

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИНЖЕНЕРНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ»

На правах рукописи



Нестерова Екатерина Юрьевна

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

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент, М.Ю. Сыромятников

Воронеж – 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Ферментированные продукты.....	11
1.2. Пробиотические закваски. Применение в пищевой промышленности.....	12
1.3. Контроль качества и состава заквасок и пробиотиков.....	19
1.4. Молекулярно-генетические методы идентификации микроорганизмов.....	23
1.5. NGS в исследовании микробиомов.....	27
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	34
2.1. Объекты исследования.....	34
2.2. Методы исследования.....	39
2.2.1. Выделение ДНК из культур микроорганизмов.....	39
2.2.2. Полимеразная цепная реакция участков гена <i>16S rPHK</i> для рестрикционного анализа.....	41
2.2.3. Высокопроизводительное секвенирование участков бактериальных генов <i>16S rPHK</i> на платформе Illumina MiSeq.....	42
2.2.4. Высокопроизводительное секвенирование участков бактериальных генов <i>16S rPHK</i> на платформе Ion torrent PGM.....	42
2.2.5. Секвенирование тотальной бактериальной ДНК, экстрагированной из заквасочных культур, на платформе DNBSEQ-G50.....	44
2.2.6. Активация закваски в стерилизованном обезжиренном молоке.....	46
2.2.7. Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов гена <i>16S rPHK</i> бактерий рода <i>Lactobacillus</i> и <i>Bifidobacterium</i>	47
2.2.8. Проведение аналитического электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле.....	47
2.2.9. Исследование технологических параметров заквасок.....	48
2.2.10. Статистический анализ.....	49
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	50

3.1. Подбор метода выделения бактериальной ДНК из кисломолочной продукции с помощью сорбента на основе диоксида кремния	50
3.2. Разработка способов концентрирования продуктов ПЦР как предварительный этап высокопроизводительного секвенирования.....	54
3.3. Выявление таксономического состава и соотношения бактерий в пробиотиках с применением высокопроизводительного секвенирования	59
3.4. Скрининг бактериального состава заквасочных культур с помощью высокопроизводительного секвенирования	63
3.5. Динамика бактериального состава молочной основы в процессе ферментации	66
3.6. Анализ технологических свойств пробиотических заквасок	77
3.7. Видовая идентификация лактобактерий и бифидобактерий на основе ПЦР-ПДРФ	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
ВЫВОДЫ	97
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	99
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	100
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	101
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	126
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Патент на изобретение.....	127

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Современный человек в своей жизни все чаще сталкивается с такими неблагоприятными факторами как гиподинамия, несбалансированное питание, стрессы, различные инфекционные заболевания, провоцирующие приём антибиотиков [140]. Это способствует тому, что всё больше людей делает выбор в пользу продуктов питания, оказывающих благоприятное влияние на здоровье, такие как кисломолочные пробиотические продукты [22]. Терапевтические и профилактические действия, оказываемые пробиотиками на организм человека, напрямую зависят от бактерий, входящих в его состав. Изменения в составе или соотношении популяций бактерий в пробиотике, а впоследствии и в конечном продукте, непосредственно влияют на эффективность и безопасность продукта [168, 219, 231]. Обеспечение стабильности производства пробиотической молочной продукции требует разработки эффективных подходов оценки качества заквасок и пробиотиков [130, 133, 234].

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 [55].

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 серьезными ограничениями по причине больших временных и материальных

затрат [172]. 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 [34]. Классические микробиологические подходы в определении таксонов бактерий в настоящее время уступают современным молекулярно-генетическим технологиям.

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. [32], Asano S. [24], Pal K. [46], Cousin F.J. [162], Сливка И.Н. [3], Стоянова Л.Г. [4], Guo L. [106], Беспоместных К. [1] и другие.

Благодаря использованию молекулярно-генетических методов повышается скорость, эффективность и точность анализа [55, 122, 158, 94, 153]. Для проведения экспресс-идентификации отдельных видов бактерий может быть применен метод ПЦР-ПДРФ, основанный на рестрикции продуктов амплификации исследуемых образцов с помощью специфичных эндонуклеаз [157]. Применение методов, основанных на высокопроизводительном секвенировании и ПЦР-анализе, обеспечивает наиболее эффективное решение вопроса идентификации состава пробиотиков, о чем свидетельствуют работы Chen Z. [227], Shehata H.R. [98], Youn S.Y. [64], Zhang J. [235], Argentini C. [69], Торопов В.А. [2] 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 молочнокислых продуктов на основе смеси *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, BstHI 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 продуктах.

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 апробация 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.

Основные положения, отраженные в диссертации, были изложены на Всероссийских и Международных конференциях различного уровня: Международная научно-практическая конференция «Молоко и молочная продукция: актуальные вопросы производства» 22-24 июня 2021 г., г. Углич; Научно-практический семинар «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленной и пищевой биотехнологий» 7 декабря 2022 г., Воронеж, ВГУИТ; IX Международная научно-практическая конференция «Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых» 20 апреля 2023 г., Новосибирск; XI Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» 11-15 сентября 2023 г., Воронеж, ВГУИТ; V Международная научно-практическая конференция, посвящённая дню рождения Николая Васильевича Верещагина «Передовые достижения науки в молочной отрасли» 26 октября 2023 г., Вологда;

Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию со дня рождения Василия Николаевича Попова «Генетика и биоэнергетика клетки – основа современной медицины и биотехнологии» 17-18 сентября 2024 г., Воронеж, ВГУ).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 2.7.1 – Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ, а именно п.п. 9 «Исследования качества и безопасности сырья, готовых пищевых продуктов, ингредиентов и биологически активных веществ, полученных биотехнологическими методами; методы оценки подлинности биотехнологических пищевых продуктов и компонентов».

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.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ферментированные продукты

Для пищевой промышленности актуальными и острыми являются вопросы безопасности и качества изготавливаемой продукции и её компонентов [133]. Нарушение технологий и несоблюдение мер безопасности при производстве могут приводить к изменению ожидаемых органолептических свойства готовых продуктов питания. В результате это либо делает невозможным их продажу и употребление в пищу, либо, в худшем случае, представляет угрозу для здоровья человека [96, 155]

Безопасность продуктов питания – главное требование к любому производству, предприятию, работающему в пищевой промышленности. Большую роль в вопросе безопасности играют бактериальные патогены, способные заражать продукцию на всех этапах, начиная с выращивания животных и растений и заканчивая хранением готовой продукции на прилавке [12]. Так, например, многие виды бактерий могут формировать так называемые биоплёнки, способные повышать уровень перекрёстного загрязнения продуктов в несколько раз, что служит причиной пищевых отравлений [137]. Существует перечень норм, содержащий все необходимые требования для ведения пищевого производства. Эти требования содержат точные минимальные количества того или иного штамма бактерий на определенном участке (цех, стены, пол и т.д.), продуктах питания и точек реализации готовой продукции [60].

Продукты питания, производство которых основано на протекании ферментативных процессов, привлекают особое внимание, поскольку непосредственно связаны с микроорганизмами [204]. В результате метаболических реакций, происходящих в бактериальных культурах в процессе ферментации, у продуктов формируется определенный вкус, текстура, а также полезные для здоровья человека свойства, как, например, в случае применения заквасок и пробиотиков [84].

Помимо того, что ферментированные продукты являются источниками белка, витаминов и минералов, употребление их в пищу может способствовать регуляции проницаемости кишечника, влиять на концентрацию лактозы, а также фенольных соединений, ответственных за антиоксидантную активность [41].

Употребление в пищу ферментированных продуктов может благоприятно сказываться на отдельных аспектах состояния здоровья человека. Особенно это касается ферментированных кисломолочных продуктов, поскольку им приписывают способность оказывать моделирующее влияние на состояние кишечника человека [21]. Стимулируя пролиферацию полезных бактерий и изменяя состав кишечной микробиоты, такие ферментированные продукты могут положительно влиять на протекание воспалительных кишечных заболеваний [33].

Акцентирование внимания научного сообщества на аспекте, связанном с контролем качественных характеристик и микробиологического состава заквасок и пробиотиков, определяется изменениями в функционировании желудочно-кишечного тракта, уменьшении активности пробиотической микрофлоры кишечника, а также недостаточным количеством биологически активных и пробиотических веществ в рационе человека.

1.2. Пробиотические закваски. Применение в пищевой промышленности

Закваски – это совокупность одного или более типов культур живых микроорганизмов, применяемых в пищевой промышленности для ускорения процесса образования отдельных соединений или продуктов, обладающих особыми характеристиками. Эти свойства придаются благодаря ферментативной активности бактерий и грибов [88]. Закваски активно используют во всем мире и спектр их применения довольно широк, поскольку они позволяют осуществлять массовое производство продуктов питания с повышенной безопасностью и сокращенным временем ферментации [139]. Закваски способны подавлять рост микроорганизмов, вызывающих порчу продуктов, а также патогенных микроорганизмов [22]. На их основе производят кисломолочные продукты

(йогурт, кефир, сыр и др.) [23], алкогольные напитки (пиво и вино) [189], изготавливают колбасы и хлеб [25, 136], а также применяют для ферментации овощей и фруктов [199, 202]. За счёт своей адаптированности к субстратам, использование заквасок позволяет получать продукт с предсказуемыми свойствами, что повышает эффективность производства [191].

Существует большое разнообразие заквасок, различающихся между собой составом микробиома. Микробиом представляет собой особое сообщество микроорганизмов, составляющих основу стартовой культуры. От степени чистоты и активности бактериальных культур, входящих в состав заквасок, зависят качественные характеристики конечного продукта. В зависимости от того, какая бактерия взята за основу, будет различаться формирующийся в процессе ферментации конечный продукт. Так, например, использование молочнокислых бактерий обеспечивает образование молочной кислоты, а в случае применения для брожения дрожжей образуется этанол [150]. Помимо них могут образовываться пропионовая и уксусная кислоты, бактериоцин, перекись водорода и другие соединения. Синтезируясь в процессе ферментации, они способны, например, подавлять рост бактерий, вызывающих порчу продуктов (*Clostridium* spp., *Pseudomonas* spp. и *Brochothrix* spp.) [87]. При этом принято считать, что наибольшей эффективностью обладают закваски, в основе которых находятся микроорганизмы, выделенные из нативной микробиоты традиционных продуктов. Такие культуры являются более адаптированными к окружающей среде и обладают повышенной способностью осуществлять контроль над патогенной микрофлорой, которая может образоваться в процессе производства пищевых продуктов [135].

В основу заквасок могут входить бактериальные культуры, дрожжи, а также различные плесневые грибки. При этом наиболее распространенной является совокупность молочнокислых культур, так называемая, LAB (молочнокислые бактерии). В её состав входят молочнокислые бактерии *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Lactococcus*, а также в ряде случаев *Propionibacterium* и *Bifidobacterium* [53]. Помимо них выделяют нестартерные молочнокислые бактерии (nsLAB), главной

задачей которых является поддержание баланса биоразнообразия, которое нарушается при пастеризации продуктов. Ими вносятся особый вклад в формирование вкуса изделия и скорости его созревания [31]. Особую роль в процессе ферментации отводят коагулазонегативным стафилококкам (CNS). *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus equorum* и *Staphylococcus xylosus* являются безопасными представителями своего рода и оказывают влияние на сенсорные свойства ферментированных продуктов [99]. Все перечисленные группы микроорганизмов активно применяют при ферментации мясной и молочной продукции.

Пробиотические закваски или пробиотики представляют собой совокупность живых микроорганизмов, способных оказывать благоприятное воздействие на состояние здоровья человека [177]. Пробиотики могут использоваться как фармакологический препарат или биологическая добавка к пище, так и в качестве заквасочных культур в ферментационных процессах. Помимо питательных свойств, они проявляют иммуномодулирующее и противовоспалительное действия [21]. Установлено, что ежедневное употребление в пищу пробиотической продукции в объеме 10^8 - 10^9 КОЕ/см³ позволяет бактериям оказывать свои положительные воздействия на организм человека [130]. Их доступность к употреблению облегчается разнообразием форм. Помимо пробиотических пищевых продуктов, используются капли, лиофилизированные порошки и капсулы, а также микрокапсулы, обеспечивающие стабильность штаммов при длительном хранении [179].

Состав пробиотиков может варьировать в зависимости от микроорганизмов и выполняемых функций. Встречаются как моно-, так и полиштаммовые варианты [230]. Основным критерием при выборе бактерий, которые потенциально могут быть использованы при производстве пробиотиков, является их безопасность в отношении человека и животных. Штаммы не должны обладать свойствами антибиотикорезистентности и являться источниками развития инфекций [58]. Помимо этого, микроорганизмы, используемые в пробиотиках,

должны обладать способностью сохранять свои полезные свойства в процессе производства и хранения, вплоть до момента реализации [237].

В качестве главных пробиотических бактерий рассматриваются *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Это связано с тем, что представители этих родов являются важными компонентами микробиома кишечника человека [48]. Помимо них при производстве пробиотиков активно применяются *Lactococcus*, *Enterococcus* и *Propionibacteria*, а также дрожжи, ввиду полезных эффектов, которые они оказывают на состояние здоровья человека [203].

Кисломолочные ферментированные продукты на протяжении тысячелетий присутствуют в рационе человека. Наиболее распространенными являются кефир и йогурт. Йогурт получают путём брожения молока, прошедшего термическую обработку. За счёт воздействия температур и низкого значения pH, сохраняющегося при ферментации, этот продукт считается безопасным. Для изготовления йогуртов, как правило, используют *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* [229]. Между этими видами возникает симбиотическая связь, что обеспечивает протекание ферментационных процессов. Вырабатываемые *S. thermophilus* пировиноградная и муравьиные кислоты и углекислый газ используются для активации роста *L. bulgaricus*, которые в свою очередь осуществляют гидролиз молочных белков, стимулирующих дальнейшее размножение *Streptococcus* [181]. При изготовлении йогуртов могут быть использованы и другие представители *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* для придания продукту пробиотических характеристик [56]. Кефир является слабокислым ферментированным напитком, изготавливаемым на основе молока и кефирных зерен, используемых в качестве закваски [126]. По своей структуре кефирные зерна представляют желеподобные образования, состоящие из различных комбинаций бактерий и дрожжей, различающихся в зависимости от страны или региона изготовления. В качестве основных ингредиентов используют ЛАВ-культуры, дрожжи и уксуснокислые бактерии (ААВ). Чаще всего это штаммы *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter*, а также грибы *Kluveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Kazachstania*, *Lachancea* и

Yarrowia [67, 73]. При этом микробиотический состав кефира варьирует и в процессе ферментации. Например, на ранних стадиях преобладающим видом может являться *Lactobacillus kefiranofaciens*, а с течением времени его место занимает *Leuconostoc mesenteroides*, что сопровождается аналогичной заменой в концентрации летучих соединений [152]. Анализ бактериальных и грибных штаммов, выделенных из кефира, показал наличие у них пробиотической активности, что присваивает кефиру уникальный статус натурального пробиотического напитка [163]. Помимо прочего, в процессе ферментации кефира образуется большое количество биоактивных пептидов, антимикробных соединений, аминокислот и витаминов, например группы В [207].

В качестве источников пробиотических микроорганизмов могут выступать не только молочнокислые продукты – йогурты и кефиры. Ими могут выступать и ферментированные продукты, такие как сыры, мясо и овощи [234]. Например, на практике применяются штаммы, полученные из растений, в том числе капусты и огурцов. Анализ выделенных из них штаммов *Lactobacillus* показал безопасность этих бактерий [114].

Сейчас активно проводят исследования, направленные на создание продуктов питания, содержащих в составе пробиотические компоненты. Особое внимание уделяется сырью, поскольку от него зависит сохранение жизнеспособности пробиотических бактерий. На этот аспект могут повлиять вещества и соединения, входящие в состав сырья, в том числе и его кислотность [83]. Так, например, в качестве потенциальных объектов рассматриваются соки. Пробиотические соки, в состав которых входят штаммы *L. rhamnosus* и *Bacillus coagulans*, исследуют на способность сохранять свою функциональность с течением времени [215, 224].

Полезные свойства, проявляющиеся в результате употребления пробиотиков, распространяются не только на желудочно-кишечный тракт. Попадая в организм человека, пробиотические штаммы вступают во взаимодействие с бактериями кишечника, вследствие чего происходит синтез метаболитических веществ, оказывающих влияние на состояние и

функционирование различных систем, в том числе иммунной, гормональной и пищеварительной. Так, например, в комбинации с дрожжами пробиотические бактерии способны снижать адгезию патогенных микроорганизмов к эпителиальным стенкам кишечника [142]. Многочисленные исследования подтверждают весомый вклад в облегчение симптомов и улучшения состояний при воспалительных заболеваниях, в том числе болезни Крона [140]. Курс пробиотиков, употребляемых беременными женщинами провоцировал положительную динамику в состоянии здоровья будущих матерей, а также улучшал их метаболизм и метаболизм плода [173].

Известна потенциальная роль пробиотиков в минимизации токсических эффектов, оказываемых ксенобиотиками при попадании в организм [176]. За счёт блокирования способности всасывать вещества клетками стенки кишечника, пробиотические микроорганизмы снижают уровень поступления в организм различных микотоксинов и тяжелых металлов [182].

На сегодняшний день в научном сообществе активно поднимается вопрос разработки пробиотиков следующего поколения [134]. На эту роль рассматриваются бактерии таких родов, как *Bacteroides*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium* и *Eubacterium* [209].

Особый интерес представляет вид *Akkermansia muciniphila*. Эта бактерия является ярким представителем рода *Verrucomicrobiota*, который был впервые изолирован и идентифицирован из кишечного микробиома человека [14]. Установлено, что данный бактериальный вид присутствует в кишечном тракте повсеместно с младенчества, а его количество от общей микрофлоры составляет около 3% [208]. При этом с возрастом наблюдается рост численности популяции *A. muciniphila* [120].

A. muciniphila характеризуется способностью облегчать симптомы, развивающиеся в рамках метаболического синдрома, а короткоцепочечные жирные кислоты, вырабатываемые *Eubacterium limosum*, обеспечивают снижение показателей провоспалительных интерлейкинов, тем самым сохраняя целостность слизистой оболочки [37, 80]. В качестве субстрата для роста *A. muciniphila*

использует муцин, содержащийся в слизистой оболочке эпителия. В ходе каскада реакций разложения муцина образуются такие побочные продукты метаболизма, как пропионат и ацетат, которые, в свою очередь, являются субстратом для роста других бактерий кишечника человека [66]. Таким образом, *A. muciniphila* способна регулировать жизнедеятельность кишечной бактериальной микрофлоры. По типу дыхания — это анаэробная грамотрицательная бактерия, которая не способна образовывать эндоспоры. Однако в недавних исследованиях, продемонстрирована способность к жизни *A. muciniphila* под воздействием низких значений концентрации кислорода [10].

Патогенный потенциал *A. muciniphila* активно подвержен изучению в связи с тем, что механизм разложения муцина чаще всего характерен для возбудителей различных бактериальных инфекций [66]. Однако, в отличие от них, *A. muciniphila* не проникает в глубокие слои слизистой оболочки, тем самым не вызывает повреждение эпителия кишечника. Она локализуется на поверхности слизистого слоя, конкурирует за субстрат с патогенами, тем самым выполняет защитную функцию в организме, а также участвует в процессе регенерации клеток эпителия кишечника [16].

На сегодняшний день экспериментально доказано влияние кишечных бактерий и их биоразнообразия на проявление и тяжесть течения патологических процессов в организме [59]. Понимание патогенеза кишечных расстройств на микробном уровне позволяет использовать бактериальные культуры в качестве инструмента для борьбы с заболеваниями различного генеза. В связи с этим *A. muciniphila* можно рассматривать как потенциально хороший вариант нового пробиотического препарата для терапии и профилактики болезней желудочно-кишечного тракта [15]. Это объясняется тем, что *A. muciniphila* регулирует барьерную функцию кишечника организма-хозяина, а также участвует в реакциях иммунного ответа [62]. Известно, что пробиотическую культуру *A. muciniphila* предлагают использовать в терапии кишечных расстройств, атеросклероза, диабета, ожирения и рака [13, 17, 210].

Широкий спектр действия пробиотиков, оказываемый на здоровье человека, позволяет рассматривать их как потенциальную альтернативу антибиотикам и препаратам, направленным на подавление воспалительных процессов в организме [233]. В животноводстве пробиотики на основе LAB-культур рассматривают в качестве стимуляторов роста и иммуномодуляторов [174]. Помимо продуктов, употребляемых в пищу, они могут быть использованы в качестве составных компонентов в косметических средствах. Однако в этом случае используются не сами живые бактерии, а их лизаты и экстракты, получившие название постбиотики [52, 179]. Установлено, применение продуктов на основе постбиотиков обеспечивало прогресс в лечении атопического дерматита и акне [85]. Рассматривается возможность разработки пластырей на основе штаммов *S. salivarius* K-12, *S. salivarius* M-18 и *L. plantarum* 8P-A3, которые вырабатывают бактериоцин, подавляющий рост патогенных микроорганизмов при ранениях и иных поражениях кожи [6].

1.3. Контроль качества и состава заквасок и пробиотиков

Для получения высококачественной продукции состав заквасок и пробиотиков должен быть четко регламентирован, иначе это может привести к неблагоприятным для производителей и потребителей последствиям [88]. Например, в результате уменьшения активности заквасочных бактерий нарушается процесс сквашивания молока, вплоть до подавления процессов свертывания. Консистенция конечного молочного продукта изменяется под действием процессов жизнедеятельности уксуснокислых бактерий [72, 73].

На сегодняшний день производство кисломолочных продуктов направлено на интенсификацию процессов изготовления, расширение ассортимента выпускаемой продукции, повышение ее биологической и пищевой ценности, улучшение органолептических свойств. Подобные изменения должны обеспечивать увеличение спроса на новые виды заквасок, в связи с чем, перечень микроорганизмов, включаемых в их состав, постоянно расширяется.

Серьезной проблемой, с которой сталкиваются производители молочнокислой и мясной продукции, является её обсеменение эукариотическими и прокариотическими микроорганизмами (дрожжи, плесень, гнилостные микроорганизмы) и патогенами [183, 187]. В качестве источников поступления патогенных микроорганизмов выступает вода, производственный инвентарь, поверхности, входящее сырьё, работники и т.д. [151].

Существует большое разнообразие микроорганизмов, загрязняющих заквасочные культуры. К грибным контаминантам хлебных заквасок относят представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Monilia*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, а также *Rhizopus* [111]. Главными бактериями-патогенами мясных заквасок считаются виды *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *L. monocytogenes*, патогенные штаммы *E. coli*, *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, а также *S. aureus*, *C. perfringens* и *C. botulinum* [135]. Чтобы избежать попадания таких видов в пищу, разработан широкий спектр подходов, к которым можно отнести особенности упаковывания конечного продукта, обработка спиртом и пропионовой кислотой производственного инвентаря, инфракрасное облучение, а также включение, помимо основных, специальных вспомогательных заквасочных культур. Последние представлены чаще всего молочнокислыми культурами бактерий, которые за счет выработки молочной и уксусной кислот снижают кислотность среды и тем самым продлевают срок хранения продуктов [180]. Экспериментально подтверждено, что *L. plantarum* является антагонистом роста патогенных грибов рода *Aspergillus*. Такая противомикробная активность связана со способностью молочнокислых бактерий продуцировать индолы, биоактивные белки, а также различные модификации молочной кислоты – фенилмолочную и гидроксифенилмолочную кислоты [111].

Бактериофагам отводится роль главной микробиологической угрозы при производстве ферментированных продуктов [35]. Они потенциально могут поражать микроорганизмы, применяемые для сбраживания молочных продуктов, ингибируя их рост [89]. Для предотвращения такого развития событий осуществляется регулярная видовая замена заквасочных бактерий, в том числе и

ротация штаммов внутри вида [226]. Помимо санитарной обработки и строгой асептики при размножении культур, необходимо осуществлять подбор сред таким образом, чтобы вещества, входящие в их состав, эффективно обеспечивали ингибирование роста и размножения фагов [43]. Своевременный мониторинг фагового загрязнения позволяет качественно осуществлять меры контроля производства заквасок. Классические микробиологические методы, среди которых тест на мутность и тест на активность, справляются с этой задачей хорошо, но такой подход занимает очень много времени [77]. В свою очередь оборудование для проведения электронной микроскопии является сравнительно дорогим, однако, также позволяет качественно осуществлять визуализацию и распознавать морфологию бактериофагов [35].

Разнообразие бактериальных культур, действие которых направлено на подавление микроорганизмов, вызывающих порчу молочной продукции, постоянно увеличивается. Несмотря на это, отсутствуют эффективные и оперативные методы, позволяющие проводить анализ качества и состава, а также оценивать влияние бактериальных сообществ, являющихся компонентами заквасочных и пробиотических культур, на микробиологический состав молока. Решение данных вопросов на основе молекулярно-генетических подходов в настоящее время ограничивается узконаправленными исследованиями, позволяющими идентифицировать отдельные бактериальные штаммы, либо отсутствуют вовсе.

Вопрос безопасности пробиотиков стал подниматься сравнительно недавно. Это связано с тем, что изначально пробиотики были ассоциированы с традиционными пищевыми продуктами, способными к естественному брожению, т.е. не рассматривались как лекарственные препараты. Их мониторингу уделялось незначительное внимание [76]. Для того чтобы отличать между собой группы пробиотиков различного назначения, было введено понятие «фармабиотики». Это биотерапевтические препараты, направленные на лечение и профилактику заболеваний человека и животных, а не используемые в качестве биологически активных добавок или пищевых продуктов [51].

