенных продуктов ПЦР готовили библиотеки секвенирования с использованием набора NEB Next Fast DNA (New England Biolabs, США) на

основе протокола производителя. Библиотеки штрих-кодировали с помощью набора NEXT flex (Ion Torrent; Perkin Elmer, Inc., США), а затем готовые библиотеки дополнительно очищали с использованием магнитных частиц AMPure XP.

Для секвенирования участка V3 гена 16S рПНК на платформе Ion Torrent PGM использовали чип Ion 318™ Chipv2 BC и коммерческие наборы Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit и Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Обработка и статистический анализ данных секвенирования. Для базового вызова и выравнивания полученных чтений использовалось базовое программное обеспечение TorrentSuite. Чтения BAM были преобразованы в формат FASTQ с помощью FileExporter для последующего анализа с помощью языка программирования R. Необработанные данные секвенирования доступны в базе данных NCBI BioProject (BioProjectID: PRJNA900167).

Последующий биоинформатический анализ был выполнен в RStudio (RStudioInc, США). Чтения низкого качества были отфильтрованы с использованием максимального порога ожидаемой ошибки 1,0 (пакет DADA2). На следующем этапе качественные риды были унифицированы по длине и демультиплексированы. Затем при дерепликации все идентичные чтения были объединены в уникальные последовательности (ASV). Алгоритм UNOISE2 использовался для формирования оперативных таксономических единиц (OTU).

Общая идентификация таксономического состава микроорганизмов проведена на основании базы данных SILVA версии 132 (<https://www.arb-silva.de>, по состоянию на 29 сентября 2022 г.). Мы исключили агенты контаминации из проб с помощью пакета decontam R.

Чтобы сравнить относительную численность между группами лечения, использовали метод обобщенного линейного моделирования (GLM), реализованный в пакете DeSEQ2 R. Р-значения для каждой OTU были получены с использованием теста Вальда с применением коррекции множественного вывода Бенджамини-Хохберга. Альфа-разнообразие для каждой группы рассчитывали с использованием индекса Шеннона. Был использован тест Тьюки для оценки различий в показателях альфа-разнообразия между группами.

Результаты и их обсуждение

Проанализировали изменения бактериального состава в процессе ферментации. Были получены данные о бактериальном составе исходной бактериальной закваски, стерилизованного молока и их смеси до начала брожения (0 ч) и в процессе брожения (3, 6, 9, 12, 15 и 18 ч). В ходе секвенирования было получено 150 972 прочтения, что соответствует 10 бактериальным типам и 132 родам.

Обилие типов *Patescibacteria*, *Campilobacterota*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteriota* и *Bdellovibrionota* составляло менее 0,010 для каждого субстрата и точки времени ферментации, поэтому их сгруппировали в «Другие» (рис. 1).

Тип *Firmicutes* оказался самым многочисленным среди всех выборок. Для молока его концентрация составила 0,4634, для закваски – 0,5303, для временных интервалов ферментации смеси – 0,9050. В закваске вторым по численности типом был *Actinobacteriota* – 0,4618, численность остальных типов составила менее 0,01. В молоке, помимо *Firmicutes*,

в значимых количествах были представлены типы *Deinococcota* – 0,2816, *Proteobacteria* – 0,1448, *Bacteroidota* – 0,0817 и *Actinobacteriota* – 0,0251.

Статистически значимые различия между изучаемыми субстратами на уровне типа определяли с помощью DeSeq2, реализующего критерий Вальда с поправкой множественного вывода по умолчанию – Бенджамини-Хохберга (рис. 2). Результаты были выражены как Log2FoldChange, характеризующие размер эффекта и скорректированное значение *p*.

