

На правах рукописи



**Нестерова Екатерина Юрьевна**

**КОМПЛЕКСНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТАВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ  
ПРОДУКТОВ И ЗАКВАСОК С ПРИМЕНЕНИЕМ  
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ЦЕЛЕВЫХ  
ПЦР-МЕТОДОВ**

2.7.1. – Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и биологически  
активных веществ

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Воронеж – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий».

Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент  
**Сыромятников Михаил Юрьевич.**

Официальные оппоненты – **Волкова Галина Сергеевна**  
доктор технических наук, ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи», заведующий отделом биотехнологии ферментов, дрожжей, органических кислот и БАД ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»;  
**Кареткин Борис Алексеевич**  
кандидат технических наук, ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева», доцент кафедры биотехнологии.

Ведущая организация – Федеральное государственное автономное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности».

Защита состоится 18 декабря 2025 года в 10:00 на заседании диссертационного совета 24.2.287.02 по защите диссертации на соискание ученой степени кандидата наук на базе ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» по адресу: 394036, г. Воронеж, пр. Революции, 19, конференц-зал.

Отзывы на автореферат, заверенные гербовой печатью учреждения, просим присылать ученому секретарю совета Д 24.2.287.02.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «ВГУИТ». Полный текст диссертации размещен в сети «Интернет» на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» [www.vsuet.ru](http://www.vsuet.ru).

Автореферат размещен в сети Интернет на интернет-сайте ВАК Министерства науки и высшего образования РФ: [vak.gisnauka.ru](http://vak.gisnauka.ru) и на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» [www.vsuet.ru](http://www.vsuet.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат технических наук  О.Л. Мещерякова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Ежегодно наблюдается стремительный рост мирового рынка пробиотиков. Если в 2021 году рынок пробиотиков оценивался около 60 млрд. долларов США, то к 2025 году он составил более 70 млрд. долларов США. В связи с этим требуются строгие меры контроля качества пробиотиков для обеспечения эффективности и безопасности пробиотических продуктов. Контроль качества пробиотических продуктов включает в себя подтверждение наличия определённых пробиотических штаммов, определение количества жизнеспособных клеток и подтверждение отсутствия посторонних штаммов микроорганизмов.

Важнейшим фактором при проведении контроля качества пробиотических культур является выбор методов тестирования, которые должны быть надёжными, точными, чувствительными, быстрыми и простыми. Классические микробиологические методы анализа, изложенные в ГОСТах, обладают серьёзными ограничениями по причине больших временных и материальных затрат. Для снижения стоимости и ускорения процессов контроля, как правило, осуществляется идентификация лишь тех бактерий, которые относятся к категории наиболее значимых для производства, что является главным ограничением такого подхода. Классические микробиологические подходы в определении таксонов бактерий в настоящее время уступают современным молекулярно-генетическим методам.

Для оценки качества и безопасности различных продуктов питания внедряются методы высокопроизводительного секвенирования. Многие зарубежные и российские ученые внесли вклад в разработку молекулярно-генетических методов идентификации молочнокислых бактерий, среди которых Botina S.G., Asano S., Pal K., Cousin F.J., Сливка И.Н., Стоянова Л.Г., Guo L., Беспоместных К. и другие.

Благодаря использованию молекулярно-генетических методов повышается скорость, эффективность и точность анализа. Для проведения экспресс-идентификации отдельных видов бактерий может быть применен метод ПЦР-ПДРФ, основанный на рестрикции продуктов амплификации исследуемых образцов с помощью специфичных эндонуклеаз. Применение методов, основанных на высокопроизводительном секвенировании и ПЦР-анализе, обеспечивает наиболее эффективное решение вопроса идентификации состава пробиотиков, о чем свидетельствуют работы Chen Z., Shehata H.R., Youn S.Y., Zhang J., Argentini C., Торопов В.А. и другие.

Тем не менее, наблюдается недостаточное количество работ, отражающих комплексный подход к оценке состава и качества заквасок и пробиотиков, а также отсутствие исследований по изучению динамики бактериального состава в процессе ферментации при различном изначальном соотношении бактерий в закваске и выявлению её закономерностей.

**Цель и задачи исследования:** Целью данной работы является изучение генетических и технологических характеристик заквасок для производства пробиотических продуктов и разработка молекулярно-генетических методов

идентификации пробиотических культур. Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить оптимальные способы выделения ДНК целевых бактерий и концентрирования продуктов ПЦР для последующего секвенирования.

2. С помощью высокопроизводительного секвенирования выявить относительное содержание бактерий в пробиотиках и заквасках.

3. Установить технологические свойства заквасок для производства пробиотических продуктов с разным таксономическим составом пробиотических бактерий.

4. Установить закономерности изменения относительного содержания пробиотических бактерий *Lactobacillus plantarum* и *Bifidobacterium bifidum* в конечном продукте ферментации при их различном начальном соотношении в закваске.

5. Выявить динамику изменения соотношения пробиотических культур комплексной закваски в составе кисломолочного продукта в процессе его ферментации.

6. Разработать метод идентификации видов лактобактерий и бифидобактерий, используемых для производства заквасок и пробиотиков, на основе ПЦР-ПДРФ.

**Научная новизна.** Установлено, что метод высокопроизводительного секвенирования позволяет регистрировать изменение полного бактериального состава молочной основы в процессе её ферментации, что невозможно осуществить классическими микробиологическими подходами. Показано, что в процессе ферментации молочной основы с помощью комплексной закваски наблюдалось вытеснение рода *Bifidobacterium* с одновременным резким увеличением относительного количества бактерий рода *Lactobacillus* до 97,5% к 15 часам ферментации. Это указывает на высокую антагонистическую активность видов *Lactobacillus* по отношению к остальным бактериальным таксонам многокомпонентной закваски. Такое изменение важно учитывать при изготовлении закваски, предназначенной для получения пробиотических продуктов на основе смеси бактерий *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*.

Разработаны методы идентификации на основе ПЦР-ПДРФ значимых для производства заквасок и пробиотиков лактобактерий и бифидобактерий. Показано, что виды *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosum*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus* и *L. brevis* могут быть надежно идентифицированы на основе использования трёх рестриктаз – Alu I, AspLE I и Msp I с предварительной амплификацией ДНК с помощью праймеров 337F и 1100R. Виды *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* и *B. animalis* могут быть идентифицированы на основе использования четырех рестриктаз – AsuHP I, BstNI I, Sse9 I и Taq I также с предварительной амплификацией ДНК с помощью праймеров 337F и 1100R.

**Теоретическая и практическая значимость.** Новизна технических решений отражена в патенте на изобретение: «Пат. № 2842962 РФ, МПК C12Q1/68. Способ идентификации значимых для пищевой промышленности

представителей рода *Lactobacillus* – *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus* и *L. brevis* на основе рестрикционного анализа гена *16S рPHK* / Е.Ю. Нестерова, М.И. Гладких, М.Ю. Сыромятников, О.Н. Крюкова, О.С. Корнеева; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий». № 2024134906; заявл. 21.11.2024; опубл. 04.07.2025, Бюл. № 19».

Показано, что высокопроизводительное секвенирование может быть использовано для контроля процессов ферментации при приготовлении пробиотических продуктов, что позволяет подбирать оптимальные условия культивирования бактерий для получения конечного продукта с необходимыми характеристиками.