Плохое качество пробиотических продуктов, как правило, основывается на количественном несоответствии заявленных производителем микроорганизмов, а также измененном составе [127, 175]. К тому же, было выяснено, что живые микроорганизмы, входящий в состав пробиотиков, могут провоцировать потенциальные риски при длительном воздействии на микробиом человека и животных, иммунитет и другие физиологические параметры [222]. Эти опасения распространяются на бактериальные штаммы (состав), качество готовой продукции (эффективность), область применения пробиотика, в том числе способы приёма или введения в организм [44]. Так, например, определенные штаммы рода *Enterococcus* (*E. faecium* M74 и *E. faecium* SF-68) подозревают в устойчивости к ванкомицину и участии в горизонтальном переносе генов антибиотикорезистентности [29]. Несмотря на это, они активно используются в качестве пробиотических добавок для кормов у животных по причине высокой эффективности действия [201]. Установлены диапазоны допустимости уровня антибиотикорезистентности для отдельных видов, которые используют в производстве пробиотиков чаще всего. Однако, это не распространяется на штаммы [97].

Объединённый экспертный комитет ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам сформулировал основные положения, содержащие требования к используемым пробиотическим микроорганизмам. В первую очередь, они должны обладать статусом GRAS, т.е. являться общепризнанно безопасными [234]. Несколько лет назад были представлены результаты масштабного исследования, главной задачей которого было установить, какие патогенные организмы являются наиболее частыми загрязнителями пробиотических препаратов. Среди них лидирующее положение занимали *Acinetobacter baumannii*, *Lysinibacillus fusiformis*, *E. faecium*, *B. cereus* и некоторые виды *Staphylococcus* [197].

Одним из главных загрязнителей заквасок цельно-зерновых продуктов питания является *S. aureus* [74]. Обнаружено, что в процесс ферментации помимо заквасочных культур легко включаются и другие бактерии, в число которых входят патогенные виды. Продукты из теста являются благоприятной средой для

роста условно-патогенных микроорганизмов [221]. Попадая в закваску, золотистый стафилококк начинает конкурировать за субстрат со стартовыми культурами, вытесняя полезную микрофлору продукта. В связи с этим, бактерия *S. aureus* включена в список маркеров санитарного контроля качества мучных изделий. Активный рост условно-патогенных представителей рода *Staphylococcus* выявлен также в свинине, рисовых лепешках, молоке, что указывает на его достаточную распространенность [7, 178]. На сегодняшний день обнаружено большое разнообразие патогенных штаммов *S. aureus*, однако, *S. aureus* CICC21600 один из самых распространенных и используется в качестве положительного контрольного штамма в исследованиях, посвященных изучению безопасности пищевых продуктов [7].

Идентификация бактериальных компонентов заквасок и пробиотиков обычно осуществляется на основе метода окраски по Граму, анализа подвижности микроорганизмов и способности синтезировать различные вещества, а также с помощью коммерчески доступных биохимических тестов [34]. Микробиологические методы не удовлетворяют запросы контроля качества, поскольку не могут охватить весь спектр микроорганизмов, присутствующих в заквасках и пробиотиках. К тому же фенотипическая изменчивость микроорганизмов затрудняет их идентификацию стандартными микробиологическими методами. Помимо этого, оценку пробиотических свойств бактериальных препаратов проводят на основе флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии и газовой хроматографии [113].

Необходимы подходы, позволяющие проводить оценку качественного и количественного бактериального состава продуктов, в том числе и в процессах ферментации и созревания конечной продукции.

1.4. Молекулярно-генетические методы идентификации микроорганизмов

Прорыв в области разработки молекулярно-генетических методов идентификации микроорганизмов позволяет выстраивать эффективные стратегии

контроля качества и состава заквасок и пробиотиков. Идентификация потенциальных пробиотиков в различных организмах и пищевых продуктах, а также определение безопасности и функциональности этих штаммов привлекает внимание исследователей по всему миру [65, 104, 105, 107, 109, 123, 232]. Скрининг и отбор культур, а также оценка их вклада в процессы ферментации и становления органолептических свойств готовой продукции основываются на методах гибридизации нуклеиновых кислот [28].

Исследования на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) являются наиболее часто используемыми в силу своей высокоспецифичности и чувствительности. Для идентификации пробиотических и заквасочных организмов помимо анализа генов рРНК, проводят исследования межгенных спейсерных участков (ITS), а также участков между генами, кодирующими тРНК [193]. Такой подход позволяет идентифицировать микроорганизмы вплоть до штамма, что является обязательным условием для оценки свойства культур, применяемых для изготовления ферментированных и пробиотических продуктов [108]. Методы, основанные на TaqMan ПЦР, позволяют быстро и точно идентифицировать целевой микроорганизм [95, 128, 217].

Использование олигонуклеотидных зондов, принцип работы которых строится на комплементарном связывании с 16S, 23S и 5S областями рРНК исследуемых микроорганизмов, обеспечивает надежную и быструю идентификацию ЛАВ-культур [18]. Выделяют два направления в зондировании нуклеиновых кислот – дот-блоттинг и FISH-гибридизация. В первом случае происходит *ex situ* количественная оценка рРНК на основании использования радиоактивно меченых зондов. FISH-гибридизация – это метод *in situ*, позволяющий осуществлять количественную оценку целевого организма [28].

Генотипирование на основе гель-электрофореза в импульсном геле (PFGE), методы RAPD и AFLP широко используются для внутривидового определения молочнокислых бактерий, в том числе, пробиотических культур, изолированных из ферментированных продуктов, а также кишечника человека [143]. На основе метода PFGE было идентифицировано множество разновидностей *Lactobacillus*,

среди которых *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus* и *L. johnsonii* [159, 223]. В качестве рестриктаз могут быть использованы *ApaI*, *AscI*, *SmaI*, *XbaI*, образующие фрагменты ДНК, разделяющиеся путем электрофореза в агарозном геле [132]. Несмотря на высокую воспроизводимость, метод PFGE является довольно трудоёмким и временозатратным [124].

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP) способствует идентификации близкородственных видов лактобактерий. Ферменты рестрикции обеспечивают расщепление нуклеиновых кислот с образованием фрагментов различной длины [157]. Так, например, рестриктазы *Alu I* и *Tac I* в результате реакции образуют специфические паттерны, достоверно идентифицирующие *L. acidophilus*, *L. helveticus* и *L. amylovorus* [132]. Метод T-RFLP, являясь модификацией предыдущего, использует меченые флуоресцентные праймеры, что освобождает от этапа посева при работе с поликультурными образцами [216]. Этот метод также находит применение в исследованиях кишечной микробиоты человека и животных [161]. Методика, объединяющая RFLP с методом проточной цитометрии позволяет еще эффективнее проводить дифференциацию микроорганизмов [184, 185].

Метод RAPD основан на использовании коротких праймеров, чей размер не превышает 10 нуклеотидов, и учитывает соотношение нуклеотидных пар GC и AT. Связывание праймера по принципу комплементарности с множеством гомологичных последовательностей в исследуемой ДНК, позволяет анализировать несколько штаммов одного вида в один момент [160]. На основе метода RAPD были детектированы относящиеся к одной группе такие бактерии, как *L. rhamnosus*, *L. paracasei subsp. tolerans* и *L. zaeae*. Такое полногеномное дактилоскопирование позволяет осуществлять оценку микробиологического состава препаратов, тем самым даёт возможность контролировать таксономические отклонения от установленных и заявленных норм [103].

Анализ полиморфизма длины амплифицированного фрагмента (AFLP) позволяет исследовать весь бактериальный геном. Типирование бактерий осуществляется путем использования двух групп рестриктаз – часто и редко

разрезающих. В основе метода лежит избирательная амплификация фрагментов, образующихся после рестрикции, и лигирование нуклеотидных адаптеров [193]. Считается, что метод AFLP обладает наибольшей эффективностью в отношении бактерий рода *L. casei* [160].

Благодаря видоспецифичным праймерам мультиплексная ПЦР позволяет идентифицировать целый спектр бактерий, относящийся к одному семейству, в одной пробирке. Это позволяет быстро и качественно анализировать соответствие заявленного и реального состава пробиотической продукции [185]. Опираясь на последовательность 16S рРНК, были разработаны праймеры, специфичные к видам *L. lactis subsp. lactis* и *L. lactis subsp. cremoris*, которые являются промышленно значимыми бактериями [165].

Разработанные специфические праймеры к локусу *16S рРНК*, используемые при постановке ПЦР, обеспечивали быструю идентификацию бактерий родов *Bacillus* и *Acinetobacter*, являющихся основными ферментирующими агентами при производстве традиционного китайского алкогольного напитка. Было установлено, точность такого определения штаммов бактерий составляла порядка 80% [9].

Низкая стоимость расходных материалов и широкое разнообразие вариантов обеспечивает первенство ПЦР среди других методов, применяемых для обнаружения бактериофагов [5]. Симплексная и мультиплексная ПЦР позволяет не только обнаруживать, но и осуществлять идентификацию фагов при производстве молочной продукции [42]. Количественная ПЦР позволяет одновременно идентифицировать несколько разновидностей фагов в одной пробирке благодаря использованию различных флуорохромов. Так, например, в результате анализа сырной продукции были детектированы бактериофаги *L. lactis* и *Leuconostoc* [63].

Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов (MLST) объединяет принципы ПЦР и секвенирования, что повышает эффективность идентификации консервативных локусов фаговых штаммов, в том числе обеспечивает дифференциацию близкородственных бактериофагов [156].

1.5. NGS в исследовании микробиомов

Успешное развитие пищевой промышленности зачастую зависит от разработанных стратегий контроля качества производимой продукции. Изучение таксономии, особенностей жизнедеятельности микроорганизмов-контаминантов служит гарантом безопасности продовольствия, в число которых входят не только готовые к употреблению в пищу продукты, но и ингредиенты, а также фрукты и овощи [131].

Несмотря на эффективность и зарекомендованность рутинного микробиологического подхода по контролю качества пищевых продуктов, он имеет некоторые особенности, которые в реалиях современного производства не всегда могут быть выполнимы (например, длительное время анализа) [172]. В связи с этим появилась потребность разработки более быстрого и точного метода, основанного на молекулярно-генетических знаниях. Им и стала технология секвенирования следующего поколения (NGS). Она позволяет изучать вопросы контаминации пищевых продуктов на всех этапах производства в кратчайшие сроки.

С помощью NGS возможно не только видовое определение организмов, но и характеристика генома объекта исследования, а также идентификация сложных бактериальных и грибковых сообществ, их метаболических путей. Метод высокопроизводительного секвенирования демонстрирует таксономическое богатство и разнообразие микробиома пищевых экосистем [78]. Такой целостный подход к изучению позволяет анализировать геномы организмов и их воздействие на среду обитания, например, проводить оценку безопасности микробного состава цехов, производственных столов, инструментов и самих продуктов питания [8]. К достоинствам высокопроизводительного секвенирования относят возможность идентификации патогенных микроорганизмов, содержащихся в низких концентрациях непосредственно в продуктах питания и на производственной среде.

Технология секвенирования была разработана и усовершенствована в конце 20 века и стала самым инновационным и новаторским подходом естественных наук [211]. Точность прочтений небольших отрезков ДНК размером до 1000 пар нуклеотидов дала возможность расшифровать генетический код организмов. Первые реакции секвенирования были высокочувствительными и трудоемкими, состояли из большого количества реакций. Однако, несмотря на это, геном человека, а также бактериальный геном были прочитаны именно таким способом. Исследования в рамках проекта «Геном человека» стали возможны благодаря секвенированию по Сенгеру [190]. Главными ограничениями первой технологии секвенирования являлись дороговизна, трудоемкость метода и короткая длина прочтений. В связи с этим, технология требовала усовершенствования, которое произошло в начале 2000-х годов.

Разработка метода высокопроизводительного секвенирования позволила по-другому взглянуть на генетический потенциал биологических систем. Стало возможным внедрение технологии NGS в здравоохранение, сельское хозяйство и пищевое производство. Высокопроизводительное секвенирование позволяет прочесть весь геном организма благодаря повторным рандомным чтениям за одну реакцию. Длина анализируемых последовательностей варьирует от 100 до 1000 пар нуклеотидов. Такое одномоментное прочтение последовательностей получило название массовое параллельное секвенирование. Благодаря биоинформатическому анализу происходит выравнивание, а также сборка ридов и сравнение с уже внесенными в базы данных последовательностями [164]. NGS технология значительно сократила финансовые затраты на одну реакцию секвенирования, а также сделала процесс более быстрыми и легкими в исполнении.

Комплексное участие таких областей науки, как биология, химия и информатика, позволили вывести методику секвенирования на следующий, более усовершенствованный уровень [93]. Теперь секвенирование – это относительно недорогой и автоматизированный процесс, решающий большой спектр задач. Сегодня существует широкое разнообразие генетических анализаторов, работа

которых нацелена на частные задачи, таким образом, делая их более доступными для потребителей. Помимо этого, NGS технология замещает многие традиционные микробиологические методы идентификации патогенов в пищевой промышленности. Высокопроизводительное секвенирование эффективнее справляется с серотипированием бактерий, их антибиотикорезистентностью и т.д. [38, 171]. В связи с этим, данный метод активно внедряется в надзорные органы и является инструментом контроля качества и безопасности объектов исследования разных сфер жизни, в том числе и пищевых продуктов [220].

Таргетным участком в идентификации микроорганизмов методом высокопроизводительного секвенирования служит последовательность *16S pPHK* [50]. Этому предшествовала активная и быстрая оптимизация подходов секвенирования нуклеиновых кислот. Понятие природы и специфичности молекул РНК и ДНК, позволяет использовать их короткие последовательности как цели для быстрой и точной идентификации организмов. При этом усовершенствование знаний молекулярных и химических аспектов секвенирования привело к развитию данной технологии от низкопроизводительного секвенирования нуклеиновых кислот до NGS секвенирования и секвенирования третьего поколения [141]. Технология NGS в сравнении с секвенированием по Сенгеру расширила таксономический потенциал идентификации. Она позволила более детально и полно определять представителей бактериального микробиома [45].

Гипервариабельные области консервативного гена *16S pPHK* дают возможность использовать его в качестве мишени в процессе идентификации. В связи с этим оптимизированные праймеры к данной последовательности позволяют проводить пробоподготовку и сам сиквенсный анализ бактерий. Важно отметить, что такой подход в идентификации и изучении генома, где в качестве таргета для амплификации и секвенирования используется единственный ген, кодирующий, например, *16S pPHK*, получил название метагеномные исследования [79]. Что касается идентификации грибов, то для них по аналогии с бактериальным геном был выбран *18S pPHK*. Однако помимо него существует

еще один универсальный участок, характерный только для представителей данного таксона – внутренний транскрибируемый спейсер (ITS). Область ITS не кодирует информацию и располагается между малой субъединицей рРНК и большой субъединицей рРНК. При этом участок ITS можно назвать видоопределяющим [186].

NGS технология, которая включает в себя также и биоинформатику, позволяет проводить анализ генома микробного сообщества в кратчайшие сроки. Такой инновационный подход дает возможность сравнивать обильность микробных штаммов в различных ассоциациях бактерий. Существует несколько вариантов анализа, среди которых геномное мультилокусное типирование (MLST) и анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) [213]. Если использовать эти два подхода совместно, то их результаты, дополняя друг друга, могут дать обширное представление о микробном сообществе.

Конечным этапом NGS является биоинформатический анализ данных. В его ходе нуклеотидные последовательности объединяют в оперативные таксономические единицы (OTU), которые в свою очередь сравнивают с известной базой данных. Таким образом происходит идентификация организмов. Впервые его осуществила группа ученых, изучающая микрофлору фитопланктона Саргассова моря [91].

Несмотря на то, что NGS до сих пор остается относительно новой методикой, её популярность и усовершенствование делает данный анализ доступным не только для научной, но и для практической сфер жизни, в частности, для предприятий пищевой промышленности. Секвенирование следующего поколения активно внедряется и демонстрирует положительные результаты на пищевых предприятиях [147]. Важно отметить, что большое количество научных трудов посвящены изучению бактериального разнообразия пищевых продуктов, где ген *16S рРНК* является главной целью исследования. Однако помимо бактерий большую роль в пищевых контаминациях отводится на нитчатые грибы и дрожжи. Это свидетельствует о необходимости увеличения

количества исследований, в которых грибы будут рассматриваться как источник загрязнения и порчи продуктов питания.

Зачастую технология секвенирования в пищевой промышленности применяется для оценки качества и состава ферментированных продуктов питания, например колбас, сыров и кимчи [129]. Уникальный процесс ферментации является результатом жизнедеятельности микроорганизмов, которые содержатся в продуктах [206]. Успешное внедрение данного метода анализа в пищевое производство объясняется тем, что рутинный микробиологический подход не способен определить полное таксономическое разнообразие микроорганизмов в продукте [57]. Результаты анализа NGS позволяют идентифицировать большое разнообразие видов в пищевых экосистемах [26, 78, 98, 187]. Обнаружена их взаимозаменяемость на уровне штаммов в продукте питания, что указывает на большую вариабельность ферментирующих микроорганизмов. При этом если комплексно изучать многообразие микробного сообщества и метаболомику, то можно выявить роль бактериальных и грибковых таксонов в получении конечного продукта питания [152].

На примере такой отрасли пищевого производства, как сыроделие, можно рассмотреть достижения технологий NGS. Изучение микробного разнообразия сыра методом высокопроизводительного секвенирования актуально. Это объясняется тем, что в процессе ферментации продукта участвуют большое количество микроорганизмов, к которым относят лабораторные закваски, содержащие молочнокислые бактерии, а также сформировавшуюся собственную микрофлору продукта, в число которой могут входить и патогенные представители. Поэтому микробиологический подход контроля качества сыроделия затруднен. Помимо этого, важной особенностью такого продукта как сыр является его неоднородный микробный состав, который формируется в процессе созревания [86].

Методом NGS удалось идентифицировать бактериальную микробиоту сыра. Она представлена преимущественно родами *Prevotella* и *Arthrobacter* [101].

Доказано, что микробный состав сердцевины сыра отличен от корки. Так на основании независимых исследований методом высокопроизводительного секвенирования было показано, что в микрофлоре корки сыра доминировали 14 бактериальных родов и 10 грибных. По мнению авторов, представители этих таксонов дополняли микробиом сердцевины и участвовали в созревании продукта [39, 40]. Поздние сыры в отличие от ранних имеют большее микробное разнообразие, которое сохраняется по мере готовности продукта. Это необходимо учитывать при стандартизации методик сыроделия [166]. На сегодняшний день NGS технология успешно внедрена в типирование сортов сыра [154].

Кефир стал своего рода модельным объектом исследования микробиома в пищевой промышленности методом высокопроизводительного секвенирования. Понимание сложности взаимосвязи между видами позволяет корректировать условия ферментации, тем самым повышать эффективность производства [145]. Высокопроизводительное секвенирование позволило выявить, что доминирующим бактериальным видом микробиома кефира является *L. kefiranofaciens*. Однако добавление изолированной культуры в молоко не регистрировало рост бактерии, что говорило о необходимости присутствия других бактерий и их продуктов жизнедеятельности для роста *L. kefiranofaciens*. Так, при совместном культивировании *L. mesenteroides* и *L. kefiranofaciens* наблюдался рост колоний. *L. kefiranofaciens* обеспечивает аминокислотами *L. mesenteroides*, а *L. mesenteroides* *L. kefiranofaciens* лактатом [119]. Практически доказано, что кефирные культуры бактерий приносят большой вклад в формирование уникального вкуса кисломолочного продукта [152]. NGS технология продемонстрировала хорошие результаты по оценке микробиоты продуктов питания, вызывающих реакции самопроизвольного брожения, например, кислой капусты или кимчи. Показано, что из всего многообразия микробиома, только представители рода *Leuconostoc* ответственны за экспрессию гена маннитдегидрогеназы [149]. Помимо этого, экспрессия генов ацетоина, диацетила и бутадиола была выявлена только у *L. mesenteroides* [167].

Многообразие исследований методом высокопроизводительного секвенирования позволило выявить роль микробиома в формировании текстуры, вкуса и запаха конечного продукта пищевой промышленности. Показано, что анализ метагенома позволил установить, что *Acetobacter pasteurianus* совместно с представителями *Lactobacillus* синтезируют ацетоин, который изменяет вкус. Несколько бактериальных культур разных таксонов, экстрагированных из уксусной кислоты, продуцируют намного больше ацетоина, чем монокультура [82].

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Для оптимизации метода выделения нуклеиновых кислот с помощью сорбента на основе диоксида кремния в качестве объекта исследования был использован коммерчески доступный кисломолочный продукт «Кефир». Для исследования способов концентрирования продуктов ПЦР для последующего секвенирования в качестве объектов исследования использовали смесь ДНК грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также ДНК грибов.

В исследовании динамики состава сложнокомпонентных заквасок в процессе ферментации использовали смесь видов бактерий, задепонированных в микробиологическом музее кафедры биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО ВГУИТ, включающую: *S. salivarius ssp. thermophiles*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *B. bifidum*, *B. animalis ssp. lactis*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. casei*. Также для исследования процессов ферментации были использованы культуры *L. plantarum* и *B. bifidum* из микробиологического музея кафедры биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО ВГУИТ. При разработке методов идентификации бактерий на основе ПЦР-ПДРФ использовали культуры бактерий *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosum*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *B. bifidum*.

При исследовании технологических свойств заквасок была проведена оценка состава и свойств 3 заквасок, доступных в свободной продаже на территории России, с помощью полногеномного высокопроизводительного секвенирования на платформе DNBSEQ-G50 (см. ниже). Для сквашивания использовали пастеризованное сухое обезжиренное молоко (АО «Молвест», Россия).

Также в качестве объектов исследования использовались коммерчески доступные закваски для приготовления кисломолочных продуктов в количестве 22 образцов, а также 18 образцов пробиотиков (таблица 1 и 2).

Таблица 1 – Исследуемые закваски для приготовления кисломолочных продуктов

№	Закваска	Страна производитель	Заявленный состав
1	Закваска для греческого йогурта	Россия	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>
2	Закваска для кефира	Россия	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc sp.</i> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
3	Закваска для йогурта	Болгария	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
4	Закваска для кефира	Россия	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> <i>Lactococcus lactis subsp. biovar diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>
5	Закваска для кефира	Болгария	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>
6	Закваска для кефира	Россия	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> <i>Lactococcus lactis subsp. biovar diacetylactis</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Leuconostoc sp.</i>
7	Закваска для наринэ	Россия	<i>Streptococcus termophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
8	Закваска для био йогурта	Болгария	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
9	Закваска для био йогурта	Россия	<i>Streptococcus termophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>
10	Закваска для йогурта	Болгария	<i>Streptococcus thermophilus</i>

			<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
11	Закваска для йогурта	Россия	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>
12	Закваска для йогурта	Россия	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>
13	Закваска для йогурта	Россия	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Bifidobacterium infantis</i>
14	Закваска для ряженки	Россия	<i>Streptococcus thermophilus</i>
15	Закваска для йогурта	Италия	<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
16	Закваска для молочной продукции	Россия	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
17	Закваска для йогурта	Россия	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>
18	Закваска для кефира	Россия	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> <i>Lactococcus slactis subsp. lactis biovar diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i> <i>Lactobacillus kefir candida kefir</i>

19	Закваска для кисломолочной продукции	Россия	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis subsp. diacetylactis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i>
20	Закваска для кисломолочной продукции	Россия	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis subsp. diacetylactis</i> <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i>
21	Закваска для кисломолочной продукции	Россия	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis subsp. diacetylactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i>
22	Закваска для кисломолочной продукции	Россия	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis subsp. diacetylactis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i>

Таблица 2 – Исследуемые пробиотики

Пробиотик	Страна производитель	Бактериальный состав
Образец №1	Россия	<i>Lactobacillus sakei</i>
Образец №2	Великобритания	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i>
Образец №3	Словения	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Enterococcus faecium</i>
Образец №4	Испания	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium longum</i>
Образец №5	Россия	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>

		<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Образец №6	Россия	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>
Образец №7	Великобритания	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> <i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>
Образец №8	Польша	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Образец №9	Россия	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Образец №10	Россия	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium longum</i>
Образец №11	Россия	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactococcus lactis ssp. lactis diacetylactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus,</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bacillus adolescentis</i> <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>
Образец №12	Россия	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i>

		<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i>
Образец №13	Канада	<i>Bifidobacterium animalis lactis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium longum longum</i> <i>Bifidobacterium longum infantis</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus salivarius</i>
Образец №14	Россия	<i>Bacillus subtilis</i>
Образец №15	Южная Корея	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium breve</i>
Образец №16	Армения	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium longum</i>
Образец №17	США	<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Streptococcus thermophiles</i>
Образец №18	США	<i>Akkermansia muciniphila</i>

2.2. Методы исследования

2.2.1. Выделение ДНК из культур микроорганизмов

Выделение ДНК было осуществлено комплектом реагентов ПРОБА-ГС (ДНК-технология, Россия) по следующей схеме:

1. Отобрать 50 мкл (мкг) биоматериала в чистую пробирку.
2. Добавить в каждую пробирку по 150 мкл лизирующего раствора и по 20 мкл предварительно ресуспендированного сорбента.
3. Плотно закрыть крышки пробирок, встряхнуть на вортексе в течение 3-5 сек.
4. Термостатировать пробирки в течение 20 мин при 50 °С.
5. Центрифугировать пробирки при 13000 g в течение 1 мин.
6. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
7. Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 сек.
8. Центрифугировать пробирки при 13000 g в течение 1 мин.
9. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
10. Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 сек.
11. Центрифугировать пробирки при 13000 g в течение 1 мин.
12. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
13. Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 сек.
14. Центрифугировать пробирки при 13000 g в течение 1 мин.
15. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
16. Открыть крышки пробирок и высушить осадок при 50 °С в течение 5 мин.
17. Добавить к осадку 100 мкл элюирующего раствора и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 5-10 сек.
18. Прогреть пробирки при 50 °С в течение 5 мин.
19. Центрифугировать пробирки при 13000 g в течение 1 мин.