Согласно анализу статистически значимые различия наблюдались между 6 и 0 ч ферментации для

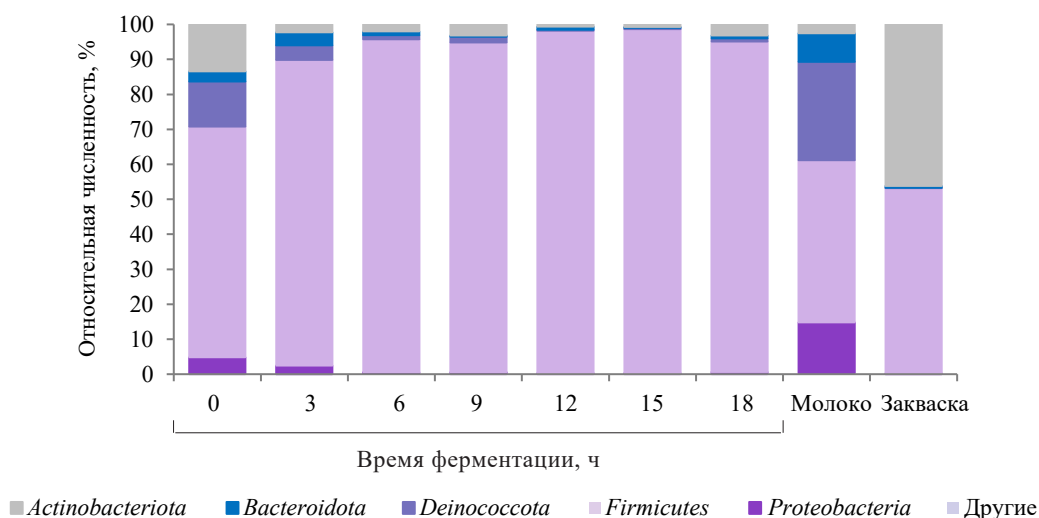


Рисунок 1. Соотношение бактериальных типов в исследуемых субстратах

Figure 1. Proportion of different bacterial in substrates

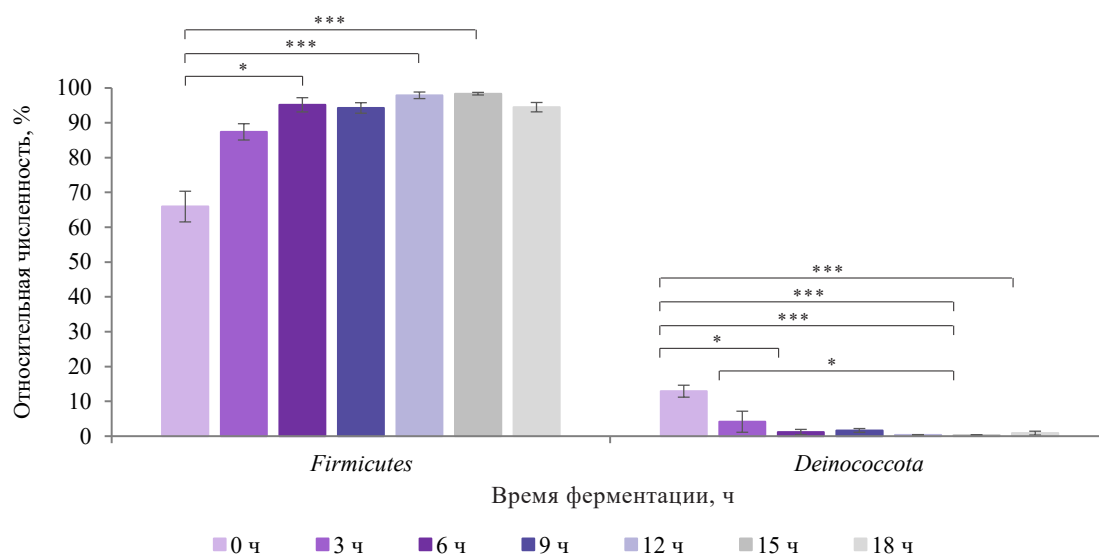


Рисунок 2. Статистически значимые различия в микробиомном составе на уровне типа во время ферментации (**p* < 0,05, ****p* < 0,001)

Figure 2. Statistically significant differences in microbiome composition for each during fermentation (**p* < 0.05, ****p* < 0.001)

типов *Deinococcota* – 1,9740 ($p = 0,0129$) и *Firmicutes* – 2,1110 ($p = 0,0129$). По сравнению с 0 ч на 12 ч стадии ферментации разница для типа *Firmicutes* составила 3,1633 ($p = 0,0001$), для *Deinococcota* – 2,6248 ($p = 0,0001$); на 15 ч стадии ферментации 3,1130 ($p = 0,0001$) и –2,9482 ($p = 0,0001$) для *Firmicutes* и *Deinococcota* соответственно; на 18 ч стадии ферментации разница составила –2,6647 ($p = 0,0002$) для *Deinococcota*. На 15 ч стадии ферментации, по сравнению с 3 ч, разница составила –2,1461 ($p = 0,0414$) для *Deinococcota*.