С помощью высокопроизводительного секвенирования возможно осуществлять контроль относительного содержания бактерий в заквасках и пробиотиках для получения пробиотических продуктов с необходимым балансом штаммов, тем самым обеспечивая получение качественного, функционального и безопасного продукта. Было установлено, что в процессе ферментации молочной основы с применением трехкомпонентной закваски вне зависимости от первоначального количества *B. bifidum*, в конечном продукте их относительное содержание составило от 0,4 до 24,4%, что ниже по сравнению с *S. thermophilus* и *L. plantarum*. Уменьшение отношения *L. plantarum*/*B. bifidum* в закваске приводило к увеличению доли *S. thermophilus* в конечном продукте ферментации, что необходимо учитывать при производстве функциональных пробиотических продуктов.

Установлено, что при разном таксономическом составе молочнокислых бактерий в заквасках для приготовления йогурта изменялась кислотообразующая активность и органолептические свойства продукта ферментации. Показано, что присутствие дополнительных видов лактобактерий помимо *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* в заквасках для приготовления йогуртов повышало титруемую кислотность к 8 часу ферментации при 37 °С. Титруемая кислотность при 37 °С была достоверно выше, чем при 45 °С, если в составе закваски присутствовали бактерии рода *Lactobacillus*.

Внедрение метода на основе ПЦР-ПДРФ в молочное производство и производство биологически активных препаратов позволит проводить предварительную оценку таксономической принадлежности бактерий, входящих в состав используемых на производстве заквасок, а также значительно упростит и удешевит процесс идентификации.

**Методология и методы исследования.** Реализация цели и задач исследования осуществлялась с использованием классических микробиологических и физико-химических методов, молекулярно-генетических методов, среди которых ПЦР, ПЦР-ПДРФ, электрофорез, а также методов высокопроизводительного секвенирования на различных платформах.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Метод выделения ДНК и концентрирования ампликона для проведения секвенирования.

2. Зависимость технологических свойств молочных продуктов от таксономического состава пробиотических бактерий в заквасках, используемых для их ферментации.

3. Закономерности изменения количественного состава пробиотических бактерий в процессе ферментации.

4. Метод ПЦР-ПДРФ, позволяющий идентифицировать видовую принадлежность лактобактерий и бифидобактерий, применяемых в пищевой промышленности.

**Публикации и апробации результатов.** Диссертационная работа выполнена в рамках гранта РФФИ №24-24-20036 и госзадания (проект FZGW-2024-0003).

Основная часть результатов представлена в 11 печатных работах, 3 из которых опубликованы в рецензируемых и реферируемых журналах из перечня Scopus и/или Web of Science, 3 опубликованы в изданиях, входящих в базу данных RSCI, имеется 1 патент на изобретение. Выносимые на защиту научные положения характеризуются достоверностью, подтвержденной экспертами-рецензентами данных изданий.

**Личный вклад автора.** Экспериментальные исследования и обработка полученных данных выполнены автором лично. Трактовка полученных результатов и формулирование выводов осуществлены совместно с научным руководителем.

**Структура и объем работы.** Работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, практических предложений, списка сокращений, списка использованных источников, включающего 237 наименований, из них 234 иностранных источника, и приложения (патент на изобретение). Работа изложена на 128 страницах, содержит 10 таблиц и 22 рисунка.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В главе дана характеристика пробиотических заквасок и ферментированных продуктов, получаемых с их помощью. Проведен анализ научных источников в области контроля качества и состава пробиотиков и заквасок. Описаны молекулярно-генетические методы идентификации пробиотических микроорганизмов, включая метод высокопроизводительного секвенирования.

### **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Описаны объекты исследования и использованные в работе молекулярно-генетические методы, в том числе высокопроизводительное секвенирование на платформах DNBSEQ-G50, Ion torrent PGM и Illumina MiSeq, методы биоинформатического и статистического анализа данных, а также классические микробиологические методы.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Подбор метода выделения бактериальной ДНК из кисломолочной продукции с помощью сорбента на основе диоксида кремния

Для выделения ДНК использовали 99% силику (Sigma-Aldrich, США). В рамках эксперимента рассматривались 3 варианта концентраций гуанидин тиоционата – 3,5 М, 5 М и 6,5 М, а также 4 варианта детергентов – 1% Triton X-100, 1% Tween 20, 1% Tween 80 и 1% СТАВ. Таким образом, экстракция ДНК осуществлялась 12 различными вариантами.

При проведении электрофореза в агарозном геле было установлено, что использование Tween 80 и Tween 20 в качестве детергентов в лизирующем растворе обеспечивает эффективную экстракцию РНК, в отличие от таких детергентов, как Triton X-100 и СТАВ. Было показано, что при концентрациях гуанидин тиоционата 5 М и 6,5 М наблюдались более выраженные полосы рРНК на электрофореграмме в случае применения Tween 80, а при использовании Tween 20 оптимальная концентрация гуанидин тиоционата для экстракции ДНК составила 5 М.

На рисунке 1 представлены полученные при выделении нуклеиновых кислот концентрации ДНК при использовании различных концентраций гуанидин тиоционата с детергентом Tween 80 (А) и 4 типов детергентов при концентрации гуанидин тиоционата 5 М (Б).

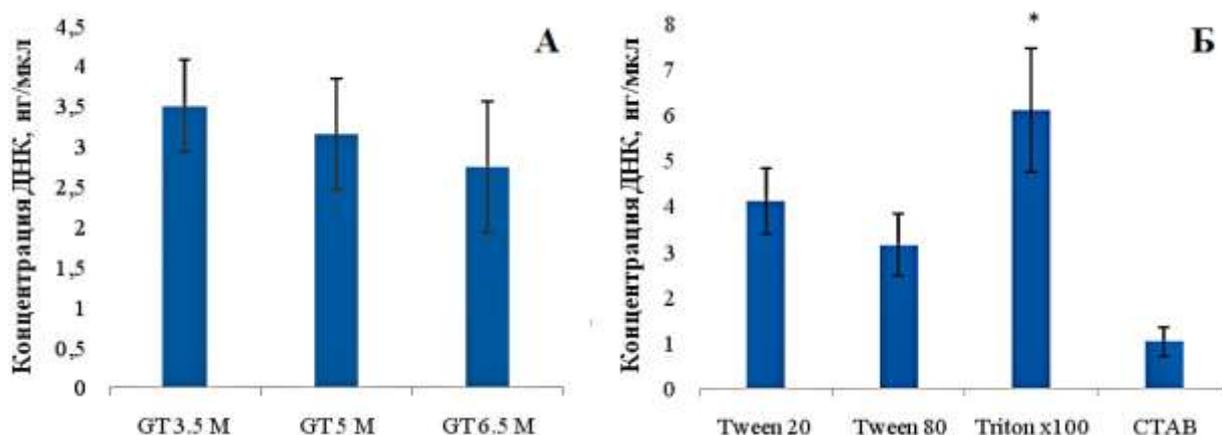


Рисунок 1 – Диаграммы зависимости концентраций экстрагированной ДНК от молярности гуанидин тиоционата с Tween 80 (А) и детергентов при концентрации гуанидин тиоционата 5 М (Б) (\* различия с Tween 80 и СТАВ статистически достоверны,  $p < 0,05$ )

Анализ влияния детергентов на качество выделения ДНК показал, что минимальная концентрация экстрагированной ДНК была получена в результате использования СТАВ и составляла 1,03 нг/мкл. Применение в качестве детергента Triton X-100 позволило получить концентрацию в 5,9 раз превышающую предыдущее значение ( $p < 0,001$ ). Значения, полученные в результате экстракции с использованием Tween 80 и Tween 20, превышали значения концентраций при использовании СТАВ в 3,1 и 3,9 раза соответственно ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Разработка способов концентрирования продуктов ПЦР как предварительный этап высокопроизводительного секвенирования

Исследовались 3 способа концентрирования ампликона:

1. Концентрирование ампликонов на колонке с силикой (диоксид кремния) (Sigma-Aldrich, США) проводили с помощью коммерческого набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard (Евроген, Россия).