20. Перенести надосадочную жидкость в новую пробирку. Надосадочная жидкость содержит выделенную ДНК.

При проведении высокопроизводительного секвенирования ДНК из образцов выделяли с помощью коммерчески доступного набора ZymoBIOMICS DNA Microprep Kit (Zymo research, США) и FastDNA(TM) Spin Kit (MP Biomedicals, США) согласно инструкции набора.

Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра HitachiF-7000 при длине волны 260 нм. О степени чистоты полученных препаратов судили по соотношению A_{260}/A_{280} .

2.2.2. Полимеразная цепная реакция участков гена *16S рРНК* для рестрикционного анализа

Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием Taq-полимеразы на приборе CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США).

Смешивали в пробирке на 0,25 мл следующие компоненты:

- 5X реакционный буфер ScreenMix-HS (Евроген, Россия) – 5 мкл;
- 50 пмоль прямой праймер – 1 мкл;
- 50 пмоль обратный праймер – 1 мкл;
- матрица ДНК – 0,5-5 мкл;
- деионизированная вода – до 25 мкл.

Помещали пробирки в амплификатор. Далее запускали программу на амплификаторе:

- первоначальный прогрев при 95 °С – 2 мин;
- 30 циклов вида:
 - денатурация при 95 °С в течение 30 сек;
 - отжиг праймеров при 54 °С в течение 30 сек;
 - элонгация цепи при 72 °С в течение 30 сек.
- инкубирование смеси при 72 °С в течение 5 мин.

2.2.3. Высокопроизводительное секвенирование участков бактериальных генов *16S pPHK* на платформе Illumina MiSeq

Библиотеки готовили с помощью ПЦР с использованием универсальных праймеров к области V4 гена *16S pPHK* в соответствии с ранее описанной методикой [19]. Были использованы следующие пары праймеров: 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3') [61] и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3') [20]. Для каждого образца ДНК готовили две библиотеки, которые секвенировали параллельно с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kits v2 (300 циклов) MS-103-1002 (Illumina, США) на секвенаторе MiSeq (Illumina, США), позволяющем считывать 150 п.н. с каждого конца. После секвенирования на выходе были получены файлы fastq, содержащие информацию о последовательностях анализируемых участков гена *16S pPHK*, а также информацию о достоверности считывания каждого отдельного нуклеотида.

После предварительной биоинформатической обработки данных, которая заключалась в объединении прямого и обратного считывания, фильтрации последовательностей с низкими показателями отдельных нуклеотидов, фильтрации химерных последовательностей, распределении считываний на основе последовательностей штрихкода и удалении технических последовательностей (включая последовательности праймеров для гена *16S pPHK*), было получено распределение последовательности по рабочим таксономическим единицам (OTU) на основе их сходства более 97%. Полученные OTU биоинформатически идентифицировались с помощью SILVAngs 1.3 [212].

2.2.4. Высокопроизводительное секвенирование участков бактериальных генов *16S pPHK* на платформе Ion torrent PGM

С помощью коммерчески доступного набора AMPure XP Beads (BeckmanCoulter, США) была проведена очистка ампликонов магнитными частицами. Библиотеки секвенирования получали согласно протоколу набора The

Ion AmpliSeq Library Kit 2.0. Пришивание баркодов осуществлялось с помощью набора The Ion Xpress Barcode Adapters (Thermo Fisher Scientific, США). Количество приготовленных библиотек анализировали методом ПЦР в реальном времени при использовании коммерческого кита Library Quantification Kit Ion Torrent Platforms (Кара Biosystems, США).

Для постановки реакций секвенирования на платформе Ion Torrent PGM применялись специализированные наборы Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit и Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

После завершения реакции секвенирования сырыми данными для биоинформатического анализа стали BAM-файлы. Они содержат большое количество информации, которая заключена в риды. Исходные BAM-файлы представлены бинарными нуклеотидными последовательностями. Для конвертирования ридов из BAM в FASTQ использовалось программное обеспечение Samtools 1.2. По средствам программы Ea-utils 1.3, а именно приложения Fastq-multx выполнен демультимплексинг ридов по команде:

```
fastq-multx -B barcodes.fa <имя_файла.fastq> -m 5 -o %.fastq
```

При этом аргумент `-m 5` разрешает до 5 несоответствий между последовательностями праймера и начальной последовательностью ампликона. Введение данного параметра в команду позволяет увеличить точность биоинформатического анализа данных. Также он позволяет отбросить так называемые шумы и неидентифицированные риды.

Процесс подгонка ридов возможен благодаря команде:

```
usearch -fastx_truncate <имя_файла.fastq> -trunclength <длина_рида> -fastqout  
<имя_файла_длина.fastq>
```

В зависимости от качества полученных ридов проведена их фильтрация командой [70]:

```
usearch -fastq_filter <имя_файла_длин.fastq> -fastq_maxee 1.0 -fastaout  
<имя_файла_filtered.fasta>
```

Поиск OTU (operational taxonomic unit) возможен благодаря программному обеспечению UNOISE2 [70, 71]. Принцип его работы заключен в снижении шума

в образце. Это возможно благодаря блокированию и исправлению ошибок командой:

```
usearch -unoise3 <имя_файла_uniques.fasta> -zotus <имя_файла_zotus.fasta>
```

Идентификация полученных последовательностей проводилась в базе данных SILVA 123 (<https://www.arb-silva.de/>) для бактерий и BOLD Systems для всех эукариот.

Для проведения сравнительного анализа относительной численности между группами применялся метод обобщенного линейного моделирования (GLM), в пакете DeSEQ2 R. Данный подход основан на использовании критерия Вальда с поправкой на критерий Бенджамини-Хохберга. Благодаря индексу Шеннона и теста Тьюки проводилась оценка альфа-разнообразия.

2.2.5. Секвенирование тотальной бактериальной ДНК, экстрагированной из заквасочных культур, на платформе DNBSEQ-G50

Приготовление библиотек для секвенирования на платформе DNBSEQ-G50 (MGI, Китай) проводилась согласно протоколу производителя MGIEasy Fast FS DNA Library Prep Set User Manual.

На первом этапе полученную тотальную ДНК фрагментировали с использованием набора MGIEasy Fast FS Library Prep Module (MGI, Китай) и очищали с использованием магнитных частиц En-Beads.

На следующем этапе производили лигирование адаптеров. В каждую пробирку вносили по 5 мкл UDB Adapter, 23 мкл Fast Ligation Buffer, 5 мкл Ad Ligase и 2 мкл Ligation Enhancer. После чего инкубировали пробирки в амплификаторе при 25°C 20 минут, затем при 65°C еще 20 минут. Далее проводили очистку продуктов лигирования с помощью En-Beads. Следующим шагом проводили лигирование баркодов. В каждую пробирку добавляли по 12 мкл баркода UDB Primer Adapter Kit A и B. Также добавляли по 50 мкл PCR Enzyme Mix и проводили ПЦР по следующему протоколу: 95 °C 3 минуты, 7 циклов: 98 °C 20 секунд, 60 °C 15 секунд, 72 °C 30 секунд, после чего инкубировали образцы еще 10 минут при 72 °C. Каждый ПЦР продукт после

амплификации переносили в новые пробирки 1,5 мл и проводили очистку с помощью DNA Clear Beads и 80% спирта.

Для всех образцов проводили контроль выхода ПЦР продукта с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Измеряли концентрацию с помощью флуориметра. После определения длины продукта производили расчет массы ПЦР продукта по следующей формуле:

$$2 \text{ пмоль продукта ПЦР} = (\text{размер продукта ДНК (п.н.)} \div (1000 \text{ п.н.}) \times 660 \text{ нг} \times 2$$

Затем рассчитывали количество образца, которое необходимо внести в пул по следующей формуле:

$$(\text{масса нг}) \div (\text{количество образцов в пуле})$$

В микролитрах это значение рассчитывали по формуле:

$$100 \text{ нг} \div (\text{концентрация ПЦР продукта})$$

Согласно этим расчетам, формировали несколько пулов, в каждом из которых было от 15 до 30 образцов. После этого измеряли концентрацию каждого пула с помощью флуориметра и рассчитывали количество мкл, которые необходимо внести в реакцию по формуле:

$$660 \div (\text{концентрация пула})$$

Доводили объем каждого пула до 48 мкл TE-буфером и проводили денатурацию, поместив пробирки в амплификатор на 3 минуты при 95 °С.

Дальнейшую циркуляризацию одноцепочечной ДНК проводили с использованием набора MGIEasy Dual Barcode Circularization Module (MGI, Китай) с последующей очисткой с помощью магнитных частиц.

Далее проводили контроль качества получившегося продукта путем измерения концентрации ДНК с помощью флуориметра и набора QuDye ssDNA Assay Kit (Lumiprobe, Россия). После произведения расчета количества мкл каждого пула, которое необходимо внести при создании суперпула, измеряли его концентрацию, и рассчитывали количество мкл суперпула, соответствующее 60 фмоль. Подходящие образцы использовались для создания DNB, которые загружались в картридж для последующего секвенирования.

Качество необработанных метагеномных данных оценивали с помощью FastQC. Технические последовательности и некачественные базы ($Q < 30$) были обрезаны с помощью fastp. Таксономическое профилирование образцов было выполнено с использованием Kraken2 со стандартными базами данных бактерий, вирусов и эукариот. Инструмент Pavian использовался для интерактивной визуализации результатов Kraken2. Профили генов устойчивости к антибиотикам были получены с использованием GROOT с предварительно рассчитанным индексом ARG-ANNOT.

Расчет альфа-разнообразия проводился с использованием пакета MicrobiotaProcess. Разницу в альфа-разнообразии оценивали с помощью критерия знаковых рангов Уилкоксона. Двумерная визуализация выполнялась с использованием неметрического многомерного масштабирования и метрики несходства Брея-Кертиса, реализованной в пакетах MicrobiotaProcess для GNU/R. Функция ADONIS использовалась для получения различий в таксономическом составе группы наблюдения. Анализ дифференциальной численности видов проводился с использованием пакета MetagenomeSeq. Скорректированное значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

2.2.6. Активация закваски в стерилизованном обезжиренном молоке

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 часа при температуре 37 ± 1 °C. Через 1 и 2 часа 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 часов), а также через 3, 6, 9, 12, 15 и 18 часов ферментации. Также 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.

2.2.7. Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов гена *16S rDNA* бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*

Рестрикционный анализ проводился с заранее полученными в ходе ПЦР ампликонами ДНК по нижеперечисленной методике.

В эппендорфе объемом 0,2 мл готовили реакцию смесь, состоящую из 10 мкл ампликона (ПЦР-продукта), 1,5 мкл 10X реакционного буфера, от 1 до 3 мкл рестриктазы (СибЭнзим, Россия) из расчета 10 единиц на реакцию и деионизированной воды. Общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл. Инкубация производилась в течение 1 часа при оптимальной для каждой рестриктазы температуре.

Визуализация реакции рестрикции проводилась в 2,0% агарозном геле.

2.2.8. Проведение аналитического электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле

Для приготовления геля в колбе смешивали 600 мг агарозы, 30 мл дистиллированной воды и 600 мкл 50X TAE-буфера. Нагревали полученный раствор до состояния прозрачной жидкости. Охлаждали полученную смесь до 65 °С и аккуратно вносили в жидкость 3 мкл бромида этидия (0,1% спиртовой раствор).

В собранную ванночку заливали гель и ожидали 20 минут до полного застывания. После переноса геля в камеру для электрофореза в кармашки вносили по 8 мкл образца. Визуализация результатов осуществлялась с помощью системы для гель-документирования ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

2.2.9. Исследование технологических параметров заквасок

Активность кислотообразования определяли с помощью метода кислотного титрования при культивировании бактерий в адекватной питательной среде. Лиофилизированную биомассу заквасочных культур массой 0,1 г вносили в 100 см³ стерильного восстановленного обезжиренного молока 10%.

В качестве контрольных точек использовали 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч и 120 ч с момента начала инкубации. После каждой контрольной точки инкубации культур при температуре (37±2) °С проводили определение кислотности в каждой пробе: пробу в объеме 10 см³ разводили в 10 см³ дистиллированной воды и титровали 0,1 М раствором натрия гидроксида в присутствии фенолфталеина до бледно-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд. Показатель активности кислотообразования, выражаемой в градусах Тернера (°Т), вычисляли по формуле:

$$T = A \times K \times 10,$$

где T – условная величина, определяемая количеством мл раствора натрия гидроксида, пошедшего на титрование 100 см³ исследуемой взвеси;

A – количество 0,1М раствора натрия гидроксида, пошедшего на титрование 10 см³ исследуемой взвеси, см³;

K – коэффициент поправки к титру 0,1М раствора натрия гидроксида;

10 – объем анализируемой пробы, см³.

Биохимические свойства молочнокислых заквасок изучали на основании показателей энергии кислотообразования, предельной кислотности, по качеству

сгустка, протеолитической активности бактерий и др. Активные штаммы МКБ свертывают молоко при оптимальной температуре за 5–7 ч с образованием ровного, плотного сгустка.

Качество каждой закваски оценивали по органолептическим показателям: вкусу и запаху, характеру сгустка и консистенции закваски. Закваска должна иметь ровный плотный сгусток, требуемую для данного продукта консистенцию, чистый кисломолочный вкус и выраженный аромат.

Для определения присутствия и подсчета количества молочнокислых бактерий в сквашенном молоке брали 1 см³ исходного образца и растворяли в 9 см³ стерильного физиологического раствора. Далее методом предельных разведений проводили разведение исходной суспензии до концентраций 10⁻⁹; 10⁻¹⁰; 10⁻¹¹; 10⁻¹².

Для посева в агаризованную среду отбирали разведения продукта, при посеве которых на чашках Петри вырастали от 15 до 150 колоний.

Для учета молочнокислых бактерий в ферментированных молочных продуктах, заквасках и бактериальных препаратах чашечным методом в качестве питательной среды использовали традиционную питательную среду MRS. По 1 см³ нужного разведения исходной суспензии в стерильных условиях вносили в стерильную чашку Петри и заливали растопленной и остывшей до 40 °С питательной средой MRS, тем самым совершая глубинный посев исследуемой культуры. После застывания среды чашки Петри переворачивали вверх дном и инкубировали в воздушном термостате при температуре 37 °С в течение 24–48 часов. После инкубации в чашках Петри производили подсчет выросших колоний.

2.2.10. Статистический анализ

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета программ STATISTICA 12 (StarSoft, США). Для оценки различий между конкретными группами использовали post hoc тест Тьюки.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

В данном разделе результаты исследования и их анализ опубликованы в виде следующих материалов: Оптимизация метода выделения нуклеиновых кислот из кефира с помощью сорбента на основе диоксида кремния / Е.Ю. Нестерова, М.И. Гладких, М.Ю. Сыромятников, В.Н. Попов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2022. – Т. 22, № 6. – С. 893-900.

Выделение нуклеиновых кислот является ключевым этапом прикладных молекулярно-генетических исследований. При выборе протокола экстракции учитываются скорость процедуры и качество получаемой геномной ДНК. Эти показатели обеспечиваются за счет стандартизации методик. Несмотря на появление множества модификаций, базовые элементы технологий выделения нуклеиновых кислот, такие как использование гуанидинтиоцианата и носителей на основе диоксида кремния (силики), остаются неизменными с момента их внедрения в прикладные исследования. Твердофазная экстракция опирается на способность силики селективно связывать ДНК. Это осуществляется за счёт высокой аффинности к положительно заряженным силикатным поверхностям отрицательно заряженного фосфатного остова молекулы, вследствие чего ДНК адсорбируется на неорганическом сорбенте. Далее проводят этапы отмывки для удаления примесей и завершающую элюцию, позволяющую получить очищенный продукт [11, 36, 194, 236].

Однако в настоящее время до сих пор отсутствуют оптимизированные методики выделения ДНК из пробиотических продуктов и лиофилизированных смесей для их изготовления, синтезированных на основе МКБ и характеризующихся низким значением КОЕ. Подбор оптимальной методики выделения нуклеиновых кислот сводится к преодолению специфических

трудностей процесса: сильного фонового загрязнения полисахаридами, гуминовыми и фульвокислотами, а также обеспечению достаточного выхода и высокой чистоты ДНК [49].

Для выделения ДНК применяли 99%-ную силику (Sigma-Aldrich, США). Лизирующий буфер для экстракции включал гуанидин тиоцианат, Tris-HCl, ЭДТА и детергент. В эксперименте исследовали три различные концентрации гуанидин тиоцианата: 3,5 М, 5 М и 6,5 М, а также четыре варианта детергентов: 1% Triton X-100, 1% Tween 20, 1% Tween 80 и 1% СТАВ. В результате было оценено 12 вариантов комбинаций экстракции ДНК.

На рисунках 1 и 2 отражены результаты гель-электрофореза образцов, экстракция которых осуществлялась при использовании буферов с разной концентрацией гуанидиния тиоцианата и четырёх типов детергентов. На электрофореграмме отражено, что добавление Tween 80 и Tween 20 в лизирующий раствор обеспечивает более эффективное выделение РНК по сравнению с Triton X-100 и СТАВ. Установлено, что при концентрациях гуанидиния тиоцианата 5 М и 6,5 М в присутствии Tween 80 формируются более интенсивные полосы рРНК, тогда как концентрация Tween 20 для оптимальной экстракции ДНК составляет 5 М.

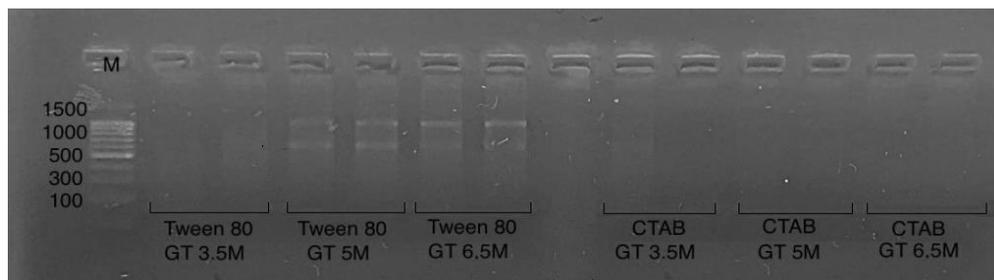


Рисунок 1 – Электрофореграмма нуклеиновых кислот, полученных в результате экстракции с использованием детергентов Tween 80 и СТАВ. М – маркер известной длины. GT – гуанидин тиоцианат

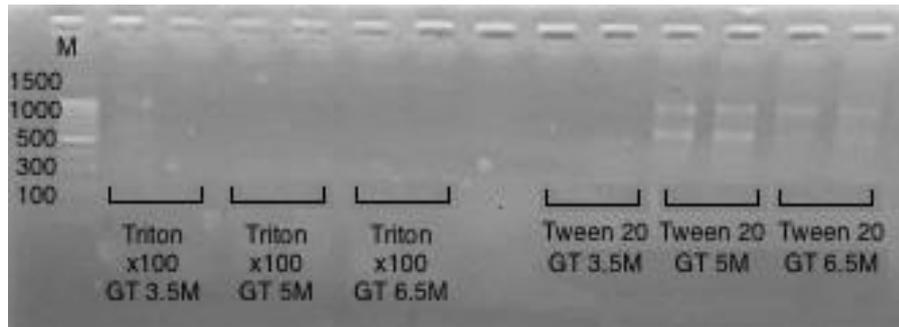


Рисунок 2 – Электрофореграмма нуклеиновых кислот, полученных в результате экстракции с использованием детергентов Triton X-100 и Tween 20. М – маркер известной длины. GT – гуанидин тиоцианат

На рисунке 3 показаны результаты выделения нуклеиновых кислот: концентрации ДНК при применении разных концентраций гуанидинтиоцианата в совокупности с детергентом Tween 80 (А), а также при использовании четырех разновидностей детергентов при идентичной концентрации гуанидинтиоцианата 5 М (Б).

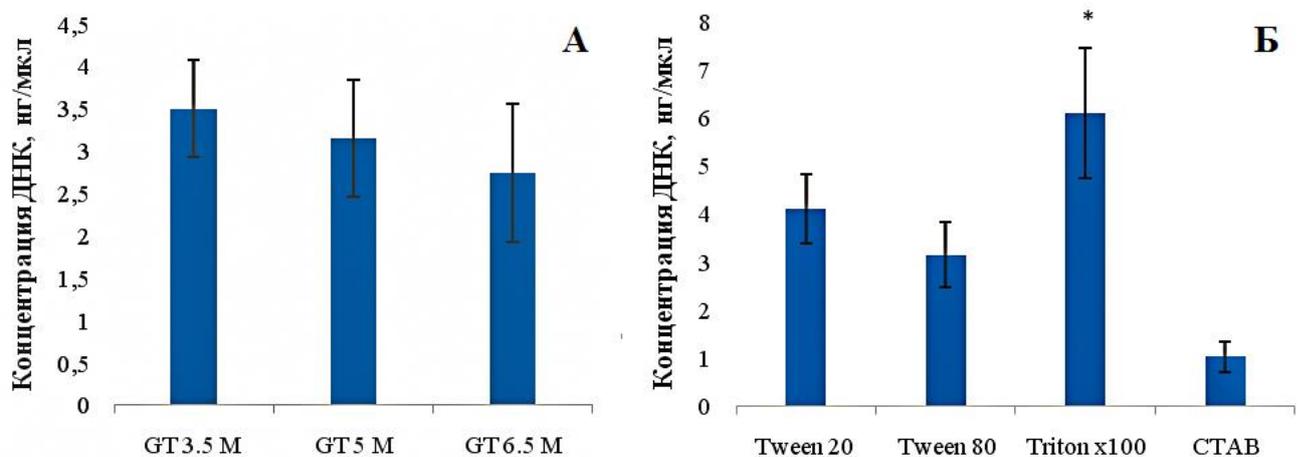


Рисунок 3 – Диаграммы зависимости концентраций экстрагированной ДНК от молярности гуанидин тиоцианата с Tween 80 (А) и детергентов при концентрации гуанидин тиоцианата 5 М (Б) (* различия с Tween 80 и СТАВ статистически достоверны, $p < 0,05$)

Показано, что изменение концентрации гуанидинтиоцианата в составе буфера не приводило к статистически значимым отличиям по показателям концентраций выделенной ДНК ($p < 0,05$). При сравнении исследуемых

детергентов минимальный выход ДНК отмечен при использовании СТАВ – 1,03 нг/мкл. Применение Triton X-100 обеспечило увеличение концентрации в 5,9 раза по сравнению с СТАВ ($p < 0,001$). Экстракция с использованием Tween 80 и Tween 20 обеспечивала получение величин, превышающих эти показатели для СТАВ в 3,1 и 3,9 раза соответственно ($p < 0,05$).

Затем осуществляли постановку ПЦР в режиме реального времени для определения порогового цикла (C_q). В таблице 3 приведены средние значения C_q для образцов ДНК, амплифицированных с помощью праймеров к бактериальной ДНК (337F/1100R) и к грибковой ДНК (ITS1/ITS4).

Таблица 3 – Средние значения C_q (\pm стандартное отклонение), полученные в результате ПЦР в реальном времени с парами праймеров 337F/1100R и ITS1/ITS4

Концентрация GT Детергент	3,5 М		5 М		6,5 М	
	337F/ 1100R	ITS1/ ITS4	337F/ 1100R	ITS1/ ITS4	337F/ 1100R	ITS1/ ITS4
Triton X100	20.70 \pm 9,4	36.27 \pm 1,2	24.40 \pm 6,4	32.72 \pm 1,0	32.60 \pm 0,5	34.10 \pm 1,2
Tween 20	19.17 \pm 8,7	35.09 \pm 0,1	26.68 \pm 8,6	35.59 \pm 0,7	18.60 \pm 10,4	34.47 \pm 0,8
Tween 80	15.36 \pm 5,1	34.19 \pm 1,9	24.16 \pm 12,4	34.18 \pm 0,8	31.06 \pm 0,9	33.27 \pm 1,0
СТАВ	28.06 \pm 5,9	36.33 \pm 2,4	25.32 \pm 11,00	37.25 \pm 0,8	17.79 \pm 8,8	35.82 \pm 2,3

При использовании праймеров ITS1 и ITS4 значения C_q для каждого из исследуемых вариантов лизирующего раствора для экстракции ДНК находились в диапазоне 32,72-37,25. Такой разброс не дает возможности объективно оценить эффективность выделения нуклеиновых кислот из грибов по данным ПЦР в реальном времени. В то же время анализ пороговых циклов с праймерами 337F и 1100R указывает, что наилучшей концентрацией гуанидинтиоцианата является 5 М – среднее значение C_q по всем примененным детергентам составило 25,0.

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

В данном разделе результаты исследования и их анализ опубликованы в виде следующих материалов: 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.

Благодаря тому, что современные платформы для секвенирования способны параллельно секвенировать фрагменты ДНК, чье количество может достигать миллиарды, при умеренной стоимости, ограничением метода чаще становится не сам процесс чтения последовательностей, а подготовка образцов [100, 112]. Качество и выход экстрагированной ДНК напрямую определяют эффективность ключевых стадий создания библиотек для секвенирования [198]. Стандартные рабочие протоколы предполагают выделение нуклеиновых кислот из исходного материала с последующей конверсией их в библиотеки, что достигается за счет лигирования синтетических адаптеров на концы молекул. Это обеспечивает возможность амплификации и запуск реакций секвенирования. На каждом из этапов пробоподготовки часть молекул теряется, что особенно критично при работе с малыми количествами исходной ДНК [195]. К тому же ДНК может находиться в таких состояниях или матрицах, затрудняющих как извлечение, так и создание библиотек. Несмотря на высокую специфичность и чувствительность ПЦР, ее разрешающей способности не всегда достаточно, чтобы получить требуемый объем материала [47, 169]. Поэтому для увеличения концентрации продукта нередко вводят дополнительный промежуточный шаг.