Все роды бактерий, численность которых в каждой группе была менее 0,0100, были объединены в «Другие». Таким образом, были выделены 14 родов бактерий, формирующих ядро микробиома исследуемых субстратов (рис. 3).

Наиболее распространенными родами бактерий были *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Thermus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Anoxybacillus*, *Prevotella*, *Cutibacterium*, *Oscillospiraceae* UCG-005 и *Leuconostoc*. *Lactobacillus* был преобладающим родом для закваски (0,5142), для каждой временной точки процесса ферментации среднее значение составило 0,8542. Помимо *Lactobacillus*, в закваске был обнаружен *Bifidobacterium* – 0,4628. Численность остальных родов, представленных на рисунке 3, была менее 0,01. В стерилизованном молоке преобладал род *Thermus* – 0,2899, следующим по численности были роды *Lactococcus* – 0,2474, *Streptococcus* – 0,1270, *Acinetobacter* – 0,0820, *Chryseobacterium* – 0,0621,

Pseudomonas – 0,0386, *Anoxybacillus* – 0,0364, *Cutibacterium* – 0,0184, *Lactobacillus* – 0,0166, *Leuconostoc* – 0,0107. Численность остальных идентифицированных родов была менее 0,01.

Был использован индекс Шеннона для расчета альфа-разнообразия для каждого изученного субстрата. Статистические различия в альфа-разнообразии между субстратами были выявлены с использованием теста Тьюки HSD (рис. 4).

Проведенный анализ показал наличие статистической разницы в бактериальном разнообразии между несколькими субстратами. Индекс Шеннона для стерилизованного молока составил 2,2259, что превышало индекс альфа-разнообразия в продукте ферментации через 6 ч ($H = 0,4397$, $p = 0,0022$), 9 ч ($H = 0,4496$, $p = 0,0023$), 12 ч ($H = 0,2435$, $p = 0,0005$), 15 ч ($H = 0,1870$, $p = 0,0003$) и 18 ч ($H = 0,4716$, $p = 0,0027$). Кроме того, альфа-разнообразие смеси стерилизованного молока и закваски до начала ферментации (0 ч) составляло 1,6438 и превышало этот показатель через 12 ч ($H = 0,2435$, $p = 0,0320$) и 15 ч ($H = 0,1870$, $p = 0,0221$) ферментации смеси.

Различия между составом, в зависимости от времени ферментации смеси, определяли с помощью DeSeq2 (рис. 5). Результаты были выражены как Log2FoldChange, характеризующие размер эффекта и скорректированное значение p .

Несмотря на изменения бактериального состава субстрата при ферментации, для рода *Lactobacillus* выявлены статистически значимые изменения. Было обнаружено увеличение этого рода во время