2. Концентрирование ампликонов с использованием магнитных частиц с помощью суспензии магнитных частиц для очистки ДНК из реакционных смесей CleanMag DNA (Евроген, Россия).

3. Концентрирование ампликонов с использованием частиц силики (диоксида кремния) (Sigma-Aldrich, США) с помощью набора Проба-ГС (ДНК-технология, Россия) с модификацией.

Для разработки метода концентрирования ДНК продуктов амплификации получали низкую концентрацию ампликонов путем его пятикратного разбавления деионизированной водой после реакции ПЦР.

Концентрация ампликона, полученного при амплификации бактериальной ДНК, возрастала в 3,14 раза при использовании набора, основанного на применении колонки с силикой, и в 2,74 раза при использовании магнитных частиц. Концентрация ампликона, полученного при амплификации ДНК с праймерами ITS1/ITS4, возрастала в 4,72 раза при использовании набора, основанного на применении колонок с силикой, и в 3,70 раза при использовании магнитных частиц (рисунок 2).

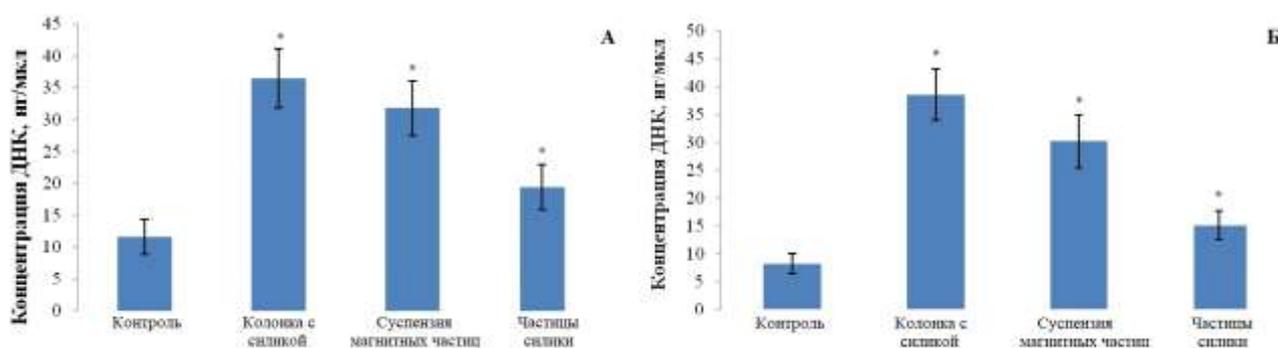


Рисунок 2 – Средний показатель концентраций ДНК после амплификации ДНК с праймерами 337F/1100R (А) и ITS1/ITS4 (Б) в зависимости от способа концентрирования ампликона (\* различия с контролем статистически достоверное,  $p < 0,05$ )

При проведении электрофореза в агарозном геле было установлено, что ампликоны, полученные в ходе концентрирования с помощью суспензии магнитных частиц, были более гомогенны по отношению к ампликонам, полученным с помощью набора на основе колонок с силикой.

### 3.3 Выявление таксономического состава и соотношения бактерий в пробиотиках с применением высокопроизводительного секвенирования

Анализ таксономического состава 18 пробиотиков, коммерчески доступных на территории РФ, осуществлялся на основе секвенирования участка гена *16S rPHK* на платформе MiSeq Illumina.

В целом в основной состав (>99% всех родов бактерий) пробиотиков входили бифидобактерии и молочнокислые бактерии, среди которых представители семейства Lactobacillaceae – *Lactobacillus* и *Lactocaseibacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Bacillus* (рисунок 3).

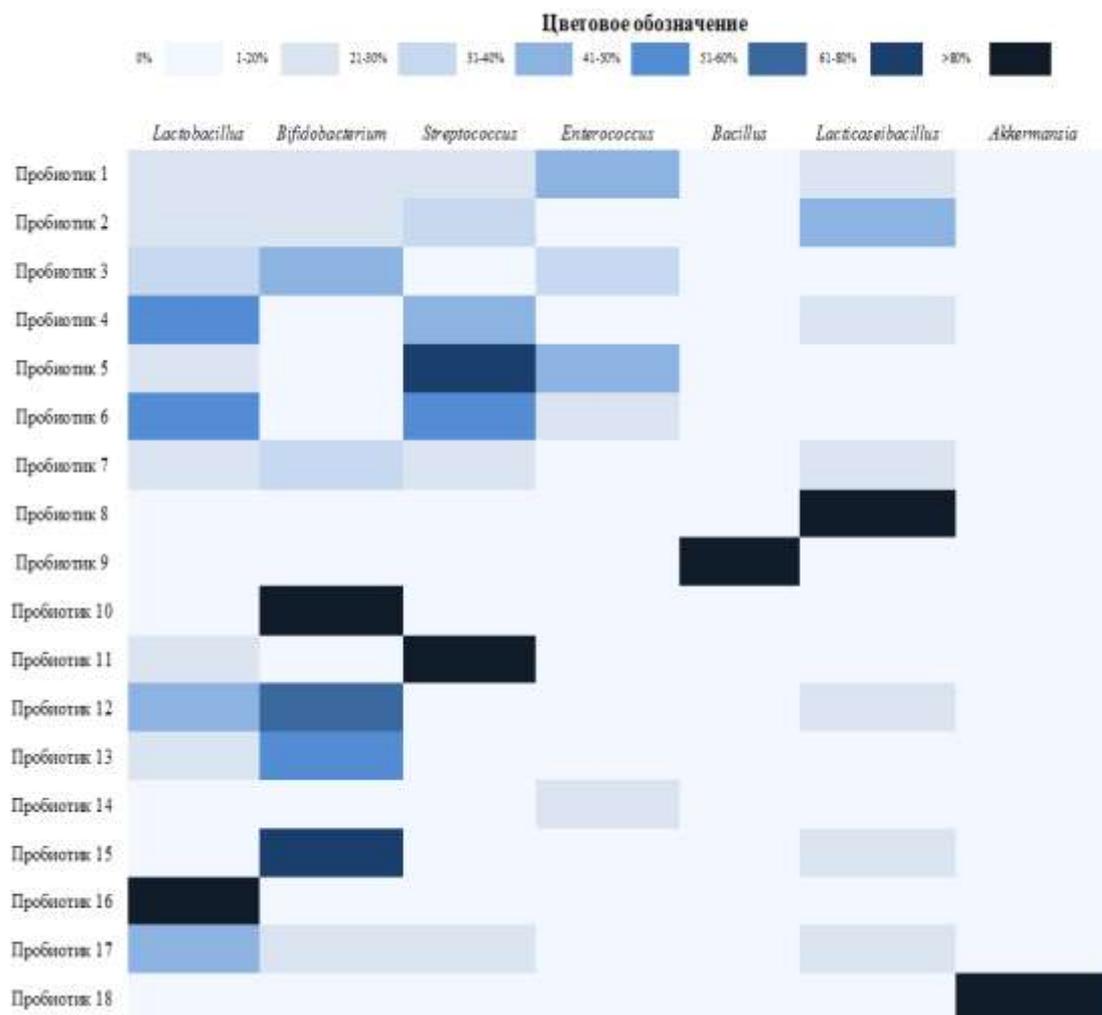


Рисунок 3 – Количественные соотношения бактерий в пробиотиках

Наиболее распространенными микроорганизмами в составе исследованных пробиотиков оказались представители семейства Lactobacillaceae, детектированные в 77% образцов. Их процентное соотношение варьировало в широком диапазоне от 2 до 99,5% (последнее значение актуально для моноштаммовых пробиотиков). В 9 из 18 образцов пробиотиков были идентифицированы бактерии рода *Bifidobacterium*. Не учитывая моноштаммовый пробиотик №10, в более чем половине из них, процентное соотношение бифидобактерий не превышало 47%, а в целом

варьировало в пределах от 12 до 71%. Представители рода *Streptococcus* были идентифицированы в 44% образцов.