Твердофазное экстракция ДНК лежит в основе большинства коммерческих наборов для выделения и очистки нуклеиновых кислот. Эти же методики подходят и для концентрирования образца [125]. Их общий принцип основан на

способности силикасодержащих носителей избирательно адсорбировать ДНК. Отрицательно заряженный фосфатный остов молекулы демонстрирует высокую аффинность к положительно заряженным силикатным поверхностям, благодаря чему ДНК фиксируется на неорганическом сорбенте. Далее выполняются стадии промывки для удаления примесей и элюирования, в результате которых получают очищенную нуклеиновую кислоту [11, 36, 194].

Метод магнитной сепарации основан на том, что ДНК обратимо адсорбируется на поверхность магнитных микрочастиц, которые можно быстро выделить из суспензии при помощи магнитного штатива [30]. Такой подход исключает необходимость пропускать ДНК через сорбент в центрифуге, уменьшая риск ее дополнительной фрагментации. Вне магнитного поля частицы остаются дисперсными и не агрегируют, а при поднесении к магниту фиксируются на стенках пробирок, что позволяет оперативно заменять промывочный их раствор после ресуспендирования.

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) согласно приложенной инструкции (<https://evrogen.ru/kit-user-manuals/BC022.pdf>).

2. Концентрирование ампликонов с использованием магнитных частиц проводили с помощью суспензии магнитных частиц для очистки ДНК из реакционных смесей CleanMag DNA (Евроген, Россия) согласно приложенной инструкции (https://evrogen.ru/kit-user-manuals/BC35_CleanMagDNA.pdf).

3. Концентрирование ампликонов с использованием частиц силики (диоксида кремния) (Sigma-Aldrich, США) проводили с помощью набора Проба-ГС (ДНК-технология, Россия) согласно приложенной инструкции (https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/180-4_proba-gs_ivd_k_2019-06-25_1.pdf), с модификацией, которая обусловлена тем, что на первом этапе вместо образца биологического материала добавляли 125 мкл реакционной смеси после проведения ПЦР.

Чистота используемого диоксида кремния составляла 99,0%, не менее 97-100% частиц имели размер менее 8 мкм.

Для разработки подхода к концентрированию ДНК ампликонов сначала моделировали ситуацию с низким выходом продукта. Это достигали путем пятикратного разбавления ПЦР-продукта деионизированной водой сразу после реакции. В результате были получены следующие концентрации ПЦР-продуктов: для бактериальных матриц – 11,6 нг/мкл, для грибных – 8,17 нг/мкл. Затем 125 мкл полученной (в 5 раз разбавленной) реакционной смеси направляли на концентрирование тремя различными методами. Показано, что при работе с ампликоном бактериальной ДНК его концентрация увеличивалась в 3,14 раза при использовании набора с колонкой и силикой и в 2,74 раза при применении магнитных частиц (рисунок 4).

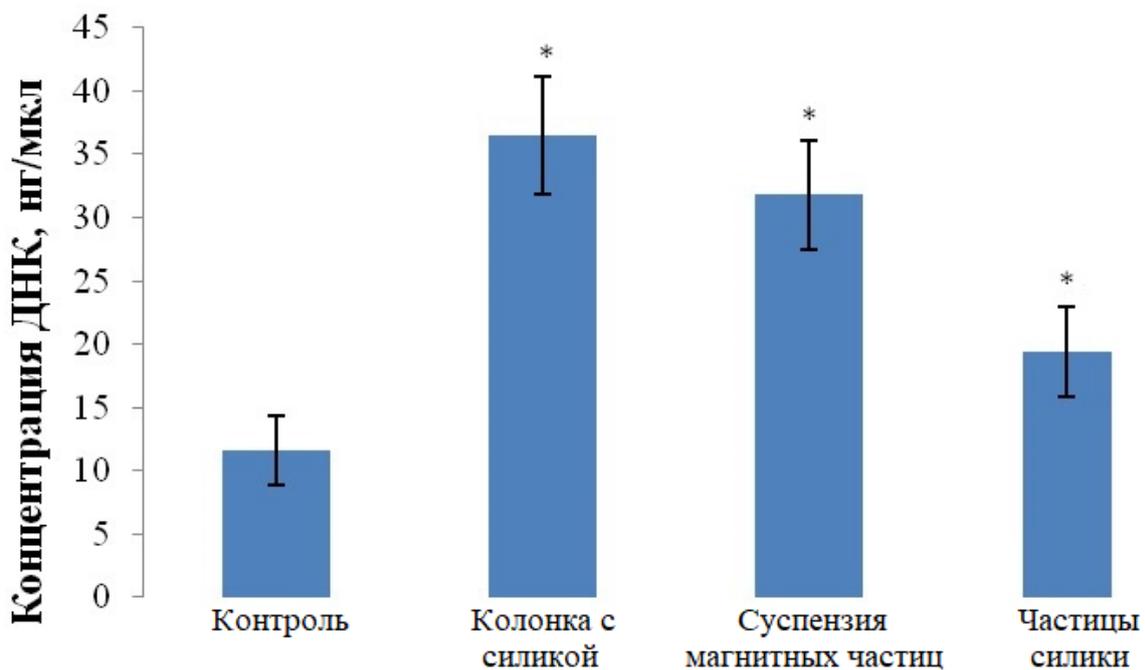


Рисунок 4 – Средний показатель концентраций ДНК после амплификации ДНК с праймерами 337F/ 1100R в зависимости от способа концентрирования ампликона (* различия с контролем статистически достоверное, $p < 0,05$)

Анализ электрофореграммы позволил выяснить, что ампликон, выделенный с использованием суспензии магнитных частиц, демонстрировал более высокую

однородность по сравнению с ампликоном, полученным набором с использованием колонки с силикой (рисунок 5).

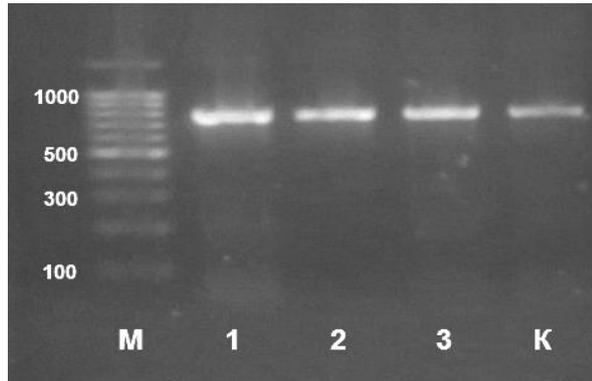


Рисунок 5 – Электрофореграмма фрагментов нуклеиновых кислот после проведения концентрирования ампликона, полученного в ходе амплификации ДНК с праймерами 337F/ 1100R. М – маркеры известной длины; 1 – набор на основе колонки с силикой; 2 – набор на основе суспензии магнитные частицы; 3 – набор на основе частиц силики; К – контроль

При сравнении подходов к концентрированию ампликонов, полученных при ПЦР с праймерами ITS1/ITS4, выяснилось, эффективность концентрирования ампликонов была более высокой, чем при обработке ампликона, полученного из бактериальной ДНК. Для фрагментов амплифицированных с праймерами ITS1/ITS4, прирост концентрации составил 4,72 раза при использовании набора на основе колонки с силикой и 3,70 раза при применении суспензии магнитных частиц (рисунок б).

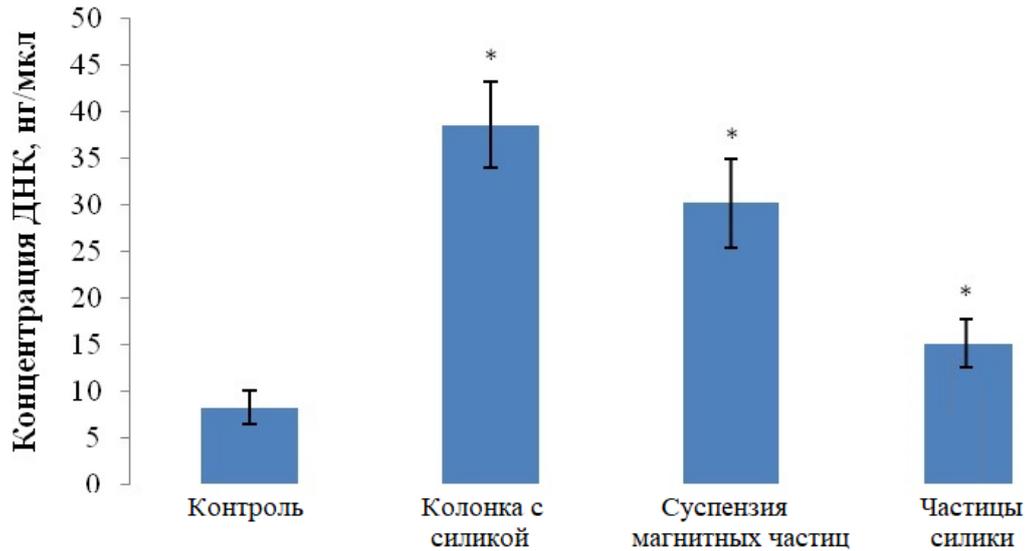


Рисунок 6 – Средний показатель концентраций ДНК после амплификации ДНК с праймерами ITS1/ITS4 в зависимости от способа концентрирования ампликона (* различия с контролем статистически достоверное, $p < 0,05$)

В ходе электрофореза на агарозном было показано, что ампликон, концентрирование которого осуществлялось с использованием суспензии магнитных частиц, оказался более однородным, чем ампликон, полученный при экстракции с применением колонки с силикой (рисунок 7).

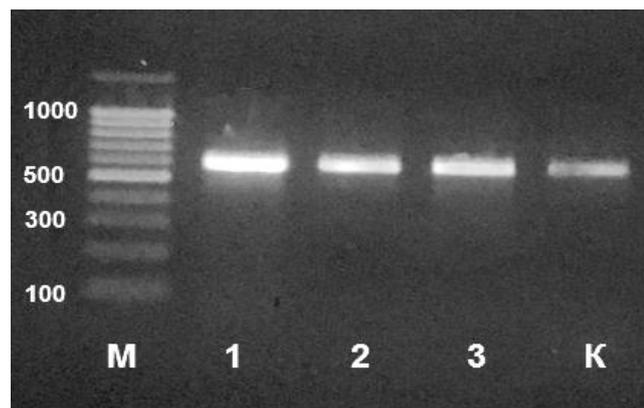


Рисунок 7 – Электрофореграмма фрагментов нуклеиновых кислот после проведения концентрирования ампликона, полученного в ходе амплификации ДНК с праймерами ITS1/ITS4. М – маркеры известной длины; 1 – набор на основе колонки с силикой; 2 – набор на основе суспензии магнитные частицы; 3 – набор на основе силики; К – контроль

Различия в эффективности используемых методов концентрирования для ПЦР-продуктов, полученных с бактериальными и грибными праймерами, вероятно могут быть связаны с длиной амплифицируемых фрагментов. Так, например, при использовании праймеров 337F/1100R формируются более длинные ампликоны, чем при амплификации с ITS1/ITS4. Вероятно, по мере уменьшения размера ПЦР-продукта эффективность концентрирования возрастает, однако это предположение требует дополнительных исследований.

Предложенные подходы к концентрированию ампликонов как дополнительного этапа перед секвенированием способны повысить чувствительность методов анализа пробиотических культур, и включающих их пробиотиков, производственных заквасок и продуктов ферментации.

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

Пробиотик – совокупность безопасных для здоровья человека микроорганизмов, среди которых дрожжи, лактобактерии и бифидобактерии, направленных на поддержание нормальной микрофлоры кишечника человека. Пробиотические бактерии способствуют снижению рН кишечника, тем самым оказывая благоприятное воздействие на ЖКТ. Патогенные бактерии, попадая в ЖКТ человека, сталкиваются с конкуренцией с полезными микроорганизмами, блокирующими их рост и инфильтрацию [188]. Применение пробиотиков в терапии и профилактике острой диареи, опосредованной ротавирусной инфекцией или длительным применением антибиотиков, ранее показало положительные эффекты [230].

Количественная оценка бактериального состава пробиотических культур затруднительна при использовании классических микробиологических подходов, поскольку они не позволяют идентифицировать нецелевые микроорганизмы, а также проводить видовую идентификацию. Анализируя состав пробиотиков методами высокопроизводительного секвенирования, появляется возможность

осуществлять идентификацию нецелевых бактерий. Анализ таксономического состава 18 пробиотиков, коммерчески доступных на территории РФ, осуществлялся на основе секвенирования участка гена *16S рНК* на платформе MiSeq Illumina. На первом этапе была проведена оценка специфичности праймеров (рисунки 8 и 9).

Species	***	****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
1. Forward primer	GTGBCAGCMG	CCGCGG	TAA					
2. Bifidobacterium animalis (MT613598.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
3. Bifidobacterium adolescentis (MT604885.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
4. Bifidobacterium bifidum (MT613516.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
5. Bifidobacterium longum (MT641219.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
6. Bifidobacterium breve (MT613436.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
7. Lactiplantibacillus plantarum (OK667804.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
8. Lacticaseibacillus casei (MZ468597.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
9. Lacticaseibacillus rhamnosus (OK272255.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
10. Lactobacillus helveticus (OL589269.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
11. Lactococcus lactis (OL589266.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
12. Streptococcus thermophiles (OL375216.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					
13. Enterococcus faecium (OK614014.1)	GTGCCAGCAG	CCGCGG	TAA					

M = A / C
B = C / G / T

Рисунок 8 – Специфичность прямого праймера к целевым бактериям

Species	*****	*****	*****	*****
1. Reverse primer	GGATTAGAKACCC	BNGTAGTC		
2. Bifidobacterium animalis (MT613598.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
3. Bifidobacterium adolescentis (MT604885.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
4. Bifidobacterium bifidum (MT613516.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
5. Bifidobacterium longum (MT641219.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
6. Bifidobacterium breve (MT613436.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
7. Lactiplantibacillus plantarum (OK667804.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
8. Lacticaseibacillus casei (MZ468597.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
9. Lacticaseibacillus rhamnosus (OK272255.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
10. Lactobacillus helveticus (OL589269.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
11. Lactococcus lactis (OL589266.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
12. Streptococcus thermophiles (OL375216.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		
13. Enterococcus faecium (OK614014.1)	GGATTAGATACCC	TGGTAGTC		

K = G / T
B = C / G / T
N = C / G / T / A

Рисунок 9 – Специфичность обратного праймера к целевым бактериям

В целом в основной состав (>99% всех родов бактерий) пробиотиков входили бифидобактерии и молочнокислые бактерии, среди которых

представители семейства Lactobacillaceae – *Lactobacillus* и *Lacticaseibacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Bacillus* (рисунок 10).



Рисунок 10 – Количественные соотношения бактерий в пробиотиках

Биоинформатический анализ результатов секвенирования коммерческих пробиотиков показал различное соотношение бактерий в составе каждого из образцов. Наиболее распространенными микроорганизмами в составе исследованных пробиотиков оказались представители рода *Lactobacillus*. Они были обнаружены в 77% образцов. Их процентное соотношение варьировало в широком диапазоне от 2 до 99,5% (последнее значение актуально для моноштаммовых пробиотиков). Так, например, в образцах 2 и 5 их количество составляло 2% от общего числа бактерий. 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, при этом, например, содержание *Streptococcus* в пробиотике под номером 11 превышало 80%. Зарегистрированное присутствие *Streptococcus* во множестве проанализированных образцов может свидетельствовать о том, что данные пробиотики были изготовлены с помощью заквасок. Пробиотические эффекты, оказываемые на человека штаммами *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, обеспечивают лечение и профилактику различных заболеваний. В свою очередь единственное установленное пробиотическое действие *S. thermophilus* на организм человека заключается в том, что бактерии принимают участие в образовании фермента лактазы, обеспечивающей расщепление лактозы в организме больных, страдающих ее непереносимостью [205]. *S. thermophilus* относят к транзиторным бактериям, чья адгезивность к клеткам кишечника человека значительно уступает основным пробиотическим штаммам лакто- и бифидобактерий. По причине низкой устойчивости к кислотам, образующимся в желудке, большинство штаммов *Streptococcus* не выживает в организме в течение длительного времени [110].

Методом высокопроизводительного секвенирования было установлено, что пробиотики 8, 9, 10, 16 и 18 являются монокультурными. Так, в пробиотиках 8, 9, 10 выявлены роды *Lacticaseibacillus*, *Bacillus* и *Bifidobacterium* соответственно. Процентное соотношение данных родов составило более 81%. Образец под номером 18 был представлен уникальной бактерией *Akkermansia muciniphila*, рассматриваемой в настоящее время в качестве перспективного пробиотика нового поколения. В качестве субстрата для роста *A. muciniphila* использует муцин, содержащийся в слизистой оболочке эпителия. В ходе каскада реакций разложения муцина образуются такие побочные продукты метаболизма, как пропионат и ацетат, которые, в свою очередь, являются субстратом для роста других бактерий кишечника человека [66]. Таким образом, *A. muciniphila*

способна регулировать жизнедеятельность кишечной бактериальной микрофлоры.

3.4. Скрининг бактериального состава заквасочных культур с помощью высокопроизводительного секвенирования

В настоящее время закваски для производства пробиотических кисломолочных продуктов широко доступны в свободной продаже. Оценить количество молочнокислых бактерий в заквасках возможно с помощью посева на питательные среды. Однако данный способ не позволяет определить количественное соотношение бактериальных штаммов в образце. Потенциальным инструментом оценки качества заквасок является высокопроизводительное секвенирование. Преимущество высокопроизводительного секвенирования при анализе заквасок заключается в способности метода идентифицировать не только целевые бактерии, которые могут содержаться в заквасках, но и устанавливать их относительное содержание, что необходимо учитывать при производстве пробиотических продуктов.

Оценивался состав 22 коммерчески доступных в РФ заквасок на основе секвенирования участка гена *16S rRNA* 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 результате проведенного высокопроизводительного секвенирования идентифицированы роды бактерий, которые содержались в анализируемых образцах кисломолочных заквасок. В целом в основной состав всех заквасок входили молочнокислые и бифидобактерии. Бактерии рода *Streptococcus* существенно преобладали над другими родами бактерий в исследуемых заквасках, а *Bifidobacterium*, в свою очередь, регистрировались в меньших количествах относительно других таксонов (рисунок 11).



Рисунок 11 – Количественные соотношения бактерий в заквасках

Представители родов *Leuconostoc* и *Bifidobacterium* встречались реже других (14 и 23% соответственно). Их процентное соотношение в образцах 4, 6, 18 для *Leuconostoc* и 1, 13, 17, 19 и 22 для *Bifidobacterium* не превышало 20%. Необходимо отметить, что в результате биоинформатического анализа данных секвенирования заквасок наличие бифидобактерий в образцах могло быть не детектировано по причине их низкого относительного содержания, т.е. их концентрация в заквасках была более чем в 1000 раз меньше относительно содержания других идентифицированных бактерий.

Было показано, несмотря на то, что в коммерчески доступных стартовых культурах бактерий может быть указано более 3 родов, их количественные соотношения могут чрезвычайно различаться.

Процентное содержание представителей родов *Lactobacillus* в исследованных образцах заквасок варьировало в широком диапазоне – от 1 до 99,5%. При этом из 16 заквасок в 10 содержание *Lactobacillus* не превышало 20%, а в 4 – не превышало 70%.

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).

Streptococcus оказался наиболее часто встречающейся в проанализированных образцах бактерией. В 40% заквасок содержание *Streptococcus* превышало 70% от общего относительного количества бактерий в составе. Подобно *Lactococcus* штаммы *S. thermophilus* устойчивы к стрессовым факторам, связанным с высушиванием или заморозкой. Помимо этого, бактерии активно включаются в процесс сквашивания, образуют необходимые для функционирования пробиотических лактобактерий вещества, тем самым являются важными участниками ферментации пробиотических продуктов наряду с *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [115].

Известно, что соотношение микроорганизмов в заквасках является важным фактором при приготовлении кисломолочных продуктов. Необходимо учитывать возможные взаимодействия между штаммами, выбранными для производства молочного продукта, чтобы выбрать лучшие комбинации и оптимизировать их технологические характеристики в процессе производства и их жизнеспособность в процессе хранения [90, 214, 225]. Комплексное использование *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* и *S. thermophilus* в качестве закваски способствует сокращению времени ферментации [181]. Однако необходимо учитывать факт несовместимости отдельных штаммов друг с другом. Использование таких комбинаций может провоцировать развитие дисбаланса в бактериальном росте в процессе ферментации. Например, было показано, что *L. acidophilus* подавлялся

бактериями *L. casei* и представителями *Bifidobacterium* sp. в процессе совместной ферментации [102]. Отрицательные и положительные взаимодействия, влияющие на метаболизм и рост молочнокислых бактерий или дрожжей, могут влиять на формирование аромата изделия и/или время созревания.

Рост в молочной продукции *Bifidobacterium* spp. и *Lb. plantarum*, являющихся классическими компонентами пробиотиков, затрудняется при условии недостаточной протеолитической активности [117] и практический подход заключается в культивировании этих видов вместе с *S. thermophilus*. В результате в процессе ферментации сокращается время и увеличивается жизнеспособность пробиотических бактерий [118, 170].

3.5. Динамика бактериального состава молочной основы в процессе ферментации

В данном разделе результаты исследования и их анализ опубликованы в виде следующих материалов: Динамика изменения бактериального состава молочной основы в процессе ферментации / М.В. Грязнова, И.Ю. Буракова, Ю.Д. Смирнова, Е.Ю. Нестерова, Н.С. Родионова, Е.С. Попов, М.Ю. Сыромятников, В.Н. Попов // Техника и технология пищевых производств. – 2023. – Т. 53, №3. – С. 554-564.

Существенные различия в составах заквасок и пробиотиков, а также наличие посторонних микроорганизмов, либо отсутствие заявленных бактерий, может быть связано с технологическими проблемами получения заквасок и пробиотиков. Соотношение *Lactobaccillus* и *Bifidobacterium* в исходной закваске напрямую влияет на формирование конечного продукта, а именно его органолептические и функциональные свойства. В связи с этим важным аспектом является оценка влияния изначального соотношения лактобактерий и бифидобактерий в закваске на динамику её изменения 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*, *L. plantarum* и *S. thermophilus*, необходимый для подкисления среды и запуска процесса ферментации. Были исследованы 5 вариантов смеси бактерий с различной концентрацией *Lactobaccillus* и *Bifidobacterium* в каждой из них. Рассматривались варианты равного содержания *B. bifidum* и *L. plantarum* (смесь 1), а также различия между относительным содержанием штаммов в 10 (смеси 2 и 4) и 100 раз (смеси 3 и 5). Содержание *S. thermophilus* для каждого исследуемого варианта смеси оставалось неизменным – 10^7 КОЕ/см³ (таблица 4).

Таблица 4 – Содержание бактериальных штаммов в заквасочной смеси для изготовления кисломолочного пробиотического продукта, КОЕ/см³

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

В качестве объекта сквашивания выступало сухое обезжиренное молоко.

По результатам биоинформатического анализа данных, полученных в результате секвенирования, был построен график, отражающий изменения в процессе ферментации молочной основы соотношения бактериальных штаммов в каждом варианте смеси в зависимости от первоначальных соотношений бактерий в трехкомпонентной закваске (рисунок 12).

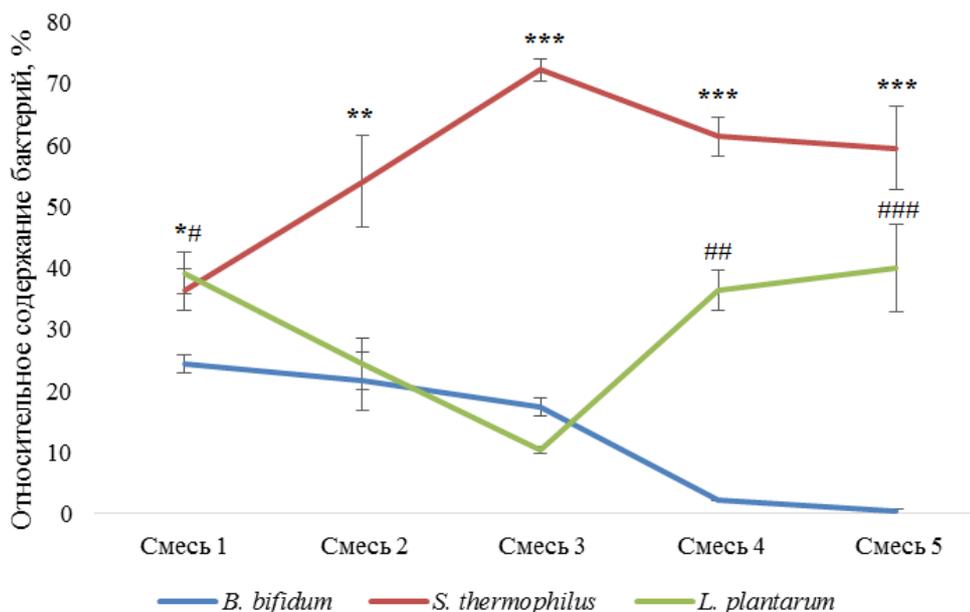


Рисунок 12 – Относительное содержание *B. bifidum*, *L. plantarum* и *S. thermophilus* в молочной основе после 18 часов ферментации (# различие между группой «*B. bifidum*» и «*L. plantarum*» статистически достоверное, $p < 0,05$; ## различие между группой «*B. bifidum*» и «*L. plantarum*» статистически достоверное, $p < 0,01$; ### различие между группой «*B. bifidum*» и «*L. plantarum*» различие 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, $p < 0,001$)

Наибольшее содержание *S. thermophilus* было зарегистрировано в смеси 3, где соотношение относительного содержания *L. plantarum*/*B. bifidum* соответствовало $10^6/10^8$ КОЕ/ см³. Вероятно, сниженное содержание *L. plantarum* обеспечивало активный рост и размножение *S. thermophilus* по причине отсутствия жесткой конкуренции за субстрат. Это подтверждалось снижением его численности при высоких начальных концентрациях *L. plantarum* (10^8 КОЕ/ см³).