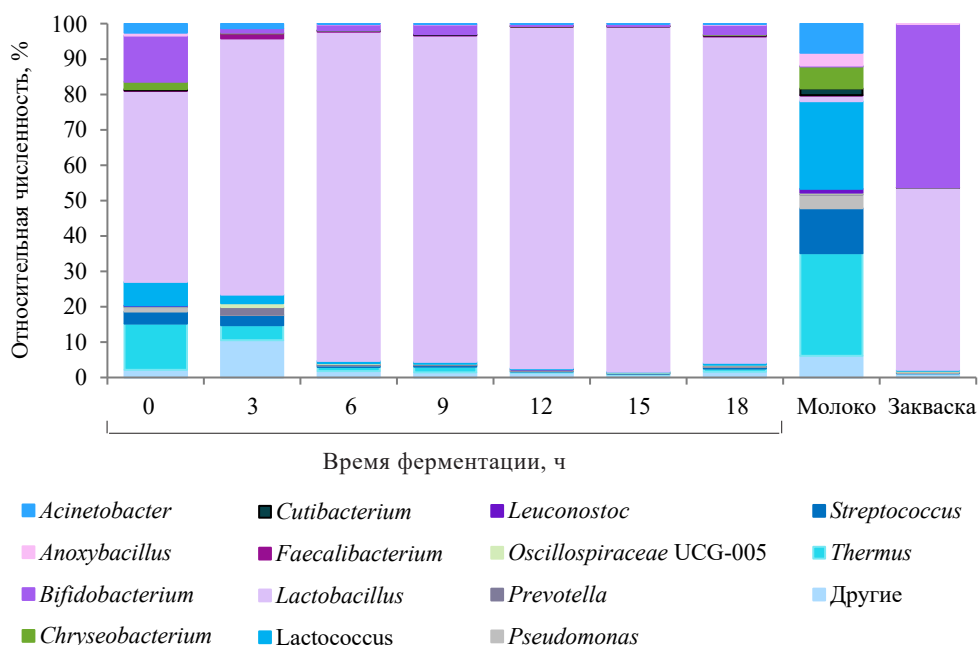


Рисунок 3. Бактериальный состав на уровне рода в исследуемых субстратах

Figure 3. Bacterial composition

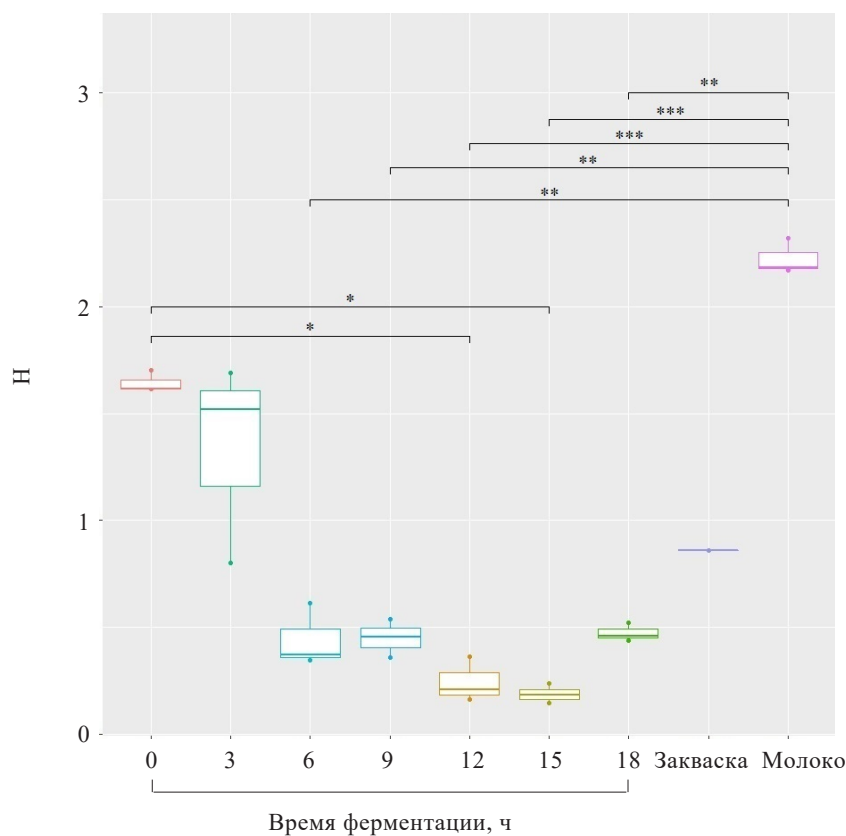


Рисунок 4. Альфа-разнообразие на уровне рода в исследуемых субстратах (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Figure 4. Alpha diversity in the substrates (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