Высокопроизводительное секвенирование установило, что пробиотики 8, 9, 10, 16 и 18 являются монокультурными. Так, в пробиотиках 8, 9, 10 выявлены роды *Lacticaseibacillus*, *Bacillus* и *Bifidobacterium* соответственно. Образец под номером 18 был представлен уникальной бактерией *Akkermansia muciniphila*, рассматриваемой в настоящее время в качестве перспективного пробиотика нового поколения.

### 3.4 Скрининг бактериального состава заквасочных культур с помощью высокопроизводительного секвенирования

Оценивался состав 22 коммерчески доступных в РФ заквасок на основе секвенирования участка гена *16S rDNA* на платформе Illumina MiSeq. Было исследовано 10 заквасок для йогурта, 5 заквасок для кефира, 1 закваска для ряженки, 1 закваска для наринэ и 5 заквасок для ферментированных молочных продуктов.

В целом в основной состав всех заквасок входили молочнокислые и бифидобактерии (рисунок 4).



Рисунок 4 – Количественные соотношения бактерий в заквасках

Бактерии рода *Streptococcus* существенно преобладали над другими родами бактерий в исследуемых заквасках – в 82% образцов, при этом в половине из них содержание бактерий рода *Streptococcus* превышало 70% от общего относительного количества бактерий в составе. *Bifidobacterium*, в свою очередь, регистрировались в меньших количествах относительно других таксонов (в 23% образцов). Их процентное соотношение в заквасках не превышало 20%. Процентное содержание представителей родов *Lactobacillus* в образцах заквасок варьировало в широком диапазоне – от 1 до 99,5%. В 41% заквасок были идентифицированы представители рода *Lactococcus*, при этом относительное содержание бактерий в большинстве этих образцов превышало 70% (за исключением образцов заквасок под номерами 4 и 5).

### 3.5. Динамика бактериального состава молочной основы в процессе ферментации

Анализ изменения соотношения бактерий в составе закваски проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования на платформе DNBSEQ-G50.

Для установления оптимального соотношения бактерий в закваске были использованы пробиотические штаммы *B. bifidum* и *L. plantarum*, а также *S. thermophilus*, необходимый для подкисления среды и запуска процесса брожения. Были исследованы 5 вариантов смеси бактерий с различной концентрацией бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* в каждой из них (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание бактериальных штаммов в заквасочной смеси для изготовления кисломолочного пробиотического продукта, КОЕ/см<sup>3</sup>

Бактерии/Вариант	Смесь 1	Смесь 2	Смесь 3	Смесь 4	Смесь 5
<i>L. plantarum</i>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>
<i>B. bifidum</i>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>S. thermophilus</i>	10 <sup>7</sup>				

Наибольшее содержание *S. thermophilus* было зарегистрировано в смеси 3, где соотношение относительного содержания *L. plantarum*/*B. bifidum* соответствовало 10<sup>6</sup>/10<sup>8</sup> КОЕ/мл (рисунок 5).

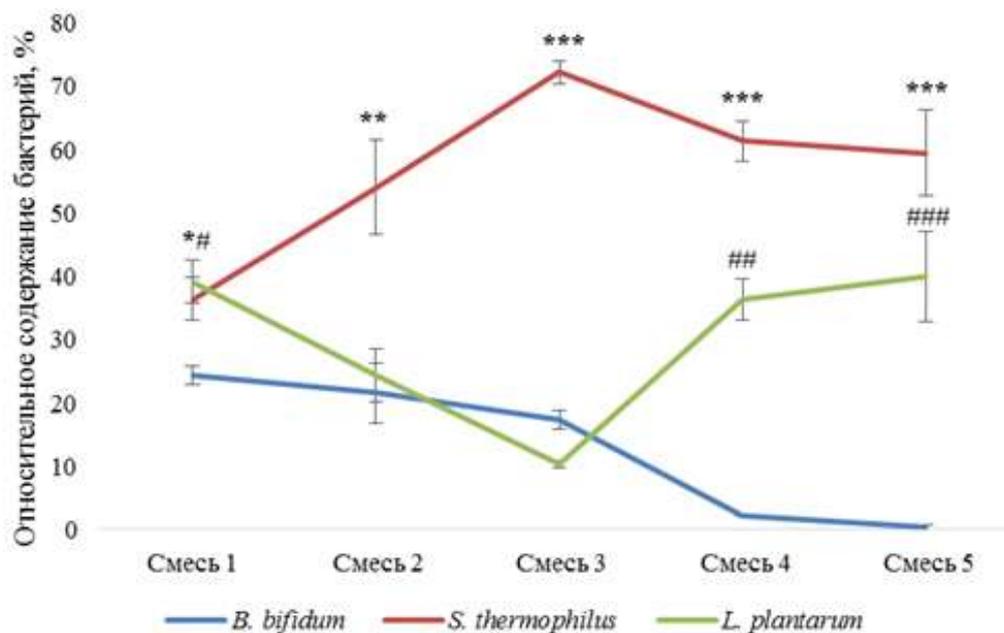


Рисунок 5 – Относительное содержание *B. bifidum*, *L. plantarum* и *S. thermophilus* в молочной основе после 18 часов ферментации (# различие между группой «*B. bifidum*» и «*L. plantarum*» статистически достоверное,  $p < 0,05$ ; ## различие между группой «*B. bifidum*» и «*L. plantarum*» статистически достоверное,  $p < 0,01$ ; ### различие между группой «*B. bifidum*» и «*L. plantarum*» статистически достоверное,  $p < 0,001$ ; \* различие между группами «*S. thermophilus*» и «*B. bifidum*» статистически достоверное,  $p < 0,05$ ; \*\* различие между группами «*S. thermophilus*» и «*B. bifidum*» статистически достоверное,  $p < 0,01$ ; \*\*\* различие между группами «*S. thermophilus*» и «*B. bifidum*» статистически достоверное,  $p < 0,001$ )

В процессе активного подкисления среды в результате совместной деятельности *L. plantarum* и *S. thermophilus*, была установлена зависимость снижения относительного содержания *B. bifidum* в продукте ферментации при использовании каждого варианта смеси вне зависимости от первоначального содержания *B. bifidum* в закваске. Особенно отчетливо это прослеживалось в смеси 4 и 5, где численность *L. plantarum* в 10 и 100 раз превышала содержание *B. bifidum* (конечное относительное содержание бактерий составило 36,3% и 40% для *L. plantarum* и 2,2% и 0,4% для *B. bifidum* соответственно). Это, вероятно, связано с высокой чувствительностью *B. bifidum* к низким значениям pH, что сопровождается замедлением их процессов жизнедеятельности, а, следовательно, и относительного содержания в образце.