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.

Баланс штаммов способствует формированию подходящих условий для процесса сквашивания и дальнейшего хранения готового продукта. Нарушение соотношения бактерий может привести к потере пробиотических эффектов, а также нарушению вкуса, аромата и безопасности продукции. Таким образом, для приготовления кисломолочных пробиотических продуктов для профилактики и установления правильного микробного равновесия в кишечнике наиболее оптимальным вариантом закваски, состоящей из *L. plantarum* и *B. bifidum*, является использование смеси под номерами 1 и 2, где относительное содержание бактерий равнозначно или численность *B. bifidum* превышает *L. plantarum* в 10 раз. При этом для получения пробиотического продукта, предназначенного для коррекции терапии уже развившихся дисбактериозов, предпочтительно использовать закваски с повышенными начальными концентрациями *Lactobacillus*.

Дальнейшей задачей явилась использование высокопроизводительного секвенирования для оценки динамики соотношения бактерий в составе сложнокомпонентной закваски для получения пробиотического кисломолочного продукта.

Были проанализированы изменения бактериального состава в процессе ферментации и получены данные о бактериальном составе исходной бактериальной закваски, стерилизованного молока и их смеси до начала брожения (точка 0 часов) и в процессе брожения (3, 6, 9, 12, 15 и 18 часов).

Обилие филумов *Patescibacteria*, *Campilobacterota*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteriota* и *Vdellovibrionota* составляло менее 1% для каждого субстрата и точки времени ферментации, поэтому их сгруппировали в «Другие» (рисунок 13).

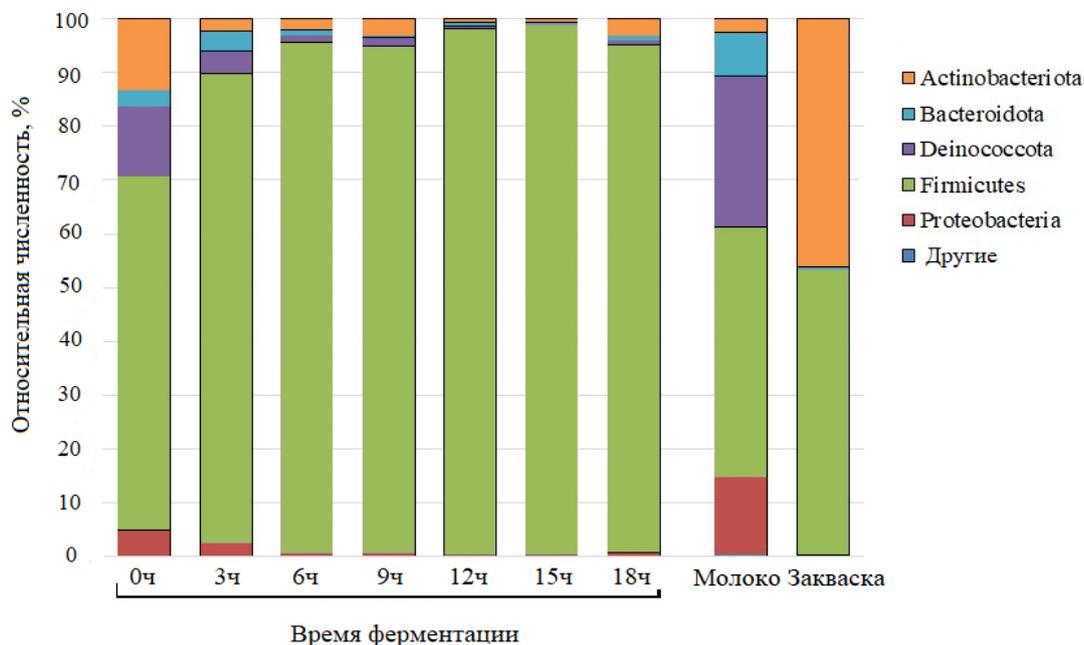


Рисунок 13 – Изменение соотношения бактериальных филумов в исследуемых субстратах в процессе ферментации молочной основы

Филум *Firmicutes* оказался самым многочисленным среди всех выборок. Для молока его концентрация составила 46%, для закваски – 53%, для временных интервалов ферментации смеси – до 90%. В закваске вторым по численности филумом был *Actinobacteriota* – 46%, численность остальных филумов составляла менее 1%.

На рисунке 14 изображены статистически значимые различия между изучаемыми субстратами на уровне филума.

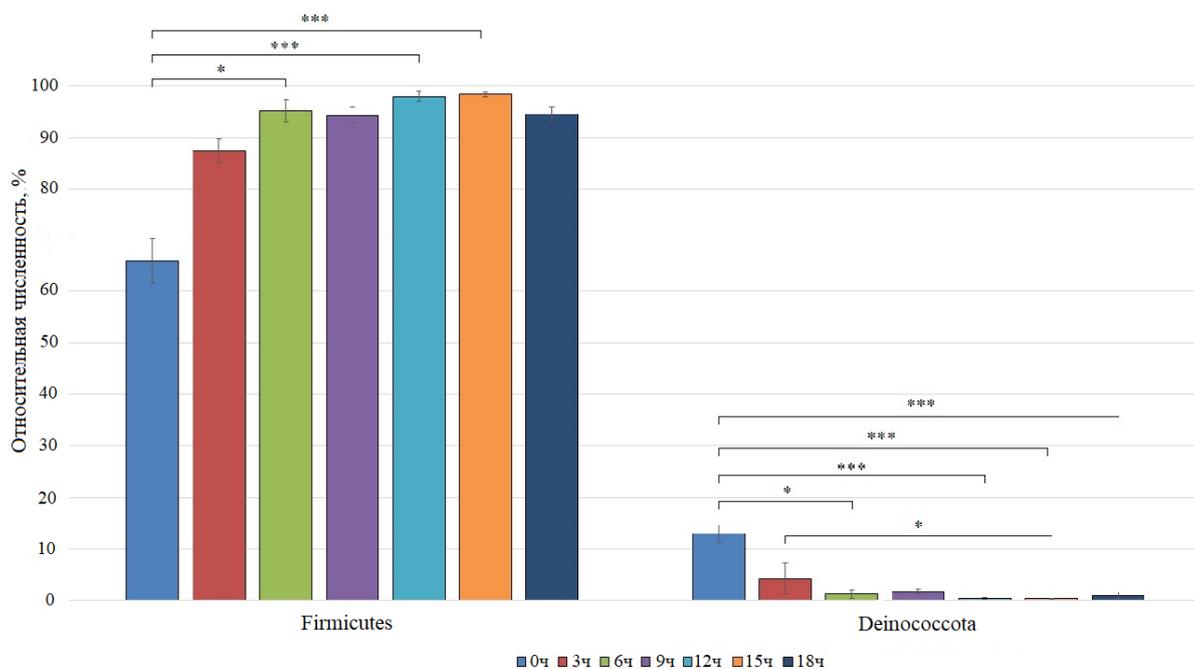


Рисунок 14 – Динамика численности таксонов в различные часы ферментации молочной основы. Обозначения: * – различия достоверны ($p < 0,05$); ** – различия достоверны ($p < 0,01$); *** – различия достоверны ($p < 0,001$)

Согласно анализу, статистически значимые различия наблюдались между часами и 0 часами ферментации для филумов *Deinococcota* – 1,97 ($p=0,0129$) и *Firmicutes* – 2,11 ($p=0,0129$). На 12-часовой стадии ферментации по сравнению с 0-часовой разница составила – 3,16 ($p=0,0001$) для филума *Firmicutes* и 2,62 для *Deinococcota* ($p=0,0001$). На 15-часовой стадии ферментации по сравнению с 0-часовой разница составила 3,11 ($p=0,0001$) для филума *Firmicutes* и – 2,94 для *Deinococcota* ($p=0,0001$). На стадии 18-часовой ферментации по сравнению с 0-часовой разница составила – 2,66 для *Deinococcota* ($p=0,0002$). На 15-часовой стадии ферментации по сравнению с 3-часовой разница составила – 2,14 и для *Deinococcota* ($p=0,0414$).

Все роды бактерий, численность которых в каждой группе была менее 1%, были объединены в «Другие». Таким образом, были выделены 14 родов бактерий, формирующих ядро микробиома исследуемых субстратов (рисунок 15).

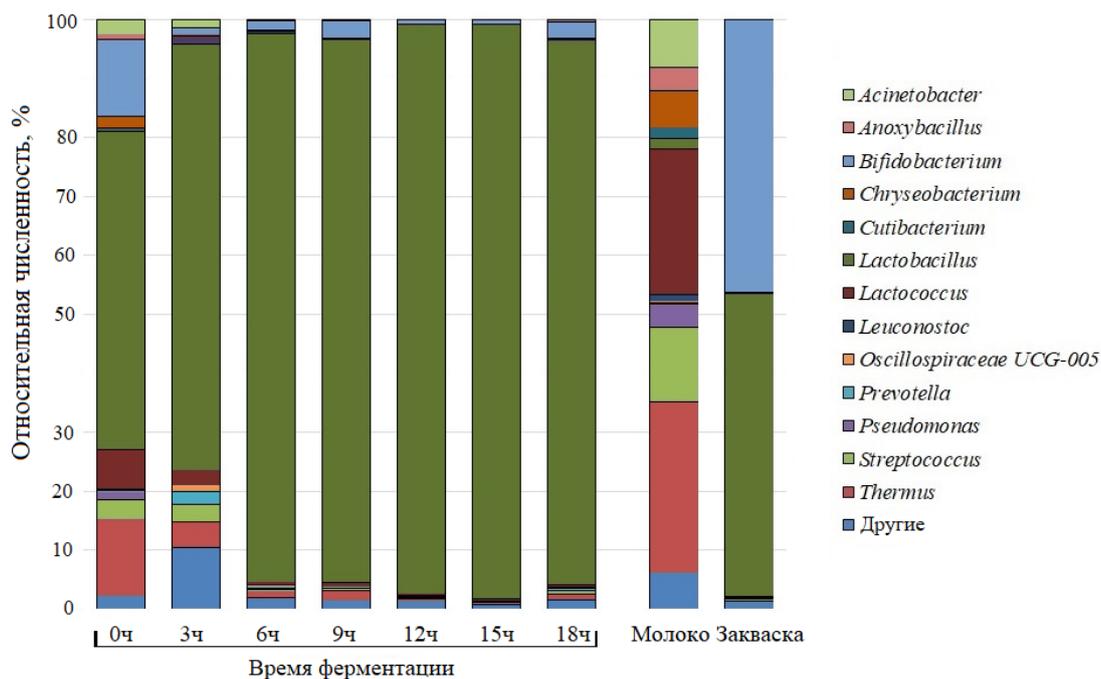


Рисунок 15 – Динамика изменения бактериального состава в молочной основе в процессе ферментации

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 (51%), и для каждой временной точки процесса ферментации. Среднее значение составляло 85%. Помимо *Lactobacillus* в закваске был обнаружен *Bifidobacterium* – 46%. Эти два рода были доминирующими в закваске, численность остальных родов составляла менее 1%.

В стерилизованном молоке преобладал род *Thermus* – 28%, следующим по численности были роды *Lactococcus* – 24%, *Streptococcus* – 12%, *Acinetobacter* – 8%, *Chryseobacterium* – 6%, *Pseudomonas* – 3%, *Anoxybacillus* – 3%, *Cutibacterium* – 1%, *Lactobacillus* – 1%, *Leuconostoc* – 1%, численность остальных идентифицированных родов была менее 1%.

На рисунке 16 представлены статистические различия в альфа-разнообразии между субстратами.

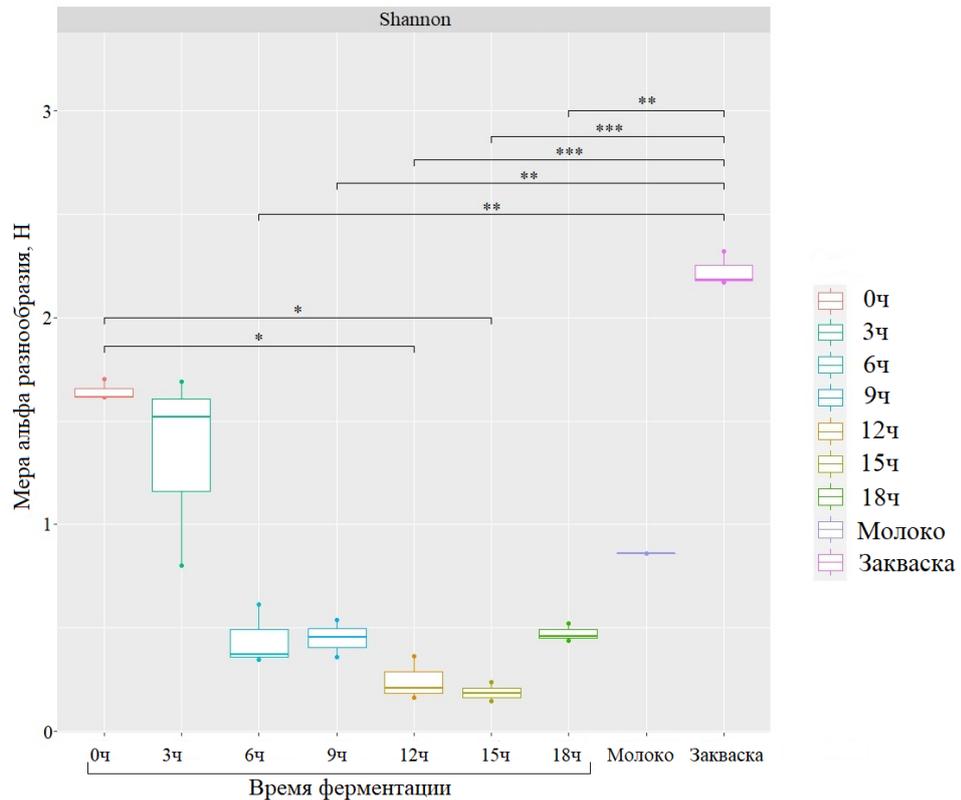


Рисунок 16 – Альфа-разнообразие на уровне рода в исследуемых субстратах. Обозначения: * – различия достоверны ($p < 0,05$); ** – различия достоверны ($p < 0,01$); *** – различия достоверны ($p < 0,001$)

Проведенный анализ показал наличие различий в бактериальном разнообразии между несколькими субстратами. Так, индекс Шеннона для стерилизованного молока составил 2,22, что значительно превышало индекс альфа-разнообразия в продукте ферментации через 6 часов ($H=0,43$, $p=0,0022$), 9 часов ($H=0,44$, $p=0,0023$), 12 часов ($H=0,24$, $p=0,0005$), 15 часов ($H=0,18$, $p=0,0003$) и 18 часов ($H=0,47$, $p=0,0027$). Кроме того, альфа-разнообразие смеси стерилизованного молока и закваски до начала ферментации (0 часов) составляло 1,64 и превышало этот показатель через 12 часов ($H=0,24$, $p=0,0320$) и 15 часов ($H=0,18$, $p=0,0221$) ферментации смеси.

На рисунке 17 отражены различия между составом в зависимости от времени ферментации смеси.

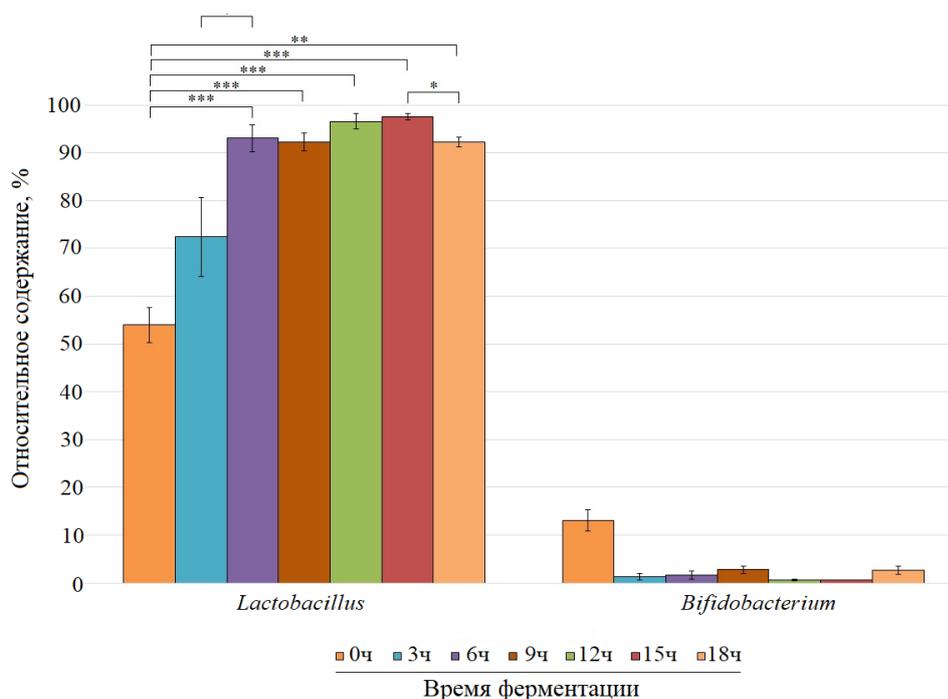


Рисунок 17 – Динамика численности *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* при ферментации бактериальными заквасками молочной основы. Обозначения: * – различия достоверны ($p < 0,05$); ** – различия достоверны ($p < 0,01$); *** – различия достоверны ($p < 0,001$)

Несмотря на существенные изменения бактериального состава субстрата при ферментации, для рода *Lactobacillus* выявлены статистически значимые изменения. Было обнаружено существенное увеличение этого рода во время ферментации, которое было статистически значимое от 6 часов ферментации до 0 часов. Увеличение после 6 часов ферментации считается значительным. Однако через 15 часов брожения количество *Lactobacillus* уменьшается, что также является значимым. Кроме того, хотя отсутствовали различия между количеством *Bifidobacterium* в начале ферментации, регистрировалось общее снижение их численности в процессе брожения и, по-видимому, замещение представителями рода *Lactobacillus*.

Изменение состава микробиоты в процессе ферментации пробиотика является естественным процессом. Изменяющиеся физико-химические свойства способствуют формированию стрессовых условий, изменяющих микробное разнообразие. Активные качественные и количественные изменения микробиоты

в конечном итоге приводят к появлению в готовой продукции отдельных доминирующих таксонов [148, 200]. 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 [27]. 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 регистрировалось их значительное уменьшение. Такие результаты связывают с низким значением pH, поскольку культуры, используемые в ферментации продуктов, активно функционируют в кислой среде [116]. В данном исследовании были изучены изменения состава микробиома ферментированного пробиотического кисломолочного продукта на основе молочной сыворотки на разных стадиях ферментации (от 0 до 18 часов с шагом 3 часа). Исследован также 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. Но так как молоко пастеризованное, вероятно, это ДНК мертвых бактерий. Так что на процесс брожения они не повлияли.

Известно, что некоторые штаммы *Thermus* и *Lactococcus* широко используются при приготовлении заквасок [92, 121]. Однако этого нельзя сказать о бактериях рода *Prevotella*. При анализе литературы не удалось найти данных о том, что эти бактерии могут использоваться в производстве заквасок. Однако известно, что *P. copri* является потенциальным кандидатом в пробиотические

бактерии [954, 81]. Что касается *Oscillospiraceae* UCG-005, то обнаружение этой бактерии в закваске было неожиданным, этот вид бактерий и его влияние на здоровье человека очень плохо изучены. *Thermus* и *Lactococcus* были доминирующими родами, обнаруженными в молоке. Известно, что они являются членами нормофлоры молочных продуктах.

Несмотря на то, что относительное содержание *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в сухой закваске соответствовало около 50% для каждого, в процессе ферментации относительное содержание *Bifidobacterium* снизилось до предельно низких значений. Это может быть объяснено сложнокомпозитным составом закваски, содержащей более активные штаммы *Lactobacillus* – *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*.

На протяжении всех стадий ферментации молочной основы наблюдалось постепенное вытеснение представителями рода *Lactobacillus* всех остальных родов бактерий, включая род *Streptococcus*. 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 pH составлял 4,2-4,4. Известно, что для роста бактерий рода *Bifidobacterium* оптимальный pH находится в диапазоне 6,0-7,0 [192], тогда как лактобациллы не так чувствительны к низким значениям pH [228].

Также по результатам 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 [75]. Эти результаты можно объяснить тем, что бактерии этого рода очень чувствительны к условиям культивирования, и для их роста в определенной среде необходимы углеводы, аминокислоты, витамины, нуклеотиды и минеральные вещества [146].

3.6. Анализ технологических свойств пробиотических заквасок

Поскольку функциональность готового пробиотического продукта определяется не только наличием определённых бактерий в составе закваски, но и их соотношением, было проанализировано влияние бактериальных заквасок для йогуртов на сквашивание стерильного восстановленного обезжиренного 10% молока.

В качестве основных критериев исследовались активность, химические, микробиологические и органолептические показатели.

Для экспериментальной работы использовалось 3 вида заквасок, характеризовавшихся изначально одинаковым бактериальным составом (*S. thermophilus* и *L. delbrueskii spp. bulgaricus*). В таблице 5 указана информация об идентифицированных с помощью высокопроизводительного секвенирования бактериальных видах.

Таблица 5 – 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>

Высокопроизводительное секвенирование, основанное на фрагментации ДНК, позволяет идентифицировать бактерии до вида, что невозможно сделать с помощью высокопроизводительного секвенирования,

основанного на амплификации гена *16S рРНК*. Таким образом, данный подход позволяет в полной мере оценить фактический состав закваски.

Образцы молока ферментировались при 37 °С в термостате в течение 24 часов. Оценка их органолептических свойств проводилась согласно ГОСТ 34372-2017 «Закваски бактериальные для производства молочной продукции. Общие технические условия».

По прошествии 24 часов ферментации заквасками все образцы характеризовались полным сквашиванием. Каждый из трёх образцов обладал сходными органолептическими характеристиками, различий не было зафиксировано. По прошествии 64 часов ферментации молока были получены новые данные об органолептических характеристиках сгустков, отраженные в таблице 6.

Таблица 6 – Оценка органолептических показателей продукта после 24 и 64 часов сквашивания

Характеристика		Закваска 1	Закваска 2	Закваска 3
24 часа	Аромат	Чистый кисломолочный	Чистый кисломолочный	Чистый кисломолочный
	Консистенция	Стабильный сгусток	Стабильный сгусток	Стабильный сгусток
64 часа	Аромат	Чистый кисломолочный	Кислый	Кисломолочный, присутствует посторонний запах
	Консистенция	Стабильный сгусток, начинается процесс расслаивания	Стабильный сгусток, начинается процесс расслаивания	Стабильный сгусток, начинается процесс расслаивания

Активные штаммы МКБ свертывают молоко при оптимальной температуре за 5-7 ч с образованием ровного, плотного сгустка. При наличии тягучего сгустка с отделением сыворотки можно предполагать наличия посторонней микрофлоры. У мезофильных лактобацилл предельная кислотность составляет 160-180 °Т, а для термофильных лактобацилл она может достигать 250-300 °Т.

Закваска №3 несмотря на то, что способствовала формированию стабильного сгустка, характеризовалась образованием постороннего нетипичного

запаха. Вероятно, это связано с наличием нескольких видов лактобактерий и бифидобактерий в составе закваски.

Активность кислотообразования является важным биологическим параметром, относимым к специфической активности для ряда пробиотиков моно и поликомпонентного состава. Кислотообразующую активность бактериальных заквасок (БЗ) и бактериальных концентрированных заквасок (БК) определяли по нарастанию титруемой кислотности или по изменению активной кислотности титриметрическим методом. Определение кислотообразующей кислотности по приросту титруемой кислотности проводили при культивировании БЗ и БК в молоке в соответствии с техническими документами производителя. Изменение титруемой кислотности проводили по ГОСТ 3624-92. Данный подход позволяет проводить оценку ферментационных процессов в молоке, а также регистрировать изменения кислотности в процессе постферментации, т.е. при хранении.

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 18.