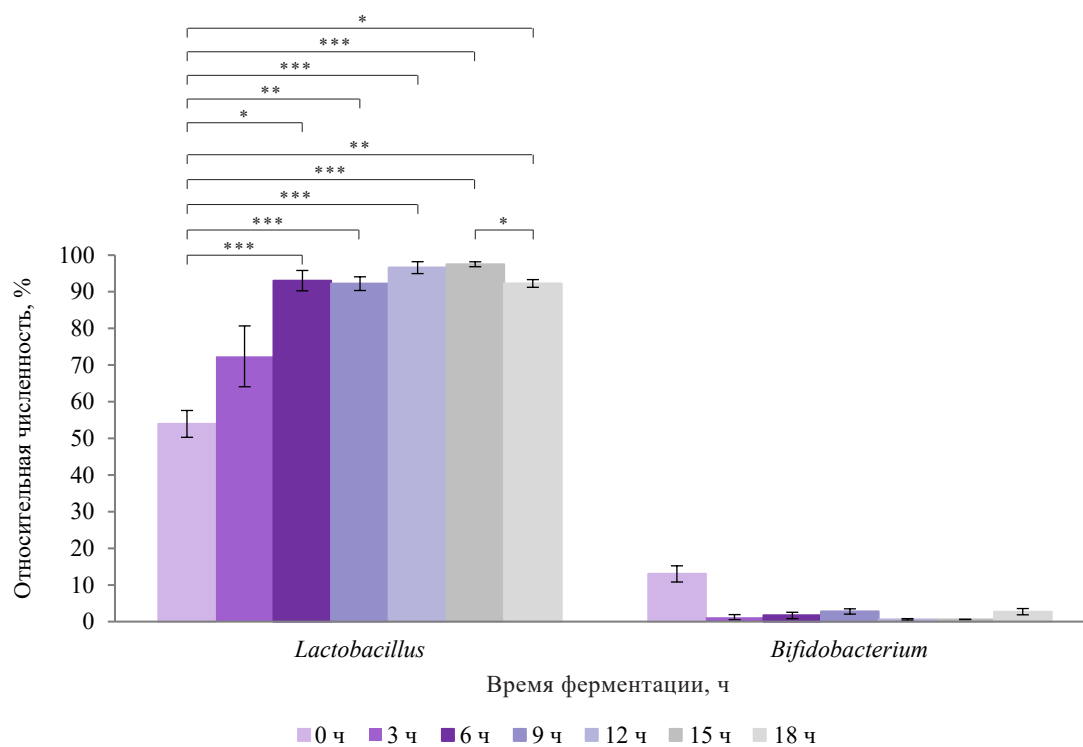


Рисунок 5. Различия в составе *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* при ферментации (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Figure 5. Composition of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* during fermentation (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

ферментации: статистически значимое от 6 ч ферментации до 0 ч. Увеличение после 6 ч ферментации считается значительным. Однако через 15 ч брожения количество *Lactobacillus* уменьшается, что является статистически значимым. Хотя нет статистически значимой разницы между количеством бифидобактерий во время ферментации, можно увидеть, что их количество уменьшается в процессе и замещается лактобациллами.

Изменение состава микробиоты в процессе ферментации пробиотика является естественным процессом. Изменяющиеся физико-химические свойства способствуют формированию стрессовых условий, трансформирующих микробное разнообразие. Активные качественные и количественные изменения микробиоты приводят к появлению в готовой продукции отдельных доминирующих таксонов [23, 24]. Например, метагеномный анализ образцов кумыса традиционного типа брожения показал снижение количества представителей рода *Lactobacillus*, в то время как содержание *Streptococcus* увеличивалось. Несмотря на это, основными преобладающими родами на всех стадиях ферментации кумыса оставались представители родов *Lactococcus*, *Lactobacillus* и *Enterococcus*, обеспечивающие формирование особого вкуса и питательности конечного продукта [25].

Анализ популярного в южноафриканских странах пробиотического продукта амаси показал, что в процессе ферментации регистрировалось повышение содержания бактерий семейств *Lactobacillaceae* и *Streptococcaceae*. Представители из семейства *Prevotellaceae* доминировали в сыром молоке, но с началом ферментации уменьшались [26]. Такие результаты связывают с низким значением pH, поскольку культуры, используемые в ферментации продуктов, активно функционируют в кислой среде [26].

В данном исследовании были изучены изменения состава микробиома ферментированного пробиотического кисломолочного продукта на основе молочной сыворотки на разных стадиях ферментации (от 0 до 18 ч, шаг 3 ч). Также исследовали бактериальный состав закваски и пастеризованного молока, которые использовались для получения конечного ферментированного продукта. В составе закваски по результатам секвенирования содержались следовые количества (менее 0,5 %) следующих бактерий: *Thermus*, *Prevotella*, *Oscillospiraceae* UCG-005 и *Lactococcus*. В молоке были идентифицированы различные роды бактерий. Так как молоко пастеризованное, то это ДНК мертвых бактерий, которые не повлияли на процесс брожения.