Дальнейшей задачей явилась оценка динамики изменения соотношения бактерий в составе сложнокомпонентной закваски для получения пробиотического кисломолочного продукта с помощью высокопроизводительного секвенирования.

Были проанализированы изменения бактериального состава в процессе ферментации. Были получены данные о бактериальном составе исходной бактериальной закваски, стерилизованного молока и их смеси до начала

ферментации (точка 0 часов) и в процессе ферментации (3, 6, 9, 12, 15 и 18 часов).

На рисунке 6 отражены различия между составом в зависимости от времени ферментации смеси.

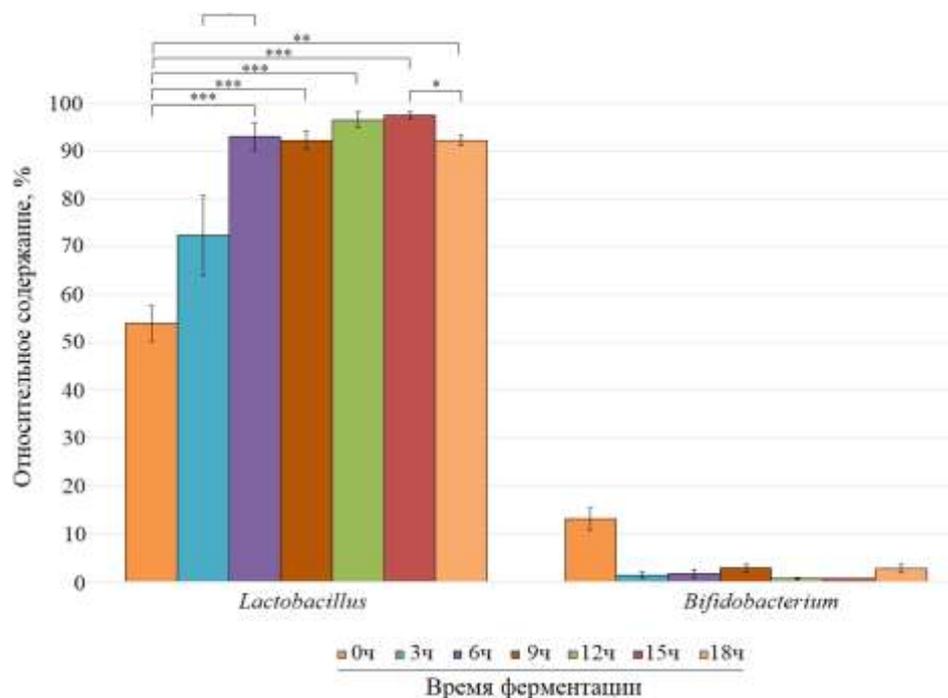


Рисунок 6 – Динамика численности *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* при ферментации бактериальными заквасками молочной основы. Обозначения: \* – различия достоверны ( $p < 0,05$ ); \*\* – различия достоверны ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – различия достоверны ( $p < 0,001$ )

На протяжении всех стадий ферментации наблюдалось постепенное вытеснение представителями рода *Lactobacillus* всех остальных родов бактерий, включая пробиотический род *Bifidobacterium*. В итоге пиковая концентрация представителей этого рода в исследуемом субстрате составила 97,5% на 15 ч ферментации.

### 3.6. Анализ технологических свойств пробиотических заквасок

Было проанализировано влияние бактериальных заквасок для йогуртов на сквашивание стерильного восстановленного обезжиренного 10% молока. Для экспериментальной работы использовалось 3 вида заквасок, изначально характеризовавшихся одинаковым бактериальным составом. В таблице 2 указана информация о составе закваски и идентифицированных с помощью высокопроизводительного секвенирования бактериальных видах.

Таблица 2 – Таксономический состав заквасок, используемых для сквашивания стерильного восстановленного обезжиренного молока

Образец	Идентифицированные виды
Закваска 1	<i>S. thermophilus</i>
Закваска 2	<i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueskii spp. bulgaricus</i>
Закваска 3	<i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueskii spp. bulgaricus</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. animalis</i>

Образцы молока ферментировались при 37 °С в термостате в течение 24 часов. Спустя 24 часа все образцы характеризовались полным сквашиванием. Каждый из трёх образцов обладал сходными органолептическими характеристиками, различий не было зафиксировано. По прошествии 64 часов ферментации молока с помощью закваски №3 продукт характеризовался образованием постороннего нетипичного запаха, что, вероятно, связано с наличием нескольких видов лактобактерий и бифидобактерий в составе закваски.

Для определения влияния бактериальных компонентов закваски на показатели титруемой кислотности молоко подвергалось ферментации при 45 °С в термостате в течение 24 часов. Сравнительные результаты сквашивания заквасок при 37 °С и 45 °С представлены на рисунке 7.

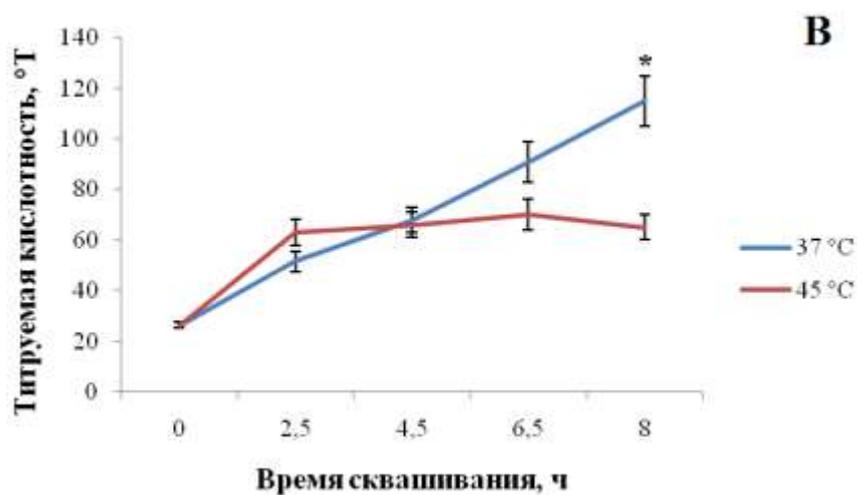
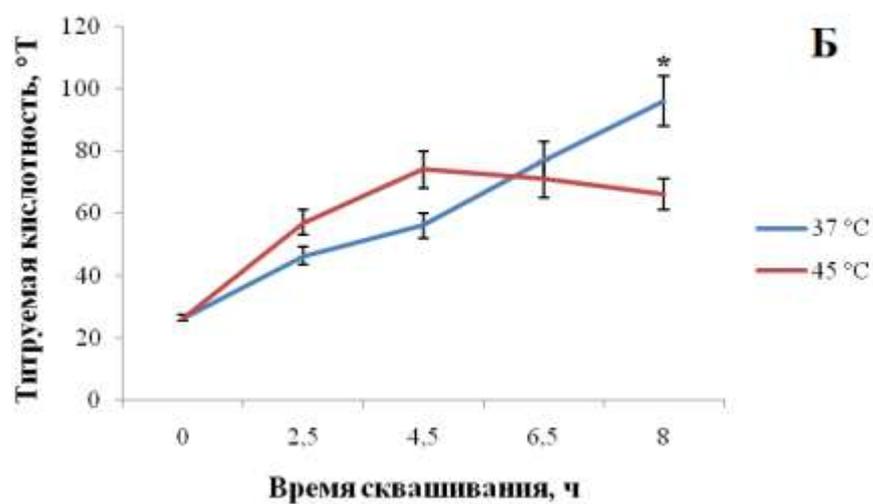
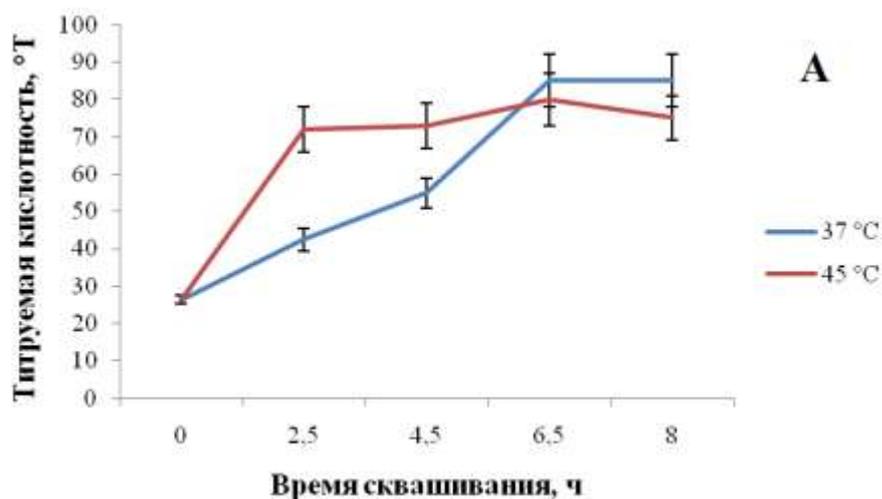