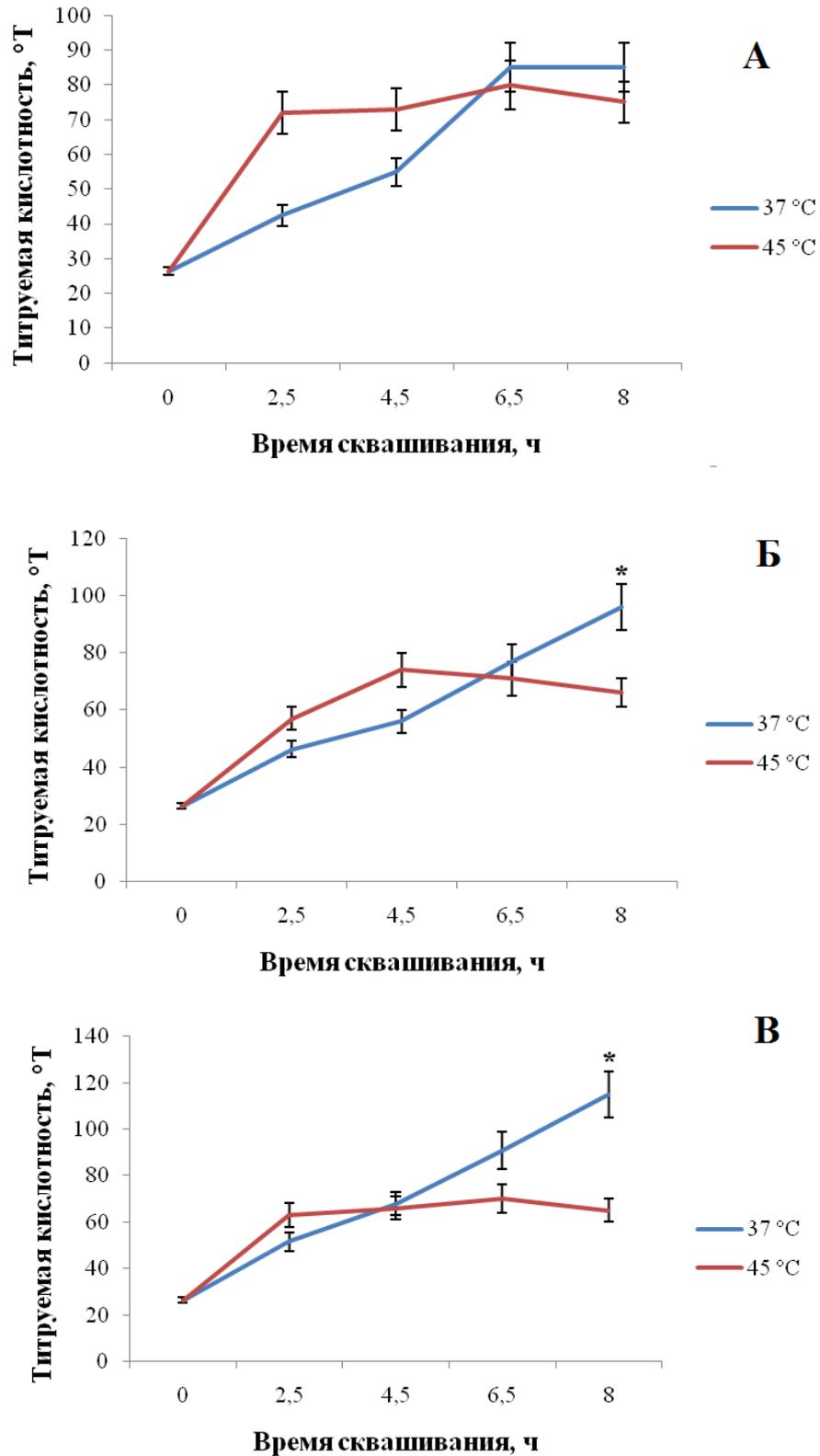


Рисунок 18 – Влияние температуры сквашивания на титруемую кислотность в исследуемых образцах ферментированной молочной основы: А – закваска №1, Б – закваска №2, В – закваска №3 (* различие статистически достоверное, $p < 0,05$)

Было установлено, что при сквашивании молока при 45 °С с помощью закваски №1, содержащей в своем составе только *S. thermophilus*, титруемая кислотность быстро нарастала и принимала значение 70 °Т по завершению 2 часов с момента начала сквашивания, в отличие от термостатирования при 37 °С, при которой такая величина кислотности была достигнута за 6,5 часов (рисунок 18А).

Присутствие *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. thermophiles*, 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. Результаты подсчёта КОЕ/см³ показаны на рисунке 19.

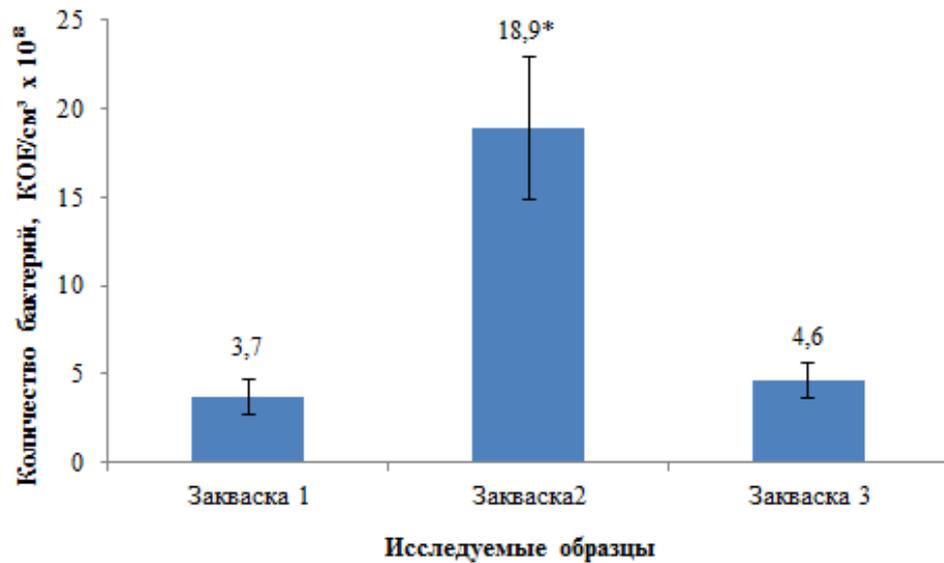


Рисунок 19 – Результаты подсчёта количества молочнокислых бактерий (КОЕ/см³) в сквашенном молоке, выросших на питательной среде (* различие статистически достоверное, $p < 0,05$)

Было установлено, что наибольшее значение КОЕ/см³ было получено у закваски №2 (18,9 x 10⁸ 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*. Это объясняется факультативным симбиозом, устанавливающимся между *S. thermophilus* и *L. bulgaricus*. Оба вида синтезируют вещества, необходимые для стимуляции роста друг друга. Протеолитические ферменты *L. bulgaricus* расщепляют молочные белки, тем самым трансформируя их в усвояемую для *S. thermophilus* форму. В свою очередь *S. thermophilus* вырабатывает муравьиную кислоту и диоксид углерода, повышающие эффективность жизнедеятельности *L. bulgaricus*. К тому же совместное существование этих бактерий обеспечивает ускорение процессов сбраживания лактозы, что сопровождается повышением кислотности и подавлением роста посторонних микроорганизмов, а также синтез экзополисахаридов, ответственных за формирование специфической текстуры и аромата [196]. Соответственно, низкое содержание КОЕ в образце сквашенного молока №1, вероятно, связано с отсутствием *Lactobacillus* в составе,

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 веществ с *L. bulgaricus*. Некоторые штаммы МКБ обеспечивают преждевременное подкисление среды, а также выработку ингибиторов против конкурирующих с ними за субстрат штаммов *S. thermophilus* и *L. bulgaricus*, что в конечном итоге приводит к нарушению симбиотического баланса между этими бактериями [144]. Всё это непосредственно может отразиться на количестве КОЕ в готовом продукте.

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

Одним из основных и важнейших таксонов среди молочнокислых бактерий считается лактобактерии. Бактерии этого рода являются важными компонентами микробиоты различных систем органов человека, где выполняют множество полезных функций. Некоторые виды активно применяются при производстве заквасок и пробиотической продукции, используемой в качестве полезных добавок и терапии различных заболеваний. Представители рода *Bifidobacterium* наряду с лактобактериями относятся к полезным микроорганизмам, используемым в качестве пробиотического компонента при изготовлении различной продукции [218].

В связи с широким многообразием видов необходимо обладать методиками типирования и идентификации, позволяющими быстро и надежно осуществлять видовое определение лактобактерий и бифидобактерий. Идентификация организмов, осуществляемая на основе секвенирования, представляет собой достаточно сложный и трудоёмкий процесс, требующий серьёзных материальных затрат и времени. В целях оптимизации процесса видовой идентификации был разработан метод ПЦР-ПДРФ наиболее значимых для пищевой промышленности видов лактобактерий.

Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов на основе ПЦР является наиболее простым методом обнаружения однонуклеотидных изменений в последовательностях. Метод основывается на разрезании нуклеиновой кислоты эндонуклеазами рестрикции и последующем анализе размеров полученных фрагментов с помощью электрофореза в агарозном геле.

На первом этапе анализировались наиболее важные для пищевой промышленности лактобактерии.

В качестве праймеров были выбраны 337F и 1100R. Далее проводился биоинформатический анализ рестриктаз, способных формировать специфические длины фрагментов. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Список проанализированных рестриктаз и длин рестриционных фрагментов (п.н.) с целью их последующего отбора для проведения видовой идентификации лактобактерий с использованием ПЦР-ПДРФ-анализа

Рестриктаза	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. rhamnosum</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. brevis</i>
Aat II	—	—	—	—	—	—	—
Acc16 I	—	—	—	—	—	—	—
Acc36 I	—	—	—	—	—	—	—
Acc65 I	—	—	—	—	—	—	—
AccB1 I	—	—	—	—	—	—	—
AccBS I	—	—	—	—	—	—	—
Acl I	—	—	—	—	—	—	—
Acl W I	—	—	—	95	95	—	—
Afe I	—	—	—	488, 540	—	—	—
Ahl I	—	—	—	—	—	—	—
Alu I	526, 631, 733	526, 733	526, 733	97, 733	97, 526, 733	97, 526, 631, 733	526, 631, 733
Apa I	596	596	596	596	596	596	596
AsiS I	—	—	—	—	—	—	—
AspLE I	245, 773	245, 297	245	245, 489, 541	245	44, 668	245
AsuHP I	366	366, 662	366, 662	120	120	—	—
BamH I	—	—	—	—	—	—	—
Bgl II	—	—	—	—	—	—	—
Bmt I	—	—	—	—	—	—	—

Bpu14	626	626	626	626	626	626	626
Bsa29 I	—	—	—	—	—	—	—
Bse21 I	—	—	—	—	—	—	—
BseP I	—	—	—	—	—	—	—
Bst2B I	734	734	734	734	734	734	734
BstAU I	—	—	—	—	—	—	—
BstHH I	245, 773	245, 297	245	245, 489, 541	245	44, 668	245
BstSC I	459, 546, 648	459, 546, 648	459, 546, 648	459, 546, 648	459, 546, 648	401, 459, 546, 648	459, 546, 648
BstSN I	200	200	200	200	200	200	200
BsuR I	560, 594	594	594	594	135, 594	594	594
Btr I	—	—	—	—	—	—	—
Dra I	—	—	—	—	—	—	—
EcoICR I	—	—	—	—	—	—	—
EcoR I	—	—	—	338	—	—	—
EcoR V	—	—	—	—	—	—	—
Ege I	—	—	—	—	—	—	—
Fat I	343, 612, 701, 718	343, 433, 469, 612, 718	343, 433, 469, 612, 718	343, 433, 469, 612, 718	343, 433, 469, 612, 718	343, 433, 469, 612, 718	343, 433, 469, 612, 718
FauND I	—	—	—	—	—	—	—
Hind III	—	—	—	—	—	—	—
Hpa I	—	—	—	—	—	—	—
Kpn I	—	—	—	—	—	—	—
Ksp22 I	—	667	667	—	—	—	—
Kzo9 I	—	667, 679	667, 679	87	87	—	—
Mfe I	—	—	—	—	—	—	—
Mlu I	—	—	—	—	—	—	—
Msp I	219	219	219	219, 508	219	219, 287, 521	219, 287
Pce I	—	—	—	—	—	—	—
Ple19 I	—	—	—	—	—	—	—
Psi I	—	—	—	—	—	—	—
Pst I	525	—	—	—	525	—	525
Rsa I	556	556	556	556	556	556	556
Sse9 I	582, 622	582, 622	582, 622	338, 582, 622	582, 622	582, 622	582, 622
Ssp I	—	—	—	—	—	—	—
Taq I	427, 626	427,	427, 626	427, 626	427, 626	427, 626	427, 626

		626					
Tru9 I	106, 153, 257, 535, 621, 755	257, 283, 535, 621, 755	257, 283, 535, 621, 755	535, 621, 755	283, 535, 621, 755	106, 153, 283, 535, 621, 755	106, 153, 257, 283, 535, 621, 755
Vsp I	—	—	—	—	—	—	—
Zsp 2I	—	—	—	—	—	—	—
Xba I	—	—	—	—	—	—	—

Длина амплифицированного фрагмента последовательности гена *16S рPHK* составляла 737 п.н. Было отобрано 3 рестриктазы, позволяющие дифференцировать 7 видов лактобактерий. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Ожидаемые длины продуктов рестрикции 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. rhamnosum</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

Применение рестриктазы Alu I позволяет однозначно дифференцировать *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* и *L. fermentum*. Необходимо отметить, что анализ с использованием фермента рестрикции AspLE I также выявляет различия между видами *L. delbrueckii* и *L. fermentum*. Эндонуклеаза Alu I не позволяет различать виды *L. casei* и *L. rhamnosum*, поскольку длины фрагментов, получаемые в результате рестрикции, являются идентичными. Эту проблему решает использование рестриктазы AspLE I. Фрагменты в 52, 245 и 440 п.н. и 245 и 495 п.н. получаются в результате расщепления *L. casei* и *L. rhamnosum* соответственно. ПДРФ-паттерн, полученный в результате использования

эндонуклеазы Msp I, позволяет отличить *L. brevis* от всех остальных исследуемых видов, поскольку длина полученных фрагментов рестрикции является уникальной для *L. brevis* и не формирует совпадения ни для одного из других видов. Рестриктаза Msp I генерирует образование трех полос, размер которых составляет 68, 219 и 450 п.н.

Визуализация результатов отбора рестриктаз осуществлялась на примере 5 видов *Lactobacillus* – *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. casei* и *L. rhamnosum*. Детекция продуктов ПЦР проводилась с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с последующей визуализацией на приборе ChemiDoc MP (Bio-Rad, США). Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами 337F и 1100R, обработанных рестриктазой Msp I изображена на рисунке 20.

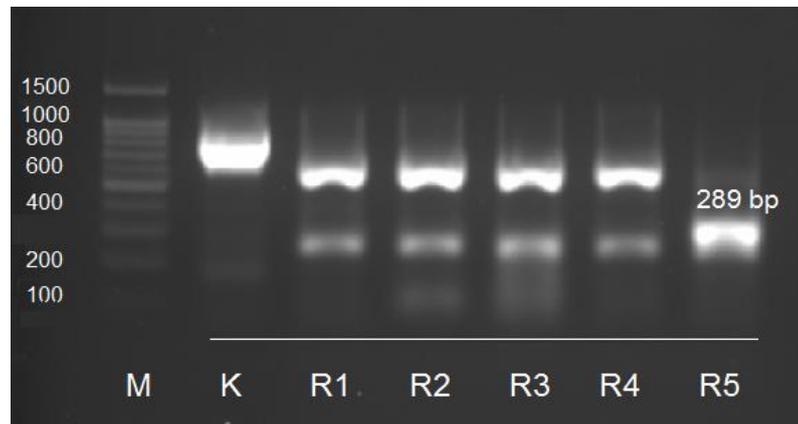


Рисунок 20 – Электрофореграмма продуктов рестрикции Msp I. К – ПЦР-продукт до рестрикции; R – ПЦР-продукты после рестрикции.

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

В данной видовой выборке рестриктаза Msp I однозначно идентифицирует *L. delbrueckii*, разрезая последовательность с образованием фрагмента 289 п.н., контрастирующего с другими паттернами рестрикции. На рисунке 21 изображены результаты рестрикции эндонуклеазами Alu I и AspLE I.

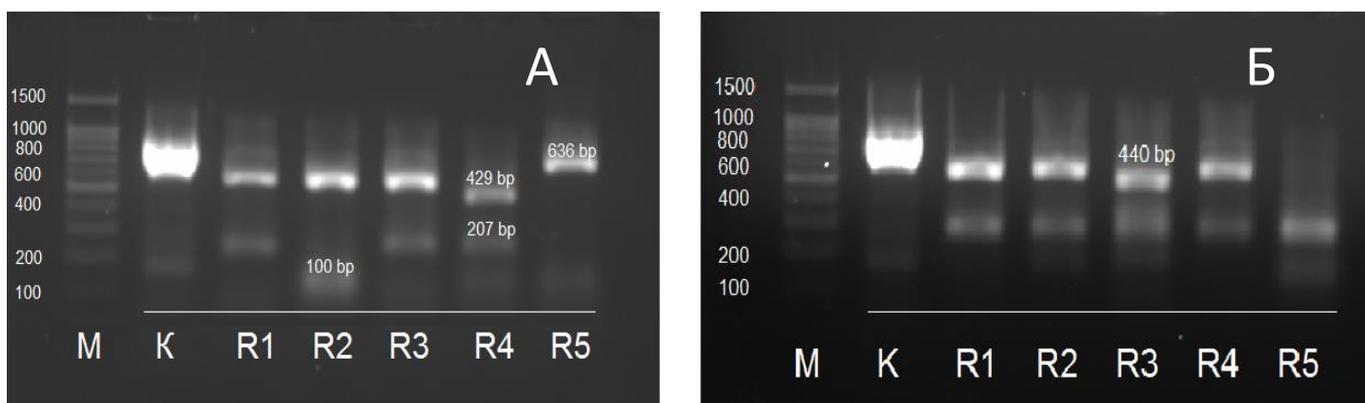


Рисунок 21 – Электрофореграмма продуктов рестрикции Alu I (А) и AspLE I (Б).

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

Применение рестриктаз Alu I и AspLE I обеспечивает завершение корректной идентификации видов лактобактерий. Эндонуклеаза Alu I специфически разрезает 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* образует 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. Далее проводился биоинформатический анализ рестриктаз, способных формировать специфические длины фрагментов. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Список проанализированных рестриктаз и длин рестрикциионных фрагментов (п.н.) с целью их последующего отбора для проведения видовой идентификации бактерий рода *Bifidobacterium* с использованием ПЦР-ПДРФ-анализа

Рестриктаза	<i>B. breve</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. animalis</i>
Aat II	–	–	–	–	–
Acc16 I	–	–	–	–	–
Acc36 I	371	366	367	369	377
Acc65 I	–	–	–	–	–
AccB1 I	–	–	–	–	–
AccBS I	–	–	–	–	–
Acl I	–	–	–	–	–
Acl W I	271, 284, 652	266, 279, 647	280	269, 282	290, 668
Afe I	–	–	–	–	–
Ahl I	–	–	–	–	–
Alu I	512, 718	507, 713	508, 714	716	724
Apa I	488, 582	483, 577	578	580	494, 588
AsiS I	–	–	–	–	–
AspLE I	44, 284, 758	44, 279, 753	43, 147, 189, 280, 754	43, 282, 756	43, 290, 764
AsuHP I	–	–	135	137	–
BamH I	276	271	–	274	–
Bgl II	–	–	–	–	–
Bmt I	–	–	–	–	–
Bpu14 I	141	–	137	139	147
Bsa29 I	–	–	–	–	–
Bse21 I	–	–	–	–	–
BseP I	–	–	–	–	–
Bst2B I	719	714	715	717	725
BstAU I	–	–	–	–	–
BstHH I	44, 284, 758	44, 279, 753	43, 147, 189, 280, 754	43, 282, 756	43, 290, 764
BstSC I	284, 327, 444, 532, 634	279, 322, 439, 527, 629	280, 323, 440, 528, 630	282, 325, 442, 530, 632	290, 333, 450, 538, 640
BstSN I	185	180	181	183	191
BsuR I	81, 392, 486, 29546, 580	81, 387, 481, 541, 575	80, 388, 542, 576	80, 390, 544, 578, 671	80, 128, 398, 492, 552, 586, 692
Btr I	–	–	–	–	–
Dra I	–	–	–	–	–
EcoICR I	–	–	–	–	–
EcoR I	323	318	319	321	329
EcoR V	354	349	350	352	360
Ege I	–	–	–	–	–

Fat I	598, 645, 703	593, 640, 698	594, 641, 699	596, 643, 701	604, 651, 709
FauND I	—	—	—	—	—
Hind III	—	—	—	—	—
Hpa I	—	—	—	—	—
Kpn I	—	—	—	—	—
Ksp22 I	—	—	—	—	—
Kzo9 I	276, 657	271, 652	272	274	282, 660
Mfe I	—	—	—	—	—
Mlu I	516	511	512	514	522
Msp I	152, 204, 248, 285, 329	147, 199, 243, 280, 324	148, 200, 244, 281, 325	150, 202, 246, 283, 327	158, 210, 254, 291, 335, 658, 693
Pce I	81	81	80	—	80
Ple19 I	—	—	—	—	—
Psi I	—	—	—	—	—
Pst I	—	—	—	—	—
Rsa I	135, 290, 542	285, 537	131, 286, 538	133, 288, 540	296, 548
Sse9 I	207, 323, 568, 608	202, 318, 563, 603	319, 564, 604	205, 321, 566, 606	329, 574, 614
Ssp I	29	29	28	28	28
Taq I	141, 612	607	137, 608	139, 610	147, 618
Tru9 I	268, 521, 607, 740	263, 516, 602, 735	264, 517, 603, 736	266, 519, 605, 738	527, 613, 746
Vsp I	607	602	603	605	613
Zsp 2I	—	—	—	—	—
Xba I	—	—	—	—	—

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 10.

Таблица 10 – Ожидаемые длины продуктов рестрикции 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,	135,625	319, 245, 40, 156	137, 152, 471

	474			
<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

Видовая идентификация представителей рода *Bifidobacterium* может быть осуществлена в несколько этапов. Применение рестриктазы Taq I способствует формированию особого фрагмента для вида *B. longum*, величина которого составляет 607 п.н. Это позволяет безошибочно идентифицировать данный вид бифидобактерий от остальных. Рестриктаза AsuHP I разрезает последовательности только двух видов *Bifidobacterium* – *B. bifidum* и *B. adolescentis*, но не способна обеспечить достоверное различие этих двух видов, поскольку образует для них одинаковые ПДРФ-паттерны. Применение рестриктазы BstHH I позволяет четко идентифицировать вид *B. bifidum* за счёт образования специфичного фрагмента, размер которого составляет 104 п.н., а, следовательно, и идентифицирует *B. adolescentis*. Благодаря предварительному использованию рестриктазы BstHH I эндонуклеаза Sse9 I способствует идентификации *B. animalis*, несмотря на то, что она разрезает последовательности *B. bifidum* и *B. animalis* с образованием сходных фрагментов – 40, 156, 245, 319 и 40, 146, 245, 329, соответственно. На заключительном этапе, анализируя результаты применения трех рестриктаз – AsuHP I, Taq I и Sse9 I – можно выявить *B. breve*.

Визуализация результатов отбора рестриктаз осуществлялась на примере бактерии *B. bifidum*, являющимся одним из наиболее распространенных пробиотических видов, используемых в качестве действующего компонента в пробиотиках. Детекция продуктов ПЦР проводилась с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с последующей визуализацией на ChemiDoc MP (Bio-Rad, США). Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами 337F и 1100R, обработанных рестриктазой BstHH I изображена на рисунке 22.

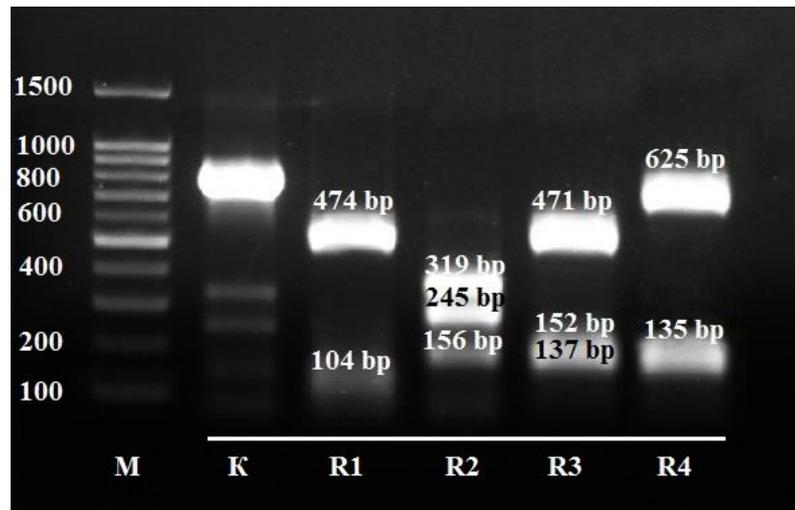


Рисунок 22 – Электрофореграмма продуктов рестрикции *B. bifidum* с различными рестриктазами. К – ПЦР-продукт до рестрикции; R – ПЦР-продукты после рестрикции. R1 – BstNI; R2 – Sse9I; R3 – TaqI; R4 – AsuNI. M – ДНК-маркер

Рестриктаза BstNI 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, BstNI, Sse9I и TaqI. Данный подход может быть использован в качестве надежного метода идентификации данных представителей рода *Bifidobacterium*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идентификация сложных микробиологических препаратов, таких как закваски и пробиотики, является актуальной задачей в современных пищевых технологиях. В ходе выполнения работы первоначально был произведен подбор наиболее эффективного метода выделения ДНК из классического кисломолочного пробиотического продукта – кефира. Выделение ДНК является неотъемлемой частью лабораторных исследований, от успешности которой зависит конечный результат эксперимента. Было установлено, что наиболее оптимальными вариантами для экстракции ДНК на основе сорбции является использование буфера, концентрация гуанидин тиоцианата в котором составляла не менее 5М, и наличия детергента Triton X-100 или Tween 20. Использование в качестве детергентов Tween 20 или Tween 80 повышало фракцию РНК в выделенном препарате нуклеиновых кислот.