Некоторые штаммы *Thermus* и *Lactococcus* широко используются при приготовлении заквасок [27, 28]. Однако этого нельзя сказать о бактериях рода *Prevotella*. При анализе литературы не удалось найти данных о том, что эти бактерии могут использовать-

ся в производстве заквасок. Однако известно, что *Prevotella copri* является потенциальным кандидатом в пробиотические бактерии [29, 30]. Что касается *Oscillospiraceae* UCG-005, то обнаружение этой бактерии в закваске было неожиданным. Этот вид бактерий и его влияние на здоровье человека плохо изучены. *Thermus* и *Lactococcus* были доминирующими родами, обнаруженными в молоке. Они являются нормальными членами, содержащимися в молочных продуктах.

На протяжении всех стадий ферментации мы наблюдали, как постепенно род *Lactobacillus* вытесняет остальные роды бактерий, включая пробиотический род *Bifidobacterium*. В итоге пиковая концентрация представителей этого рода в исследуемом субстрате составила 97,5 % на 15 ч ферментации, после чего численность лактобацилл снизилась до 92,3 % на 18 ч ферментации. Это можно объяснить снижением pH на протяжении всего процесса брожения: в начале брожения отмечался pH 6,2–6,4, а в конце брожения – 4,2–4,4. Для роста бактерий рода *Bifidobacterium* оптимальный pH находится в диапазоне 6,5–7,0, тогда как лактобациллы не чувствительны к низким значениям pH [12, 31].

По результатам данного исследования в процессе ферментации в каждой контрольной точке наблюдалось снижение численности бактерий рода *Streptococcus*. Однако в предыдущих исследованиях сообщалось, что количество жизнеспособных клеток этого рода постепенно увеличивалось в процессе ферментации [32]. Эти результаты можно объяснить тем, что бактерии этого рода чувствительны к условиям культивирования, а для их роста в определенной среде необходимы углеводы, аминокислоты, витамины, нуклеотиды и минеральные вещества [33].

Одним из важнейших перспективных преимуществ процесса ферментации является способность снижать аллергенность тех или иных компонентов. Это осуществляется за счет ферментативного гидролиза аллергенных пептидов, входящих в состав продуктов [34–36].

Активное применение в пищевой промышленности заквасок обеспечивает формирование особых физико-химических характеристик, а также органолептических и питательных свойств у готового продукта [37]. Чтобы конечный результат не отличался от ожидаемого, бактериальный состав заквасок, применяемых в производстве ферментированных продуктов, должен соответствовать заявленному производителем. В связи с этим необходимо осуществлять контроль состава и качества заквасочных культур в целях предотвращения негативного влияния на свойства готовой продукции. Как было показано нами ранее, быстро и эффективно с этим могут справиться молекулярно-генетические методы [38, 39].

Выводы

В процессе ферментации наблюдалось увеличение рода *Lactobacillus* до 97,5 % к 15 ч ферментации, после чего количество *Lactobacillus* начало снижаться. Род *Lactobacillus* заменяет все другие роды бактерий, включая пробиотический род *Bifidobacterium*. Это можно объяснить снижением pH на протяжении всего процесса ферментации. В процессе ферментации продолжительностью 18 ч были достигнуты оптимальные значения pH = 4,2–4,4 для увеличения численности рода *Lactobacillus*, но они оказались низкими для продуктивного роста бифидобактерий. Высокопроизводительное секвенирование является хорошим инструментом для контроля процессов ферментации пробиотических кисломолочных продуктов.

Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в написании экспериментальной части рукописи и несут равную ответственность за плагиат.