Рисунок 7 – Влияние температуры сквашивания на титруемую кислотность в исследуемых образцах ферментированной молочной основы: А – закваска №1, Б – закваска №2, В – закваска №3 (\* различие статистически достоверное,  $p < 0,05$ )

Было установлено, что при сквашивании молока при 45 °C с помощью закваски №1, содержащей в своем составе только *S. thermophilus*, титруемая

кислотность быстро нарастала и принимала значение 70 °Т по завершении 2 часов с момента начала сквашивания, в отличие от термостатирования при 37 °С, при которой такая величина кислотности была достигнута за 6,5 часов.

Присутствие бактерий рода *Lactobacillus* достоверно повышало титруемую кислотность при температуре сквашивания 37 °С по сравнению с этим показателем в процессе сквашивания при 45 °С. К 8 часу сквашивания было установлено, что наибольшие показатели титруемой кислотности были характерны для закваски №3, в которой содержались дополнительные виды *Lactobacillus*. Повышение значения титруемой кислотности после 8 часов ферментации между закваской, включающей дополнительные виды лактобактерий, по сравнению с закваской, содержащей только *S. thermophilus*, и закваской, содержащей *S. thermophilus* и *L. delbrueskii spp. bulgaricus*, составляла 26% и 16,5% соответственно.

Помимо сквашивания молока бактериальные компоненты заквасок были проанализированы путём высевания на питательную среду.

Было установлено, что наибольшее значение КОЕ/см<sup>3</sup> было получено у закваски №2 (18,9 x 10<sup>8</sup> КОЕ). При этом в чашках с заквасками №2 и №3 наблюдался рост двух видов колоний, в отличие от чашки с закваской №1, чей состав был представлен лишь *S. thermophilus* (рисунок 8).

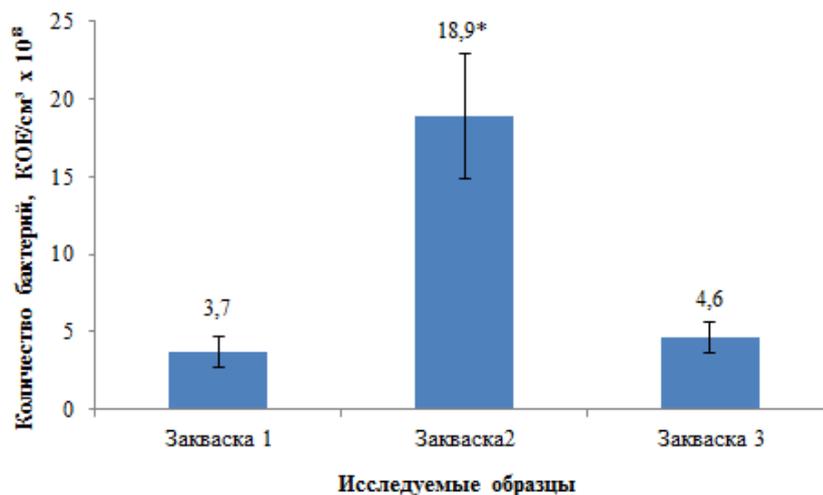


Рисунок 8 – Результаты подсчёта количества молочнокислых бактерий (КОЕ/см<sup>3</sup>) в сквашенном молоке, выросших на питательной среде (\* различие статистически достоверное, p<0,05)

Низкое содержание КОЕ в образце сквашенного молока №1, вероятно, связано с отсутствием в составе *Lactobacillus*, обеспечивающих *Streptococcus* необходимыми для роста пептидами и аминокислотами. Сниженное содержание КОЕ в образце 3 может быть связано с наличием посторонних МКБ в составе закваски, вступающих в конкуренцию за питательные вещества с *L. bulgaricus*.

### 3.7. Видовая идентификация лактобактерий и бифидобактерий на основе ПЦР-ПДРФ

В целях оптимизации процесса видовой идентификации был разработан метод ПЦР-ПДРФ наиболее значимых для пищевой промышленности видов лактобактерий.

На первом этапе анализировались лактобактерии. В качестве праймеров были выбраны праймеры 337F и 1100R. Длина амплифицированного фрагмента последовательности гена *16S pPHK* составляла 737 п.н. Было отобрано 3 рестриктазы, позволяющие дифференцировать 7 видов лактобактерий. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Ожидаемые длины продуктов рестрикции (п.н.) при проведении рестрикционного анализа для определения видов лактобактерий

Вид/рестриктаза	Alu I	AspLE I	Msp I
<i>L. plantarum</i>	4, 102, 105, 526	4, 245, 528	219,518
<i>L. casei</i>	4, 207, 526	52, 245, 440	219,518
<i>L. rhamnosus</i>	4, 207, 526	245,495	219,518
<i>L. delbrueckii</i>	4, 97, 636	52, 196, 244, 245	219, 289, 229
<i>L. fermentum</i>	4, 97, 102, 105, 429	44, 69, 624	68, 216, 219, 234
<i>L. helveticus</i>	4, 97, 207, 429	245,495	219,518
<i>L. brevis</i>	4, 102, 105, 526	245,495	68, 219, 450

Визуализация результатов отбора рестриктаз осуществлялась на примере 5 видов *Lactobacillus* – *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. casei* и *L. rhamnosus*. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами 337F и 1100R, обработанных рестриктазой Msp I изображена на рисунке 9.