Вследствие того, что при проведении видовой идентификации молочнокислых бактерий зачастую концентрация ДНК не позволяет провести секвенирование, был разработан метод концентрирования продуктов ПЦР. Наиболее оптимальным для концентрирования ампликона оказалось применение колонок с силикой (диоксид кремния) и использование суспензии магнитных частиц. Максимальная концентрация ДНК (36,42 нг/мкл) была получена при применении колонки с силикой. Меньшая концентрация ДНК (31,79 нг/мкл) была получена при применении суспензии магнитных частиц, однако магнитные частицы позволяли получать более гомогенный препарат ампликона, чем в случае применения колонки с силикой. Концентрирование ампликона может быть необходимым этапом в случаях изначально низкого содержания ДНК целевого организма или амплифицированного продукта ПЦР, что является ограничительным фактором при приготовлении библиотек секвенирования.

С помощью метода высокопроизводительного секвенирования исследован состав коммерческих пробиотиков и заквасок, применяемых в промышленности для изготовления кисломолочных продуктов и пробиотиков. Секвенирование

позволило установить различное соотношение бактерий в составе каждого из образцов. Наиболее распространенными микроорганизмами в пробиотиках оказались представители рода *Lactobacillus*, чья относительная численность варьировала от 2 до 99,5%. В 50% образцов пробиотиков были идентифицированы бактерии рода *Bifidobacterium*. Присутствие бактерий рода *Streptococcus* во множестве проанализированных образцов, вероятно, может свидетельствовать о том, что данные пробиотики были изготовлены с помощью заквасок, в которых *Streptococcus* использовался для поддержания процессов ферментации. В заквасках род *Bifidobacterium* встречался в 23% образцов, а количественное соотношение не превышало 20%. *Streptococcus* оказался наиболее часто встречающимся в проанализированных образцах родом бактерий. При этом в 40% заквасок содержание *Streptococcus* превышало 70% от общего относительного количества бактерий в составе.

Баланс штаммов в составе пробиотической закваски способствует формированию специфичной функциональности готового продукта, а также установлению и использованию подходящих условий для процесса его сквашивания и дальнейшего хранения. Уменьшение отношения *L. plantarum*/*B. bifidum* в трехкомпонентной закваске приводило к увеличению доли *S. thermophilus* в конечном продукте ферментации. Наибольшее содержание *S. thermophilus* было зарегистрировано в смеси, где соотношение *L. plantarum*/*B. bifidum* было $10^6/10^8$ КОЕ/см³. Также было зарегистрировано снижение относительного содержания *B. bifidum* в продукте в каждом из анализируемых образцов в процессе ферментации. Заквасочные смеси бактерий, где начальное содержание *L. plantarum* в 10 и 100 раз превышало содержание *B. bifidum*, обеспечивали формирование готового продукта с предельно низким относительным содержанием *B. bifidum* (2,2% и 0,4% соответственно), вероятно, по причине активного подкисления среды *S. thermophilus* и *L. plantarum*.

Изменение соотношения бактерий, входящих в состав комплексных многокомпонентных заквасок, в процессе брожения продуктов может влиять на функциональность и качество пробиотической продукции. Проведенное

исследование продемонстрировало изменения бактериального состава молочной основы в процессе ферментации. В процессе ферментации выявлено снижение рода *Bifidobacterium* и преобладание рода *Lactobacillus*. Пик обильности рода *Lactobacillus* в исследуемом субстрате составил 97,5% при 15-часовой ферментации. Род *Lactobacillus* практически заместил все другие роды бактерий, включая *S. thermophilus*. Это, вероятно, объясняется сильным снижением pH в процессе ферментации, при котором даже бактерии *S. thermophilus* замедляли темпы размножения. Для ферментации продолжительностью 18 часов были достигнуты оптимальные значения для увеличения относительной численности рода *Lactobacillus* (pH 4,2-4,4), но они оказались низкими для роста *Bifidobacterium* и, вероятно, для роста *S. thermophilus*. Показано, что высокопроизводительное секвенирование является подходящим инструментом для контроля процессов ферментации пробиотиков.

Было установлено, что присутствие дополнительных родов молочнокислых бактерий или их отсутствие в заквасках для приготовления йогуртов меняет технологические характеристики готового продукта. При длительной ферментации (64 часа с момента начала сквашивания) применением закваски, содержащей дополнительно *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* помимо двух ключевых видов бактерий для приготовления йогуртов (*L. bulgaricus* и *S. thermophilus*), итоговый продукт характеризовался изменением органолептических свойств (посторонним нетипичным запахом). Присутствие *Lactobacillus* достоверно повышало титруемую кислотность при температуре сквашивания 37 °C по сравнению с этим показателем в процессе сквашивания при 45 °C. 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.

Наибольшее значение КОЕ/см³ было зарегистрировано у закваски, состоящей из *S. thermophiles* и *L. bulgaricus* (18,9 x 10⁸ КОЕ), что объясняется факультативным симбиозом между этими бактериями, синтезирующими вещества, необходимые для стимуляции роста друг друга.

Идентификация пробиотических бактерий на основе метода ПЦР-ПДРФ может быть использована в качестве быстрого и надежного метода определения таксономической принадлежности представителей лактобактерий и бифидобактерий. На основании проведенного исследования было установлено, 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. Использование четырех рестриктаз – AsuHP I, BstHH I, Sse9 I и Taq I с предварительной амплификацией ДНК с помощью праймеров 337F и 1100R позволяет проводить определение таксономической принадлежности *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* и *B. animalis*.

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 гомогенизацией.

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. rhamnosum*, *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, BstHH 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 СОКРАЩЕНИЙ

- AAB – уксуснокислые бактерии
- AFLP – полиморфизм длины амплифицированного фрагмента
- CNS – коагулазоотрицательные стафилококки
- FISH – флуоресцентная гибридизация in situ
- GGC – каталазоположительные кокки
- GRAS – общепризнанный уровень безопасности
- ITS – внутренний транскрибируемый спейсер
- LAB – молочнокислые бактерии
- MLST – многоцелевое типирование последовательностей
- NGS – секвенирование нового поколения
- nsLAB – нестартовые молочнокислые бактерии для прямого внесения
- OTU – оперативная таксономическая единица
- PFGЕ – гель-электрофореза в импульсном геле
- RAPD – случайно амплифицированная полиморфная ДНК
- SNP – однонуклеотидный полиморфизм
- T-RFLP – полиморфизм длины рестрикционного фрагмента
- TaqMan ПЦР – ПЦР с применением гидролизованного зонда, предназначенный для повышения специфичности амплификации
- БАВ – биологически активные вещества
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- КОЕ – колониеобразующие единицы
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота
- тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
- ФАО/ВОЗ – продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединённых Наций/ Всемирная Организация Здравоохранения
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Беспоместных, К. Идентификация молочнокислых бактерий с помощью полимеразной цепной реакции / К. Беспоместных // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2018. – Т. 12.
2. Выявление генов бактериоцинов у пробиотических штаммов молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* D № 75 и *Lactobacillus acidophilus* D № 76 / В.А. Торопов, О.Н. Шалаева, Е.К. Рощина [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – Т. 10. – С. 58-65.
3. Сливка, И.Н. Идентификация молочнокислых бактерий с применением комплекса молекулярно-генетических методов / И.Н. Сливка, О.И. Цисарык, Т. Боцер // Научный вестник Львовского национального университета ветеринарной медицины и биотехнологии им. С.З. Гжицкого. – 2015. – Т. 17, № 61. – С. 201-210.
4. Стоянова, Л.Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis subsp. lactis* с антимикробным действием / Л.Г. Стоянова // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2017. – Т. 5. – С. 41-61.
5. A high-throughput qPCR system for simultaneous quantitative detection of dairy *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc* bacteriophages / М.К. Muhammed, L. Krych, D.S. Nielsen [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 3. – P. e0174223.
6. A new approach to harness probiotics against common bacterial skin pathogens: Towards living antimicrobials / G. Khalfallah, R. Gartzzen, M. Möller [et al.] // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2021. – Vol. 13. – P. 1557-1571.
7. A novel approach to predict the growth of *Staphylococcus aureus* on rice cake / J. Wang, S. Koseki, M.J. Chung [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. e1140.
8. A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies / Y. Cao, S. Fanning, S. Proos [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. e1829.

9. A specific and rapid method for detecting *Bacillus* and *Acinetobacter* species in Daqu / Y. Wei, S. Zhang, G. Guan [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2023 – Vol. 11. – P. e1261563.
10. Adaptation of *Akkermansia muciniphila* to the oxic-anoxic interface of the mucus layer / J.P. Ouwerkerk, K.C. van der Ark, M. Davids [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2017. – Vol. 82. – P. 6983-6993.
11. Adsorption and elution characteristics of nucleic acids on silica surfaces and their use in designing a miniaturized purification unit / T. Poeckh, S. Lopez, A.O. Fuller [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2008. – Vol. 373. – P. 253-262.
12. Advances in emerging technologies for the decontamination of the food contact surfaces / S. Sharma, S. Jaiswal, B. Duffy // *Food Research International*. – 2022. – Vol. 151. – P. e110865.
13. *Akkermansia muciniphila* and gut immune system: a good friendship that attenuates inflammatory bowel disease, obesity, and diabetes / V.F. Rodrigues, J. Elias-Oliveira, Í.S. Pereira [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 934695.
14. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium / M. Derrien, E.E. Vaughan, C.M. Plugge [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2004. – P. 1469-1476.
15. *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic / T. Zhang, Q. Li, L. Cheng [et al.] // *Microbial Biotechnology*. – 2019. – Vol. 12. – P. 1109-1125.
16. *Akkermansia muciniphila*: a novel functional microbe with probiotic properties / C. Gómez-Gallego, S. Pohl, S. Salminen [et al.] // *Beneficial Microbes*. – 2016. – Vol. 7. – P. 571-584.
17. *Akkermansia muciniphila*: a potential booster to improve the effectiveness of cancer immunotherapy / S. Fan, Z. Jiang, Z. Zhang [et al.] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2023. – Vol. 149. – P. 13477-13494.
18. Amann, R. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation / R. Amann, B.M. Fuchs, S. Behrens // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2001. – Vol. 12, № 3. – P. 231-236.

19. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform / D.W. Fadrosh, B. Ma, P. Gajer [et al.] // *Microbiome*. – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. e68409.
20. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities / A.Y. Merkel, I. Tarnovetskii, O. Podosokorskaya [et al.] // *Microbiology*. – 2019. – Vol. 88. – P. 671-680.
21. Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients / M.L. Ka, P.V. Kirjavainen, S. Hekmat [et al.] // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2007. – Vol. 149. – P. 470-479.
22. Antimicrobial activity – the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria / J. Šuškovič, B. Kos, J. Beganović [et al.] // *Food Technology and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 48. – P. 296-307.
23. Aryana, K.J. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products / K.J. Aryana, D.W. Olson // *Journal of Dairy Science*. – 2017. – Vol. 100, № 12. – P. 9987-10013.
24. Asano, S. PCR Analysis methods for detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria / S. Asano, M. Shimokawa, K. Suzuki // *Methods in Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 1887. – P. 95-107.
25. Ashaolu, T.J. Holistic review on Euro-Asian lactic acid bacteria fermented cereals and vegetables / T.J. Ashaolu, A.A. Reale // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – P. e1176.
26. Assessment of commercial probiotic products in China for labelling accuracy and probiotic characterisation of selected isolates / T. Chen, Q. Wu, H. Zhou [et al.] // *International Journal of Dairy Technology*. – 2017. – Vol. 70. – P. 119-126.
27. Bacterial composition and function during fermentation of Mongolia koumiss / Y. Wu, Y. Li, Q. Gesudu [et al.] // *Food Science & Nutrition*. – 2021. – Vol. 9, № 8. – P. e4146-4155.
28. Ben Amor, K. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria / K. Ben Amor, E.E. Vaughan, W.M. de Vos // *Journal of Nutrition*. – 2007. – Vol. 137, № 3. – P. e741S-7S.

29. Ben Braïek, O. Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics / O. Ben Braïek, S. Smaoui // *BioMed Research International*. – 2019. – Vol. 2019. – P. e5938210.
30. Berensmeier, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids / S. Berensmeier // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – Vol. 73, № 3. – P. 495-504.
31. Bintsis, T. Lactic acid bacteria: Their applications in foods / T. Bintsis // *Journal of Bacteriology and Mycology*. – 2018. – Vol. 6, № 2. – P. 89-94.
32. Botina, S.G. Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing / S.G. Botina, Iu.D. Tsygankov, V.V. Sukhodolets // *Genetika*. – 2006. – Vol. 42, № 12. – P. 1621-1635.
33. Bourrie, B.C. The Microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir / B.C. Bourrie, B.P. Willing, P.D. Cotter // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 647.
34. Boyd, M.A. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species / M.A. Boyd, M.A. Antonio, S.L. Hillier // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2005. – Vol. 43, № 10. – P. 5309-5311.
35. Briggiler Marcó, M. Bacteriophages in dairy plants / M. Briggiler Marcó, D.J. Mercanti // *Advances in Food and Nutrition Research*. – 2021. – Vol. 97. – P. 1-54.
36. Cady, N.C. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures / N.C. Cady, S. Stelick, C.A. Batt // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2003. – Vol. 19. – P. 59-66.
37. Cani, P.D. Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome / P.D. Cani, M. Van Hul // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2015. – Vol. 32. – P. 21-27.
38. Carleton, H.A. Whole-genome sequencing is taking over foodborne disease surveillance / H.A. Carleton, P. Gerner-Smidt // *Microbe*. – 2016. – Vol. 11, № 7. – P. 311-317.

39. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity / B.E. Wolfe, J.E. Button, M. Santarelli [et al.] // *Cell*. – 2014. – Vol. 158, № 2. – P. 422-433.
40. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin / F. Irlinger, S. Layec, S. Hélinck [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2015. – Vol. 362, № 2. – P. 1-11.
41. Chilton, S.N. Inclusion of fermented foods in food guides around the world / S.N. Chilton, J.P. Burton, G. Reid // *Nutrients*. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 390-404.
42. Classification of lytic bacteriophages attacking dairy *Leuconostoc* starter strains / Y. Ali, W. Kot, Z. Atamer [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – Vol. 79, № 12. – P. 3628-123636.
43. Coffey, A. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application / A. Coffey, R.P. Ross // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2002. – Vol. 82, № 1-4. – P. 303-321.
44. Cohen, P.A. Probiotic safety-no guarantees / P.A. Cohen // *JAMA Internal Medicine*. – 2018. – Vol. 178, № 12. – P. 1577-1578.
45. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine / M.J. Claesson, O. O'Sullivan, Q. Wang [et al.] // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4, № 8. – P. e6669.
46. Comparison and evaluation of molecular methods used for identification and discrimination of lactic acid bacteria / K. Pal, O. Szén, A. Kiss [et al.] // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2012. – Vol. 92, № 9. – P. 1931-1936.
47. Comparison of different decontamination methods for reagents to detect low concentrations of bacterial 16S DNA by Real-Time-PCR / S. Klaschik, L.E. Lehmann, A. Raadts [et al.] // *Molecular Biotechnology*. – 2002. – Vol. 22, № 3. – P. 231-242.
48. Comparison of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species / A.N. Vlasova, S. Kandasamy, K.S. Chattha [et al.] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2016. – Vol. 172. – P. 72-84.

49. Comparison of ten different DNA extraction procedures with respect to their suitability for environmental samples / R. Kuhn, J. Böllmann, K. Krahl [et al.] // *Journal of Microbiological Methods*. – 2017. – Vol. 143. – P. 78-86.
50. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures / J.M. Neefs, Y. Van de Peer, P. De Rijk [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 1993. – Vol. 21, № 13. – P. 3025-3049.
51. Cordaillat-Simmons, M. Live biotherapeutic products: the importance of a defined regulatory framework / M. Cordaillat-Simmons, A. Rouanet, B. Pot // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2020. – Vol. 52, № 9. – P.1397-1406.
52. Cosmeceuticals: A Review of clinical studies claiming to contain specific, well-characterized strains of probiotics or postbiotics / I.M. Theodorou, D. Kapoukranidou, M. Theodorou [et al.] // *Nutrients*. – 2024. – Vol. 16, № 15. – P. 2526.
53. Crowley, S. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives / S. Crowley, J. Mahony, D. van Sinderen // *Trends in Food Science and Technology*. – 2013. – Vol. 33. – P. 93-109.
54. Cultivation of the gut bacterium *Prevotella copri* DSM 18205T using glucose and xylose as carbon sources / F. Huang, R.R. Sardari, A. Jasilionis [et al.] // *Microbiologyopen*. – 2021. – Vol. 10, № 3. – P. e1213.
55. Culture-Independent metagenomic surveillance of commercially available probiotics with high-throughput next-generation sequencing / J.N. Patro, P. Ramachandran, T. Barnaba [et al.] // *mSphere*. – 2016. – Vol. 1, № 2. – P. e00057-16.
56. Das, K. Effects of new technology on the current manufacturing process of yogurt-to increase the overall marketability of yogurt / K. Das, R. Choudhary, K.A. Thompson-Witrick // *LWT – Food Science and Technology*. – 2019. – Vol. 108. – P. 69-80.
57. De Filippis, F. Metagenomics insights into food fermentations / F. De Filippis, E. Parente, D. Ercolini // *Microbial Biotechnology*. – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 91-102.
58. De Simone, C. The unregulated probiotic market / C. De Simone // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2019. – Vol. 17, № 5. – P. 809-817.

59. De Vos, W.M. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation / W.M. de Vos, E.A. de Vos // *Nutrition Reviews*. – 2012. – Vol. 70. – P. S45-56.
60. Defining food safety inspection / J. Barnes, H. Whiley, K. Ross [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2022. – Vol. 19, № 2. – P. e789.
61. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad–taxonomic–range PCR in microbial ecology studies / L.W. Hugerth, H.A. Wefer, S. Lundin [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – Vol. 80, № 16. – P. 5116-5123.
62. Derrien, M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions / M. Derrien, C. Belzer, W.M. de Vos // *Microbial Pathogenesis*. – 2017. – Vol. 106. – P. 171-181.
63. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants / D. Verreault, L. Gendron, G.M. Rousseau [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – Vol. 77, № 2. – P. 491-497.
64. Development of Strain-specific primers for identification of *Bifidobacterium bifidum* BGN4 / S.Y. Youn, G.E. Ji, Y.R. Han [et al.] // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 27, № 5. – P. 909-915.
65. Dharsini, S.P. Identification of potential probiotics from fermented sour traditional rice varieties and in vitro simulation studies / S.P. Dharsini, K. Suganya, S. Sumathi // *Natural Product Research*. – 2024. – Vol. 38, № 16. – P. 2723-2730.
66. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids / S. Lukovac, C. Belzer, L. Pellis [et al.] // *mBio*. – 2014. – Vol. 5. – P. e01438-14.
67. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods / M.G. Cruz Perdozo Miguel, P. Gomes Cardoso, L. de Assis Lago [et al.] // *Food Research International*. – 2010. – Vol. 43, № 5. – P. 1523-1528.

68. Donohue, D.C. Safety of probiotic bacteria / D.C. Donohue, S. Salminen // *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. – 1996. – Vol. 5. – P. 25-28.
69. Ecology- and genome-based identification of the *Bifidobacterium adolescentis* prototype of the healthy human gut microbiota / C. Argentini, G.A. Lugli, C. Tarracchini [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2024. – Vol. 90, № 2. – P. e0201423.
70. Edgar, R.C. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads / R.C. Edgar, H. Flyvbjerg // *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 31, № 21. – P. 3476-3482.
71. Edgar, R.C. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing / R.C. Edgar // *bioRxiv*. – 2016. – 21 p.
72. Effect of Co-Fermentation with lactic acid bacteria and *K. marxianus* on physicochemical and sensory properties of goat milk / Z. Huang, L. Huang, G. Xing [et al.] // *Foods*. – 2020. – Vol. 9, № 3. – P. e299.
73. Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing / I. Sodini, A. Lucas, M.N. Oliveira [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2002. – Vol. 85, № 10. – P. 2479-2488.
74. Effect of *Staphylococcus aureus* contamination on the microbial diversity and metabolites in wholewheat sourdough / W. Guo, Z. Li, X. Fu [et al.] // *Foods*. – 2022. – Vol. 11, № 13. – P. e1960.
75. Effects of different carbon sources on metabolic profiles of carbohydrates in *Streptococcus thermophilus* during fermentation / X. Song, C. Hou, Y. Yang [et al.] // *The Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2022. – Vol. 102, № 11. – P. 4820-4829.
76. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives / D. Merenstein, B. Pot, G. Leyer [et al.] // *Gut Microbes*. – 2023. – Vol. 15, № 1. – P. e2185034.
77. Enumeration of bacteriophage particles: Comparative analysis of the traditional plaque assay and real-time QPCR- and nanosight-based assays / B. Anderson, M.H. Rashid, C. Carter [et al.] // *Bacteriophage*. – 2011. – Vol. 1, № 2. – P. 86-93.

78. Ercolini, D. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology / D. Ercolini // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – Vol. 79, № 10. – P. 3148-3155.

79. Esposito, A. How many 16S-based studies should be included in a metagenomic conference? It may be a matter of etymology / A. Esposito, M. Kirschberg // *FEMS Microbiology Letters*. – 2014. – Vol. 351, № 2. – P. 145-146.

80. *Eubacterium limosum* ameliorates experimental colitis and metabolite of microbe attenuates colonic inflammatory action with increase of mucosal integrity / O. Kanauchi, M. Fukuda, Y. Matsumoto [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 12, № 7. – P. e1071.

81. Evaluation of hypoglycemic effect, safety and immunomodulation of *Prevotella copri* in mice / P. Verbrugghe, J. Brynjólfsson, X. Jing [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. e21279.

82. Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar / Z.M. Wang, Z.M. Lu, J.S. Shi [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. e26818.

83. Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics / M.R. Swain, M. Anandharaj, R.C. Ray [et al.] // *Biotechnology Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – P. e250424.

84. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use / F. Bourdichon, S. Casaregola, C. Farrokh [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2012. – Vol. 154, № 3. – P. 87-97.

85. Franca, K. Topical probiotics in dermatological therapy and skincare: A concise review / K. Franca // *Dermatologic Therapy*. – 2021. – Vol. 11. – P. 71-77.

86. Fundamentals of cheese science / P.F. Fox, T.P. Guinee, T.M. Cogan [et al.] – NY: Springer New York, 2000. – 799 p.

87. Gänzle, M.G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage / M.G. Gänzle // *Current Opinion in Food Science*. – 2015. – Vol. 2. – P. 106-117.

88. García-Díez, J. Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety / J. García-Díez, C. Saraiva // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2021. – Vol. 18, № 5. – P. e2544.

89. Garneau, J.E. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations / J.E. Garneau, S. Moineau // *Microbial cell factories*. – 2011. – Vol. 10, № 1. – P. eS20.

90. Gemechu, T. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation / T. Gemechu // *African Journal of Food Science*. – 2007. – Vol. 9, №4. – P. 170-175.

91. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton / S.J. Giovannoni, T.B. Britschgi, C.L. Moyer [et al.] // *Nature*. – 1990. – Vol. 345, № 6270. – P. 60-63.

92. Genomic and metabolic features of an unexpectedly predominant, thermophilic, assistant starter microorganism, *thermosthermophilus*, in chinese inner mongolian cheese / L. Zhu, Z. Hou, X. Hu [et al.] // *Foods (Basel, Switzerland)*. – 2021. – Vol. 10, № 12. – P. e2962.

93. Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety / M.W. Allard, R. Bell, C.M. Ferreira [et al.] // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2018. – Vol. 49. – P. 224-229.

94. Genotyping by PCR and high-throughput sequencing of commercial probiotic products reveals composition biases / W. Morovic, A.A. Hibberd, B. Zabel [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1747.

95. Gerrit, S. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products / S. Gerrit, A.S. Bart, J.M.E. Wim // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2005. – Vol. 29. – P. 591-610.

96. Gizaw, Z. Public health risks related to food safety issues in the food market: a systematic literature review / Z. Gizaw // *Environmental Health and Preventive Medicine*. – 2019. – Vol. 24. – P. e68.

97. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance / EFSA Panel on Additives and Products or

Substances used in Animal Feed (FEEDAP) // EFSA Journal. – 2012. – Vol. 10, № 6. – P. e2740.

98. Guidelines for validation of qualitative Real-Time PCR methods for molecular diagnostic identification of probiotics / H.R. Shehata, S. Ragupathy, D. Shanmughanandhan [et al.] // Journal of AOAC International. – 2019. – Vol. 102, № 6. – P. 1774-1778.

99. Heo, S. Food-derived coagulase-negative *Staphylococcus* as starter cultures for fermented foods / S. Heo, J.H. Lee, D.W. Jeong // Food Science and Biotechnology. – 2020. – Vol. 29, № 8. – P. 1023-1035.

100. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing in situ / J.H. Lee, E.R. Daugharthy, J. Scheiman [et al.] // Science. – 2014. – Vol. 343, № 6177. – P. 1360-1363.

101. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses / L. Quigley, O. O'Sullivan, T.P. Beresford [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 78, № 16. – P. 5717-5723.

102. Horiuchi, H. Short communication: Effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* / H. Horiuchi, Y. Sasaki // Journal of Dairy Science. – 2012. – Vol. 95. – P. 2904-2909.

103. Huang, C.H. Development of novel species specific primers for species identification of the *Lactobacillus casei* group based on RAPD fingerprints / C.H. Huang, F.L. Lee // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2009. – Vol. 89, № 11. – P. 1831-1837.