Contribution

The authors were equally involved in the experimental part of the research and are equally responsible for any potential plagiarism.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Leeuwendaal NK, Stanton C, O'Toole PW, Beresford TP. Fermented foods, health and the gut microbiome. *Nutrients*. 2022;14(7). <https://doi.org/10.3390/nu14071527>
2. Mathur H, Beresford TP, Cotter PD. Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates. *Nutrients*. 2020;12(6). <https://doi.org/10.3390/nu12061679>
3. Krasnova IS, Ganina VI, Semenov GV. Fruit and vegetable purees as cryoprotectants for vacuum freeze-dried fermented milk products. *Foods and Raw Materials*. 2023;11(2):300–308. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-2-578>
4. García-Díez J, Saraiva C. Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(5). <https://doi.org/10.3390/ijerph18052544>
5. Yang Q, Rutherford-Markwick K, Mutukumira AN. Identification of dominant lactic acid bacteria and yeast in rice sourdough produced in New Zealand. *Current Research in Food Science*. 2021;4:729–736. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.10.002>
6. Freitas M. The benefits of yogurt, cultures, and fermentation. In: Floch MH, Ringel Y, Walker WA, editors. *The microbiota in gastrointestinal pathophysiology. Implication human health, prebiotics, probiotics, dysbiosis*. Academic Press; 2017. pp. 209–223. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00024-0>
7. İspirli H, Dertli E. Isolation and identification of exopolysaccharide producer lactic acid bacteria from Turkish yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018;42(8). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13351>
8. Agustinah W, Warjoto RE, Canti M. Yogurt making as a tool to understand the food fermentation process for nonscience participants. *Journal of Microbiology and Biology Education*. 2019;20(1). <https://doi.org/10.1128/jmbe.v20i1.1662>
9. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 2000;84(3):197–215. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00375-8)
10. Viability of probiotic *Lactobacillus casei* in yoghurt: defining the best processing step to its addition [Internet]. [cited 2023 Jan 16]. Available from: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2013/1/art-8>
11. Gao J, Li X, Zhang G, Sadiq FA, Simal-Gandara J, Xiao J, et al. Probiotics in the dairy industry – Advances and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021;20(4):3937–3982. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12755>
12. Widyastuti Y, Febrisiantosa A, Tidona F. Health-promoting properties of lactobacilli in fermented dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673890>
13. Amanat S, Mazloomi SM, Asadimehr H, Sadeghi F, Shekouhi F, Mortazavi SMJ. *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* exposed to Wi-Fi radiofrequency electromagnetic radiation show enhanced growth and lactic acid production. *Journal of Biomedical Physics and Engineering*. 2020;10(6):745–750. <https://doi.org/10.31661/JBPE.V010.1056>
14. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research Public Health*. 2014;11(5):4745–4767. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>