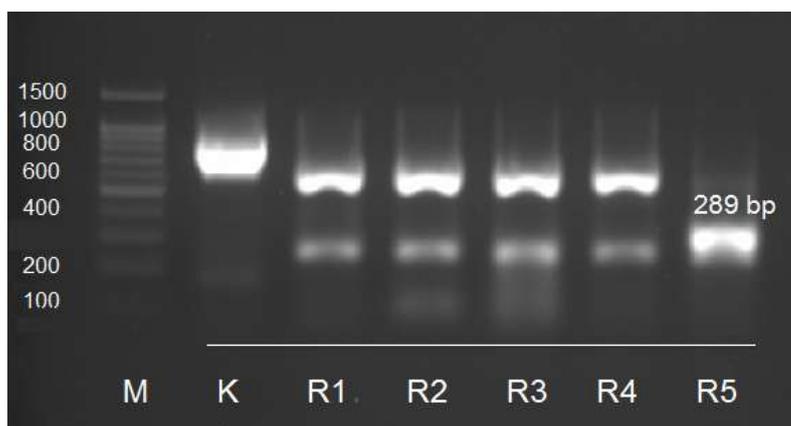


Рисунок 9 – Электрофореграмма продуктов рестрикции Msp I. К – ПЦР-продукт до рестрикции; R – ПЦР-продукты после рестрикции.

R1 – *L. rhamnosus*; R2 – *L. plantarum*; R3 – *L. casei*; R4 – *L. helveticus*; R5 – *L. delbrueckii*. M – ДНК-маркер

Рестриктаза Msp I однозначно идентифицировала *L. delbrueckii*, разрезая последовательность с образованием фрагмента 289 п.н., контрастирующего с другими паттернами рестрикции. На рисунке 10 изображены результаты рестрикции эндонуклеазами рестрикции Alu I и AspLE I.

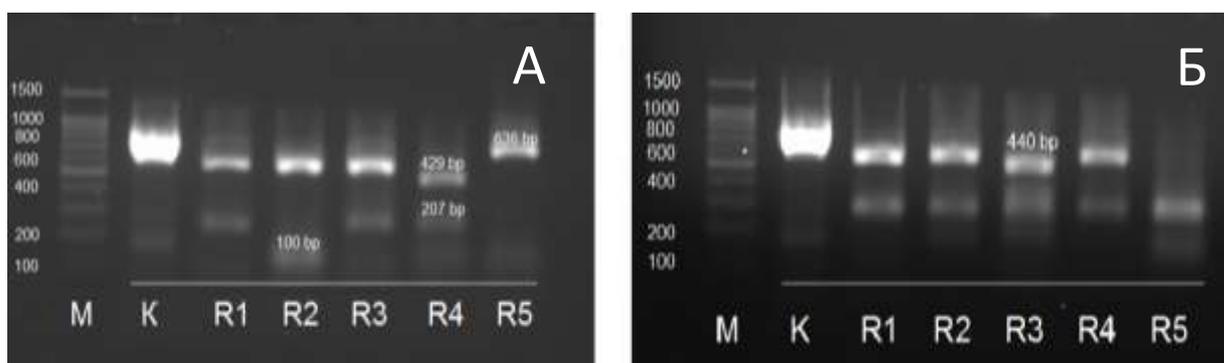


Рисунок 10 – Электрофореграмма продуктов рестрикции Alu I (А) и AspLE I (Б). К – ПЦР-продукт до рестрикции; R – ПЦР-продукты после рестрикции. R1 – *L. rhamnosus*; R2 – *L. plantarum*; R3 – *L. casei*; R4 – *L. helveticus*; R5 – *L. delbrueckii*. М – ДНК-маркер

Эндонуклеаза Alu I специфически разрежала последовательности *L. plantarum* и *L. helveticus*, а AspLE I – *L. casei*, обеспечивая образование фрагмента в 440 п.н. Несмотря на то, что вид *L. rhamnosus* образовывал идентичные фрагменты с *L. plantarum* в результате работы AspLE I, его идентификация возможна благодаря использованию данной рестриктазы в качестве заключающей в процессе определения видов. Это связано с тем, что *L. plantarum* может быть определен на предыдущем этапе идентификации на основании использования рестриктазы Alu I, образуя специфический фрагмент рестрикции размером 100 п.н.

На втором этапе был разработан метод идентификации для наиболее значимых представителей бифидобактерий. В качестве праймеров также были выбраны праймеры 337F и 1100R. Длина амплифицированного фрагмента последовательности гена *16S рРНК* составляла 760 п.н. Было отобрано 4 рестриктазы, позволяющие дифференцировать 5 видов рода *Bifidobacterium*. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Ожидаемые длины продуктов рестрикции (п.н.) при проведении рестрикционного анализа для определения бактерий рода *Bifidobacterium*

Вид / рестриктаза	BstHI I	AsuHP I	Sse9 I	Taq I
<i>B. breve</i>	2, 44, 240, 474	–	40, 116, 152, 207, 245	141, 148, 471
<i>B. longum</i>	7, 44, 235, 474	–	40, 116, 157, 202, 245	153, 607
<i>B. bifidum</i>	6, 42, 43, 91, 104, 474	135,625	319, 245, 40, 156	137, 152, 471
<i>B. adolescentis</i>	4, 43, 239, 474	137,623	40, 116, 154, 205, 245	139, 150, 471
<i>B. animalis</i>	43, 247, 474	–	40, 146, 245, 329	142, 147, 471

Визуализация результатов отбора рестриктаз осуществлялась на примере бактерии *B. bifidum*, являющимся одним из наиболее

распространенных пробиотических видов, используемых в качестве действующего компонента в пробиотиках (рисунок 11).

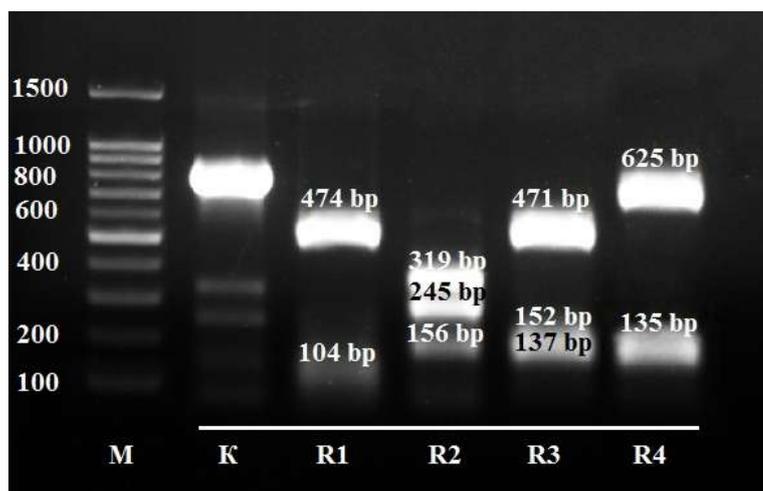


Рисунок 11 – Электрофореграмма продуктов рестрикции *B. bifidum* с различными рестриктазами. К – ПЦР-продукт до рестрикции; R – ПЦР-продукты после рестрикции. R1 – BstNI I; R2 – Sse9 I; R3 – Taq I; R4 – AsuNI I. М – ДНК-маркер

Рестриктаза BstNI I идентифицирует *B. bifidum*, формируя специфический фрагмент, величина которого составляет 104 п.н.