15. Cai J, Bai J, Luo B, Nio Y, Tian E, Yan W. In vitro evaluation of probiotic properties and antioxidant activities of *Bifidobacterium* strains from infant feces in the Uyghur population of northwestern China. *Annals of Microbiology*. 2022;72. <https://doi.org/10.1186/s13213-022-01670-y>
16. O'Sullivan A, Farver M, Smilowitz JT. The influence of early infant-feeding practices on the intestinal microbiome and body composition in infants. *Nutrition and Metabolic Insights*. 2015;8(1). <https://doi.org/10.4137/NMI.S29530>
17. Cheng J, Laitila A, Ouwehand AC. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 effects on gut health: A review. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.790561>
18. Parhi P, Song KP, Choo WS. Growth and survival of *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium longum* in various sugar systems with fructooligosaccharide supplementation. *Journal of Food Science and Technology*. 2022;59:3775–3786. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05361-z>
19. Mills S, Yang B, Smith GJ, Stanton C, Ross RP. Efficacy of *Bifidobacterium longum* alone or in multi-strain probiotic formulations during early life and beyond. *Gut Microbes*. 2023;15(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2186098>
20. Salari A, Hashemi M, Afshari A. Functional properties of kefir in the medical field and food Industry. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2022;23(3):388–395. <https://doi.org/10.2174/1389201022666210322121420>
21. Landis EA, Oliverio AM, McKenney EA, Nichols LM, Kfoury N, Biango-Daniels, *et al.* The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *eLife*. 2021;10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.61644>
22. Savaiano DA, Hutkins RW. Yogurt, cultured fermented milk, and health: A systematic review. *Nutrition Reviews*. 2021;79(5):599–614. <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUAA013>
23. Salazar JK, Gonsalves LJ, Fay M, Ramachandran P, Schill KM, Tortorello ML. Metataxonomic profiling of native and starter microbiota during ripening of gouda cheese made with *Listeria monocytogenes*-contaminated unpasteurized milk. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642789>
24. Chessa L, Paba A, Dupré I, Daga E, Fozzi MC, Comunian R. Strategy for the recovery of raw ewe's milk microbial diversity to develop natural starter cultures for traditional foods. *Microorganisms*. 2023;11(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040823>
25. Wu Y, Li Y, Gesudu Q, Zhang J, Sun Z, Halatu H, *et al.* Bacterial composition and function during fermentation of Mongolia koumiss. *Food Science and Nutrition*. 2021;9(8):4146–4155. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2377>
26. Maleke M, Doorsamy W, Abrahams AM, Adefisoye MA, Masenya K, Adebo OA. Influence of fermentation conditions (temperature and time) on the physicochemical properties and bacteria microbiota of *amasi*. *Fermentation*. 2022;8(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation8020057>
27. Zhu L, Hou Z, Hu X, Liu X, Dai T, Wang X, *et al.* Genomic and metabolic features of an unexpectedly predominant, thermophilic, assistant starter microorganism, *Thermos thermophilus*, in Chinese inner Mongolian cheese. *Foods*. 2021;10(12). <https://doi.org/10.3390/foods10122962>
28. Lee HW, Kim IS, Kil BJ, Seo E, Park H, Ham J-S, *et al.* Investigation of flavor-forming starter *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LDTM6802 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LDTM6803 in miniature gouda-type cheeses. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020;30(9):1404–1411. <https://doi.org/10.4014/jmb.2004.04004>
29. Huang F, Sardari RRR, Jasilionis A, Böök O, Öste R, Rascón A, *et al.* Cultivation of the gut bacterium *Prevotella copri* DSM 18205^T using glucose and xylose as carbon sources. *MicrobiologyOpen*. 2021;10(3). <https://doi.org/10.1002/MBO3.1213>
30. Verbrugghe P, Brynjólfsson J, Jing X, Björck I, Hållenius F, Nilsson A. Evaluation of hypoglycemic effect, safety and immunomodulation of *Prevotella copri* in mice. *Scientific Reports*. 2021;11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96161-6>
31. Shah NP. Bacteria, beneficial | *Bifidobacterium* spp.: Morphology and physiology. In: Fuquay JW, editor. *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press; 2011. pp. 381–387. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00043-1>
32. Song X, Hou C, Yang Y, Ai L, Xia Y, Wang G, *et al.* Effects of different carbon sources on metabolic profiles of carbohydrates in *Streptococcus thermophilus* during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2022;102(11):4820–4829. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11845>
33. Liu G, Qiao Y, Zhang Y, Leng C, Chen H, Sun J, *et al.* Metabolic profiles of carbohydrates in *Streptococcus thermophilus* during pH-controlled batch fermentation. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01131>
34. Pi X, Yang Y, Sun Y, Cui Q, Wan Y, Fu G, *et al.* Recent advances in alleviating food allergenicity through fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022;62(26):7255–7268. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1913093>

35. Ye M, Xu Z, Tan H, Yang F, Yuan J, Wu Y, et al. Allergenicity reduction of cow milk treated by alkaline protease combined with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus helveticus* based on epitopes. Food Chemistry. 2023;421. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136180>
36. Chen JM, Al KF, Craven LJ, Seney S, Coons M, McCormick H, et al. Nutritional, microbial, and allergenic changes during the fermentation of cashew “cheese” product using a quinoa-based rejuvelac starter culture. Nutrients. 2020;12(3). <https://doi.org/10.3390/nu12030648>
37. Gao J, Li X, Zhang G, Sadiq FA, Simal-Gandara J, Xiao J, et al. Probiotics in the dairy industry – Advances and opportunities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2021;20(4):3937–3982. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12755>
38. Syromyatnikov M, Nesterova E, Gladkikh M, Popov V. Probiotics analysis by high-throughput sequencing revealed multiple mismatches at bacteria genus level with the declared and actual composition. LWT. 2022;156. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113055>
39. Syromyatnikov MYu, Korneeva OS, Nesterova EYu, Gladkikh MI, Popov ES, Popov VN. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene for evaluation the composition of bacterial starter cultures used for the preparation of fermented milk products. Biotechnology in Russia. 2022;38(1):80–92. (In Russ.). <https://doi.org/10.56304/S0234275822010082>