На основании проведенного исследования было установлено, что виды *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* и *B. animalis* могут быть идентифицированы на основе использования четырех рестриктаз – AsuNI I, BstNI I, Sse9 I и Taq I.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что оптимальным способом выделения ДНК из целевых микроорганизмов являлась экстракция ДНК с помощью диоксида кремния лизирующим раствором, содержащим гуанидинтиоцианат в концентрации не менее 5М с одновременным присутствием детергента 1% Triton X-100 или 1% Tween 20. Показано, что применение колонок с силикой и использование суспензии магнитных частиц способствовало повышению концентрации ДНК ампликона перед проведением секвенирования. При этом магнитные частицы позволяли получать препарат ампликона с высокой гомогенностью.

2. На основании данных высокопроизводительного секвенирования в 82% анализируемых заквасок выявлено присутствие бактерий рода *Streptococcus*. Относительное содержание бактерий рода *Bifidobacterium* в заквасках не превышало 20%.

3. Показано, что присутствие дополнительных видов лактобактерий помимо *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* в заквасках для приготовления йогуртов повышало титруемую кислотность к 8 часу ферментации при 37 °С и способствовало формированию нетипичного для молочнокислых продуктов запаха при длительной ферментации в течение 64 часов. Титруемая кислотность при 37 °С была достоверно выше, чем при 45 °С, если в составе закваски присутствовали бактерии рода *Lactobacillus*.

4. Установлено, что в процессе ферментации молочной основы с применением трехкомпонентной закваски вне зависимости от первоначального количества *B. bifidum*, в конечном продукте их относительное содержание составляло от 0,4 до 24,4%, что ниже по сравнению с *S. thermophilus* и *L. plantarum*. Уменьшение отношения *L. plantarum/B. bifidum* в закваске приводило к увеличению доли *S. thermophilus* в конечном продукте ферментации, что необходимо учитывать при производстве функциональных пробиотических продуктов.

5. Выявлено, что в процессе ферментации молока с применением комплексной закваски, включающей бактерий рода *Lactobacillus* (*L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*), *Streptococcus* и *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. animalis ssp. lactis*, *B. longum*), при приготовлении пробиотического продукта наблюдалось значительное увеличение рода *Lactobacillus* до 97,5% от общего числа бактерий к 15 часам ферментации. Это указывает на высокую антагонистическую активность видов *Lactobacillus* по отношению к остальным бактериальным таксонам многокомпонентной закваски.

6. Разработан метод ПЦР-ПДРФ, позволяющий идентифицировать наиболее значимые пробиотические виды лактобактерий и бифидобактерий. Идентификация *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus* и *L. brevis* осуществлялась на основе использования трёх рестриктаз – Alu I, AspLE I и Msp I. Идентификация *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* и *B. animalis* возможна на основе использования четырех рестриктаз – AsuHP I, BstHI I, Sse9 I и Taq I.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Метод высокопроизводительного секвенирования рекомендован для оценки состава коммерчески доступных многокомпонентных заквасок и пробиотиков.

2. При приготовлении пробиотического продукта путем ферментации молока с помощью закваски, содержащей бактерии *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, необходимо учитывать изначальное соотношение бактерий рода *Bifidobacterium* к бактериям рода *Lactobacillus* и, при необходимости, увеличивать это соотношение в сторону *Bifidobacterium* для получения сбалансированного по составу бактерий пробиотического продукта.

3. Разработанные ПЦР-ПДРФ методы идентификации видов лактобактерий и бифидобактерий рекомендованы для верификации таксономической принадлежности пробиотических культур бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus и/или Web of Science

1. Probiotics analysis by high-throughput sequencing revealed multiple mismatches at bacteria genus level with the declared and actual composition / M.Y. Syromyatnikov, E.Y. Nesterova, M.I. Gladkikh, V.N. Popov // LWT - Food Science and Technology. – 2022. – Vol. 156. – P. 113055.
2. Bacterial composition of dairy base during fermentation / M.V. Gryaznova, I.Yu. Burakova, Y.D. Smirnova, E.Yu. Nesterova, N.S. Rodionova, E.S. Popov, M.Yu. Syromyatnikov, V.N. Popov // Food Processing: Techniques and Technology. – 2023. – Vol. 53, №3. – P. 554-564.
3. Optimising the method of isolating nucleic acids from kefir using a silica-based sorbent / E.Yu. Nesterova, M.I. Gladkikh, M.Yu. Syromyatnikov, V.N. Popov // Sorbtionnye i Khromatograficheskie Protsessy. – 2022. – Vol. 22, № 6. – P. 893-900.

### Публикации в изданиях RSCI

4. Характеристика состава стартовых культур бактерий, используемых для приготовления кисломолочных продуктов с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов *16S rPHK* / М.Ю. Сыромятников, О.С. Корнеева, Е.Ю. Нестерова, М.И. Гладких, Е.С. Попов, В.Н. Попов // Биотехнология. – 2022. – Т.38, №1. – P. 80-92.
5. Исследование способов концентрирования продуктов ПЦР для последующего секвенирования с помощью методов, основанных на сорбции нуклеиновых кислот / Е.Ю. Нестерова, Ю.Д. Дворецкая, М.В. Грязнова, М.И. Гладких, М.Ю. Сыромятников, Н.Н. Старкова, В.Н. Попов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2020. – Т. 22, № 6. – С. 782-788.
6. Исследование стартовых культур бактерий для мясной и молочной промышленности с помощью метагеномного секвенирования / М.Ю.

Сыромятников, Е.Ю. Нестерова, М.И. Гладких, М.М. Данылиев, О.С. Корнеева // Пищевая промышленность. – 2025. – Т. 9. – С. 137-146.

#### Другие публикации

7. Оценка разнообразия бактериальных сообществ коммерческих пробиотиков на основе критериев Shannon, Simpson и Chao 1 / Е. Ю. Нестерова, М. И. Гладких, А. С. Белоконов, А. Г. Малеева, М. Ю. Сыромятников // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ, Воронеж. – 2023. – № 25. – С. 175-179.
8. Анализ состава филумов стартовых культур бактерий для приготовления кисломолочных продуктов с помощью ПЦР в реальном времени / М. А. Селютина, Е. Ю. Нестерова, Д. В. Паршина, В. В. Чумакова, П. Д. Морозова, М. Ю. Сыромятников // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ, Воронеж. – 2022. – №. 24. – С. 237-241.
9. Применение ПЦР-ПДРФ и TaqManПЦР для идентификации микроорганизмов, значимых для пищевой промышленности и сельского хозяйства / Е.Ю. Нестерова // Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленной и пищевой биотехнологий. Воронеж, ВГУИТ, 2022.
10. Анализ бактериальных заквасок с помощью высокопроизводительного секвенирования / Е.Ю. Нестерова, М.И. Гладких, И.Ю. Буракова, П.Д. Морозова, Ю.Д. Смирнова, М.Ю. Сыромятников // Генетика и биоэнергетика клетки – основа современной медицины и биотехнологии : сборник материалов Международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию со дня рождения Василия Николаевича Попова (г. Воронеж, 17–18 сентября 2024 г.) / под ред. В.Н. Калаева. – Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2024. – С. 151-154.

#### Патенты

11. Пат. № 2842962 РФ, МПК С12Q1/68. Способ идентификации значимых для пищевой промышленности представителей рода *Lactobacillus* – *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus* и *L. brevis* на основе рестрикционного анализа гена *16S рPHK* / Е.Ю. Нестерова, М.И. Гладких, М.Ю. Сыромятников, О.Н. Крюкова, О.С. Корнеева; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий». № 2024134906; заявл. 21.11.2024; опубл. 04.07.2025, Бюл. № 19.