104. Identification and characterization of probiotics isolated from indigenous chicken (*Gallus domesticus*) of Nepal / M. Gupta, R. Raut, S. Manandhar [et al.] // PLoS One. – 2023. – Vol. 18, № 1. – P. e0280412.

105. Identification and evaluation of potential probiotics against skin-ulceration disease in the Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) / Z. Zuo, B. Shang, H. Liu [et al.] // Fish Shellfish Immunology. – 2023. – Vol. 137. – P. 108769.

106. Identification and quantification of viable *Lacticaseibacillus rhamnosus* in probiotics using validated PMA-qPCR method / L. Guo, X. Ze, H. Feng [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1341884.

107. Identification and selection of prospective probiotics for enhancing gastrointestinal digestion: application in pharmaceutical preparations and dietary supplements / C. Cappello, A.Z.A. Tlais, M. Acin-Albiac [et al.] // *Nutrients*. – 2023. – Vol. 15, № 6. – P. 1306.

108. Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations / F. Celandroni, A. Vecchione, A. Cara [et al.] // *PLoS One*. – 2019 – Vol. 14, № 5. – P. e0217021.

109. Identification of safe putative probiotics from various food products / K. Arellano, J. Lim, J.E.V. Bucheli [et al.] // *Folia Microbiologica*. – 2024. – Vol. 69, № 5. – P. 1053-1068.

110. Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salt tolerance / M. Kebouchi, W. Galia, M. Gena [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – Vol. 100. – P. 3667-3679.

111. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 / F. Dal Bello, C.I. Clarke, L.A. Ryan [et al.] // *Journal of Cereal Science*. – 2007. – Vol. 45. – P. 309-318.

112. In situ sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells / R. Ke, M. Mignardi, A. Pacureanu [et al.] // *Nature Methods*. – 2013. – Vol. 10, № 9. – P. 857-860.

113. In vitro evaluation of probiotic properties of two novel probiotic mixtures, consti-biome and sensi-biome / Y.J. Jang, B. Min, J.H. Lim [et al.] // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2023. – Vol. 33, № 9 – P. 1149-1161.

114. In vitro screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber / D. Zielińska, A. Rzepkowska, A. Radawska [et al.] // *Current Microbiology*. – 2015. – Vol. 70. – P. 183-194.

115. Influence of co-cultures of *Streptococcus thermophilus* and probiotic lactobacilli on quality and antioxidant capacity parameters of lactose-free fermented dairy beverages containing *Syzygium cumini* (L.) Skeels pulp / S.L.A. Garcia, G.M. da Silva, J.M.S. Medeiros [et al.] // RSC Advances. – 2020. – Vol. 10, № 17. – P. 10297-10308.

116. Influence of fermentation conditions (temperature and time) on the physicochemical properties and bacteria microbiota of amasi / M. Maleke, W. Doorsamy, A.M. Abrahams [et al.] // Fermentation. – 2022. – Vol. 8, № 2. – P. e57.

117. Influence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on post-acidification, metabolite formation and survival of starter bacteria in set-yoghurt / S. Settachaimongkon, H.J. van Valenberg, I. Gazi [et al.] // Food Microbiology. – 2016. – Vol. 59. – P. 14-22.

118. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk / S.N. Casarotti, D.A. Monteiro, M.M.S. Moretti [et al.] // Food Research International. – 2014. – Vol. 59. – P. 67-75.

119. Integrated molecular approaches for fermented food microbiome research / A.M. Walsh, J. Leech, C. Huttenhower [et al.] // FEMS Microbiology Reviews. – 2023. – Vol. 47, № 2. – P. fuad001.

120. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly / M.C. Collado, M. Derrien, E. Isolauri [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73. – P. 7767-7770.

121. Investigation of flavor-forming starter *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LDTM6802 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LDTM6803 in miniature gouda-type cheeses / H.W. Lee, I.S. Kim, B.J. Kil [et al.] // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2020. – Vol. 30, № 9. – P. 1404-1411.

122. Isolation and identification of potential probiotic bacteria from human milk / Q.S. Damaceno, B. Gallotti, I.M.M. Reis [et al.] // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2023. – Vol. 15, № 3. – P. 491-501.

123. Isolation, characterization and identification of antigenotoxic and anticancerous indigenous probiotics and their prophylactic potential in experimental colon carcinogenesis / D. Chandel, M. Sharma, V. Chawla [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 14769.

124. Jenkins, J.K. Genetic diversity in Swiss cheese starter cultures assessed by pulsed field gel electrophoresis and arbitrarily primed PCR / J.K. Jenkins, W.J. Harper, P.D. Courtney // *Letters in Applied Microbiology*. – 2002. – Vol. 35, № 5. – P. 423-427.

125. Katevatis, C. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase / C. Katevatis, A. Fan, C.M. Klapperich // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, №5. – P. 1-14.

126. Kefir: A symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities / F. Lopitz-Otsoa, A. Rementeria, N. Elguezabal [et al.] // *Revista Iberoamericana de Micología*. – 2006. – Vol. 23, № 2. – P. e67.

127. Kesavelu, D.Sr. Composition and laboratory correlation of commercial probiotics in India / D.Sr. Kesavelu, A. Rohit, I. Karunasagar // *Cureus*. – 2020. – Vol. 12, № 11. – P. e11334.

128. Khorshidian, N. Fermented milk: The most popular probiotic food carrier / N. Khorshidian, M. Yousefi, A.M. Mortazavian // *Advances in Food and Nutrition Research*. – 2020. – Vol. 94. – P. 91-114.

129. Kimchi and other widely consumed traditional fermented foods of Korea: A review / J.K. Patra, G. Das, S. Paramithiotis [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. e1493.

130. Knorr, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods / D. Knorr // *Trends in Food Science and Technology*. – 1998. – Vol. 9. – P. 295-306.

131. Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce / L. Siroli, F. Patrignani, D.I. Serrazanetti [et al.] // *Food Microbiology*. – 2015. – Vol. 47. – P. 74-84.

132. *Lactobacillus* strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species

identification and differentiation / G. Blaiotta, V. Fusco, D. Ercolini [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 74, № 1. – P. 208-215.

133. Lamm, K.W. Critical food safety issues facing the food industry: a delphi analysis / K.W. Lamm, N.L. Randall, F. Diez-Gonzalez // *Journal of Food Protection*. – 2021. – Vol. 84, № 4. – P. 680-687.

134. Langella, P. Next-generation probiotics: From commensal bacteria to novel drugs and food supplements / P. Langella, F. Guarner, R. Martín // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. e484614.

135. Laranjo, M. Role of starter cultures on the safety of fermented meat products / M. Laranjo, M.E. Potes, M. Elias // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1-11.

136. Laranjo, M. The use of starter cultures in traditional meat products / M. Laranjo, M. Elias, M.J. Fraqueza // *Journal of Food Quality*. – 2017. – Vol. 2017. – P. e9546026.

137. Lebeaux, D. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics / D. Lebeaux, J.M. Ghigo, C. Beloin // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2014. – Vol. 78, № 3. – P. 510-543.

138. Lee, J.Y. Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages / J.Y. Lee, C.J. Kim, B. Kunz // *Meat Science*. – 2006. – Vol. 2. – P. 437-445.

139. Leroy, F. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry / F. Leroy, L. De Vuyst // *Trends in Food Science & Technology*. – 2004. – Vol. 15. – P. 67-78.

140. Liu, Y. Probiotics in disease prevention and treatment / Y. Liu, D.Q. Tran, J.M. Rhoads // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 2018. – Vol. 58, № 10. – P. S164-S179.

141. Loman, N.J. Twenty years of bacterial genome sequencing / N.J. Loman, M.J. Pallen // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – Vol. 13, № 12. – P. 787-794.

142. Markowiak, P. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health / P. Markowiak, K. Śliżewska // *Nutrients*. – 2017. – Vol. 9, № 9. – P. e1021.

143. McCartney, A.L. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora / A.L. McCartney // *British Journal of Nutrition*. – 2002. – Vol. 88, № S1. – P. s29-s37.

144. Messens, W. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs – a review / W. Messens, V.L. De // *International Journal of Food Microbiology*. – 2002. – Vol. 72, № 1-2. – P. 31-43.

145. Metabolic cooperation and spatiotemporal niche partitioning in a kefir microbial community / S. Blasche, Y. Kim, R.A.T. Mars [et al.] // *Nature Microbiology*. – 2021. – Vol. 6, № 2. – P. 196-208.

146. Metabolic profiles of carbohydrates in *Streptococcus thermophilus* during pH-controlled batch fermentation / G. Liu, Y. Qiao, Y. Zhang [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. e1131.

147. Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food / G. Kergourlay, B. Taminiau, G. Daube [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2015. – Vol. 213. – P. 31-39.

148. Metataxonomic profiling of native and starter microbiota during ripening of gouda cheese made with *Listeria monocytogenes*-contaminated unpasteurized milk / J.K. Salazar, L.J. Gonsalves, M. Fay [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. e642789.

149. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation / J.Y. Jung, S.H. Lee, H.M. Jin [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2013. – Vol. 163, № 2-3. – P. 171-179.

150. Microbial bioinformatics for food safety and production / W. Alkema, J. Boekhorst, M. Wels [et al.] // *Briefings in Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 17, № 2. – P. 283-92.

151. Microbial control measures for soft ice cream in franchise brands: A comparative analysis of microbial analysis and manufacturing practices / J.M. Park,

J.M. Kim, J.W. Hong [et al.] // Food Science & Nutrition. – 2020. – Vol. 8, № 3. – P. 1583-1595.

152. Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir / A.M. Walsh, F. Crispie, K. Kilcawley [et al.] // mSystems. – 2016. – Vol. 1, № 5. – P. e00052-16.

153. Microbiological evaluation of commercial probiotic products available in the USA in 2009 / L. Drago, V. Rodighiero, T. Celeste [et al.] // Journal of Chemotherapy. – 2010. – Vol. 22. – P. 373-377.

154. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis / V. Delcenserie, B. Taminiau, L. Delhalle [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2014. – Vol. 97, № 10. – P. 6046-6056.

155. Miles, S. Investigating specific concerns about different food hazards / S. Miles, L.J. Frewer // Food Quality and Preference. – 2001. – Vol. 12, № 1. – P. 47-61.

156. Moisan, M. Multilocus sequence typing scheme for the characterization of 936-like phages infecting *Lactococcus lactis* / M. Moisan, S. Moineau // Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 78, № 13. – P. 4646-4653.

157. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria / D. Mohania, R. Nagpal, M. Kumar [et al.] // Journal of Digestive Diseases. – 2008. – Vol. 9, № 4. – P. 190-198.

158. Molecular identification and phylogenetic analysis of GABA-producing lactic acid bacteria isolated from indigenous dadih of West Sumatera, Indonesia / L. Anggraini, Y. Marlida, W. Wizna [et al.] // F1000Res. – 2018. – Vol. 7. – P. 1663.

159. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli / D. Roy, P. Ward, D. Vincent [et al.] // Current Microbiology. – 2000. – Vol. 40. – P. 40-46.

160. Molecular routes to specific identification of the *Lactobacillus casei* group at the species, subspecies and strain level / P. Jarocki, E. Komoń-Janczara, A. Glibowska [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, № 8. – P. e2694.

161. Monitoring of antibiotic-induced alterations in the human intestinal microflora and detection of probiotic strains by use of terminal restriction fragment

length polymorphism / C. Jernberg, A. Sullivan, C. Edlund [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71, № 1. – P. 501-506.

162. Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods / F.J. Cousin, R. Le Guellec, V. Chuat [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2019. – Vol. 291. – P. 17-24.

163. Nejati, F. A big world in small grain: a review of natural milk kefir starters / F. Nejati, S. Junne, P. Neubauer [et al.] // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8, № 2. – P. e192.

164. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money / A.T. Vincent, N. Derome, B. Boyle [et al.] // Journal of Microbiological Methods. – 2017. – Vol. 138. – P. 60-71.

165. Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of *Lactococcus* species / T. Odamaki, S. Yonezawa, M. Kitahara [et al.] // Letters in Applied Microbiology. – 2011. – Vol. 52. – P. 491-496.

166. Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects / D. O'Sullivan, L. Giblin, P. McSweeney [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2013. – Vol. 4. – P. e1.

167. Pan-genomic and transcriptomic analyses of *Leuconostoc mesenteroides* provide insights into its genomic and metabolic features and roles in kimchi fermentation / B.H. Chun, K.H. Kim, H.H. Jeon [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. e11504.

168. Patrone, V. Microbiological and molecular characterization of commercially available probiotics containing *Bacillus clausii* from India and Pakistan / V. Patrone, P. Molinari, L. Morelli // International Journal of Food Microbiology. – 2016. – Vol. 237. – P. 92-97.

169. Performance of high-throughput DNA quantification methods / K.A. Haque, R.M. Pfeiffer, M.B. Beerman [et al.] // BMC Biotechnology. – 2003. – Vol. 3. – P. 20-24.

170. Physicochemical, textural and volatile characteristics of fermented milk co-cultured with *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* or

Lactobacillus plantarum / S.N. Li, S. Tang, Q. He [et al.] // International Journal of Food Science and Technology. – 2019. – Vol. 55. – P. 461-474.

171. Practical value of food pathogen traceability through building a whole-genome sequencing network and database / M.W. Allard, E. Strain, D. Melka [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2016. – Vol. 54, № 8. – P. 1975-1983.

172. Present and pioneer methods of early detection of food borne pathogens / G. Vidyadharani, H.K. Vijaya Bhavadharani, P. Sathishnath [et al.] // Journal of Food Science and Technology. – 2022. – Vol. 59, № 6. – P. 2087-2107.

173. Probiotic intervention as a potential therapeutic for managing gestational disorders and improving pregnancy outcomes / A. Abbasi, A. Aghebati-Maleki, M. Yousefi [et al.] // Journal of Reproductive Immunology. – 2021. – Vol. 143. – P. e103244.

174. Probiotics and postbiotics as substitutes of antibiotics in farm animals: A review / D. Zamojska, A. Nowak, I. Nowak [et al.] // Animals. – 2021. – Vol. 11. – P. e3431.

175. Probiotics and their quality-related concerns: highlights from the saudi arabian market / F.S. Aldawsari, B.S. Bin Helel, Y.M. Al Shehry [et al.] // Therapeutic Innovation & Regulatory Science. – 2020. – Vol. 54, № 2. – P. 365-369.

176. Probiotics as potential detoxification tools for mitigation of pesticides: a mini review / M. Mohammadi, M. Shadnoush, S. Sohrabvandi [et al.] // International Journal of Food Science & Technology. – 2021. – Vol. 56, № 5. – P. 2078-2087.

177. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value / A. Terpou, A. Papadaki, I.K. Lappa [et al.] // Nutrients. – 2019. – Vol. 11, № 7. – P. e1591.

178. Production of characteristic volatile markers and their relation to *Staphylococcus aureus* growth status in pork / K. Hu, X. Yu, J. Chen [et al.] // Meat Science. – 2020. – Vol. 160. – P. 107956.

179. Progress in microencapsulation of probiotics: A review / M. Yao, J. Xie, H. Du [et al.] // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2020. – Vol. 19, № 2. – P. 857-874.

180. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B / P. Lavermicocca, F. Valerio, A. Evidente [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66. – P. 4084-4090.

181. Radke-Mitchell, L.Y.N. Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: a review / L.Y.N. Radke-Mitchell, W.E. Sandine // Journal of Food Protection. – 1984. – Vol. 47, № 3. – P. 245-248.

182. Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian pregnant women and school children / J.E. Bisanz, M.K. Enos, J.R. Mwanga [et al.] // MBio. – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. e01580-14.

183. Rapid detection of *Staphylococcal thermonuclease* on casings of naturally contaminated fermented sausages / B.S. Emswiler-Rose, R.W. Johnston, M.E. Harris, [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 1980. – Vol. 40. – P. 13-18.

184. Rapid DNA fingerprinting of pathogens by flow cytometry / E.J. Larson, J.R. Hakovirta, H. Cai [et al.] // Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology. – 2000. – Vol. 41, № 3. – P. 203-208.

185. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from *16S rRNA* through *23S rRNA* / H.S. Kwon, E.H. Yang, S.W. Yeon [et al.] // FEMS Microbiology Letters. – 2004. – Vol. 239, № 2. – P. 267-275.

186. Reference databases for taxonomic assignment in metagenomics / M. Santamaria, B. Fosso, A. Consiglio [et al.] // Briefings in Bioinformatics. – 2012. – Vol. 13, № 6. – P. 682-695.

187. Riesute, R. Effect of yeasts on food quality and safety and possibilities of their inhibition / R. Riesute // Trends in Food Science and Technology. – 2021. – Vol. 108. – P. 1-10.

188. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases / S.K. Kim, R.B. Guevarra, Y.T. Kim [et al.] // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 29, № 9. – P. 1335-1340.
189. Romano, P. Starter cultures in food production / P. Romano, A. Capece. – West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. – P. 255-282.
190. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1977. – Vol. 74, № 12. – P. 5463-5467.
191. Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods / I. Franciosa, V. Alessandria, P. Dolci [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2018. – Vol. 279. – P. 26-32.
192. Shah, N.P. Bacteria, beneficial: *Bifidobacterium* spp.: morphology and physiology / N.P. Shah // *Encyclopedia of Dairy Sciences*. – 2002. – P. 24-31.
193. Sharma, A. Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review / A. Sharma, S. Lee, Y.S. Park // *Food Science and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 29, № 10. – P. 1301-1318.
194. Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments / A. Rimola, D. Costa, M. Sodupe [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2013. – Vol. 113. – P. 4216-4313.
195. Single-stranded DNA library preparation from highly degraded DNA using T4 DNA ligase / M.T. Gansauge, T. Gerber, I. Glocke [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2017. – Vol. 45, № 10. – P. 79-84.
196. Soomro, A.H. Selection of yoghurt starter culture from indigenous isolates of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp.bulgaricus on the basis of technological properties / A.H. Soomro, T. Masud // *Annals of Microbiology*. – 2008. – Vol. 58. – P. 67-71.
197. Spotlight on the compositional quality of probiotic formulations marketed worldwide / D. Mazzantini, M. Calvigioni, F. Celandroni [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. e693973.

198. Standardization and quality management in next-generation sequencing / C. Endrullat, J. Glökler, P. Franke [et al.] // *Applied & Translational Genomics*. – 2016. – Vol. 10. – P. 2-9.
199. Starter cultures for kimchi fermentation / M.E. Lee, J.Y. Jang, J.H. Lee [et al.] // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 25, № 5. – P. 559-568.
200. Strategy for the recovery of raw ewe's milk microbial diversity to develop natural starter cultures for traditional foods / L. Chessa, A. Paba, I. Dupré [et al.] // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11, № 4. – P. e823.
201. Suvorov, A. What is wrong with Enterococcal probiotics? / A. Suvorov // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. – 2020. – Vol. 12, № 1. – P. 1-4.
202. Szutowska, J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: A systematic literature review / J. Szutowska // *European Food Research and Technology*. – 2020. – Vol. 246. – P. 357-372.
203. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition / W.H. Holzapfel, P. Haberer, R. Geisen [et al.] // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2001. – 73, № 2. – P. 365S-373S.
204. The forgotten role of food cultures / F. Bourdichon, E. Arias, A. Babuchowski [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2021. – Vol. 368, № 14. – P. fnab085.
205. The genomic basis of the *Streptococcus thermophilus* health-promoting properties / E. Roux, A. Nicolas, F. Valence [et al.] // *BMC Genomics*. – 2022. – Vol. 23. – P. 210.
206. The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods / M.L. Marco, M.E. Sanders, M. Gänzle [et al.] // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2021. – Vol. 18, № 3. – P. 196-208.
207. The many faces of kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety / M.A. Farag, S.A. Jomaa, A.A. El-Wahed [et al.] // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12. – P. e346.

208. The mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract / M. Derrien, M.C. Collado, K. Ben-Amor [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 74. – P. 1646-1648.

209. The potential impact of probiotics on the gut microbiome of athletes / L. Wosinska, P.D. Cotter, O. O'Sullivan [et al.] // Nutrients. – 2019. – Vol. 11, № 10. – P. e2270.

210. The role of *Akkermansia muciniphila* in obesity, diabetes and atherosclerosis / A. Hasani, S. Ebrahimzadeh, F. Hemmati [et al.] // Journal of Medical Microbiology. – 2021. – Vol. 70.

211. The sequence of the human genome / J.C. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers [et al.] // Science. – 2001. – Vol. 291, № 5507. – P. 1304-1351.

212. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools / C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2013. – Vol. 41, № 1. – P. 590-596.

213. The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice / B. Jagadeesan, P. Gerner-Smidt, M.W. Allard [et al.] // Food Microbiology. – 2019. – Vol. 79. – P. 96-115.

214. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C / D.M. Saccaro, A.Y. Tamime, A.L. Pilleggi [et al.] // International Journal of Dairy Technology. – 2009. – Vol. 62. – P. 397-404.

215. Three types of beetroot products enriched with lactic acid bacteria / V. Barbu, M. Cotârleț, C.A. Bolea [et al.] // Foods. – 2020. – Vol. 9. – P. e786.

216. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus* / S.R. Herbel, W. Vahjen, L.H. Wieler [et al.] // Gut Pathogens. – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. e27.

217. Tufarelli, V. An overview on the functional food concept: prospectives and applied researches in probiotics, prebiotics and synbiotics / V. Tufarelli, V. Laudadio // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. – 2016. – Vol. 4. – P. 274-278.

218. Turrone, F. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium* / F. Turrone, D. van Sinderen, M. Ventura // International Journal of Food Microbiology. – 2011. – Vol. 149, № 1. – P. 37-44.

219. Unlocking the Potential of probiotics: a comprehensive review on research, production, and regulation of probiotics / T.F. da Silva, R.A. Glória, M.F. Americo [et al.] // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2024. – Vol. 16, № 5. – P. 1687-1723.

220. Use of whole-genome sequencing for food safety and public health in the united states / E. Brown, U. Dessai, S. McGarry [et al.] // Foodborne Pathogens and Disease. – 2019. – Vol. 16, № 7. – P. 441-450.

221. Valik, L. Growth of *Staphylococcus aureus* in pasta in relation to its water activity / L. Valik, F. Görner // International Journal of Food Microbiology. – 1993. – Vol. 20, № 1. – P. 45-48.

222. Van den Nieuwboer, M. Dealing with the remaining controversies of probiotic safety / M. Van den Nieuwboer, E. Claassen // Beneficial Microbes. – 2019. – Vol. 10, № 6. – P. 605-616.

223. Ventura, M. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis / M. Ventura, R. Zink // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – Vol. 217, № 2. – P. 141-154.

224. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* in orange juice fortified with nettle (*Urtica dioica* L.) and bioactive properties of the juice during storage / I.Y. Sengun, A. Kirmizigul, K. Atlama [et al.] // LWT – Food Science and Technology. – 2020. – Vol. 118. – P. e108707.

225. Vinderola, C.G. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products / C.G. Vinderola, P. Mocchiutti, J.A. Reinheimer // Journal of Dairy Science. – 2002. – Vol. 85. – P. 721-729.

226. Viruses in fermented foods: are they good or bad? Two sides of the same coin / B.L. Maske, G.V. de Melo Pereira, A. da Silva Vale [et al.] // Food Microbiology. – 2021. – Vol. 98. – P. e103794.

227. *Weizmannia coagulans* BCF-01: a novel gastrogenic probiotic for *Helicobacter pylori* infection control / Z. Chen, Z. Tang, W. Li [et al.] // *Gut Microbes*. – 2024. – Vol. 16, № 1. – P. 2313770.
228. Widyastuti, Y. Health-promoting properties of lactobacilli in fermented dairy products / Y. Widyastuti, A. Febrisiantosa, F. Tidona // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. e673890.
229. Willett, W.C. Milk and health / W.C. Willett, D.S. Ludwig // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382, № 7. – P. 644-654.
230. Williams, N.T. Probiotics / N.T. Williams // *The American Journal of Health-System Pharmacy*. – 2010. – Vol. 67, № 6. – P. 449-458.
231. Yadav, P. Content analysis of commercially available probiotics / P. Yadav, P. Sharma, R. Arora // *Indian Pediatrics*. – 2018. – Vol. 55, № 4. – P. 344-345.
232. Yadav, R. An overview of advanced technologies for selection of probiotics and their expediency: A review / R. Yadav, P. Shukla // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2017. – Vol. 57, № 15. – P. 3233-3242.
233. Zaib, S. Probiotics and their beneficial health effects / S. Zaib, A. Hayat, I. Khan // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2024. – Vol. 24, № 1. – P. 110-125.
234. Zawistowska-Rojek, A. Microbiological testing of probiotic preparations / A. Zawistowska-Rojek, T. Zaręba, S. Tyski // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2022. – Vol. 19, № 9. – P. e5701.
235. Zhang, J. Identification of a new probiotic strain, *Lactiplantibacillus plantarum* VHProbi® V38, and its use as an oral health agent / J. Zhang, Z. Duan // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13 – P. 1000309.
236. Zhang, Y. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series / Y. Zhang, P.S. Cremer // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2006. – Vol. 10, № 6. – P. 658-663.
237. Zommiti, M. Update of probiotics in human world: a nonstop source of benefactions till the end of time / M. Zommiti, M.G.J. Feuilloley, N. Connil // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8, № 12. – P. e1907.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Патент на изобретение

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2842962

Способ идентификации значимых для пищевой промышленности представителей рода *Lactobacillus* - *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosum*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus* и *L. brevis* на основе рестрикционного анализа гена 16S рРНК

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Воронежский государственный университет инженерных технологий" (ФГБОУ ВО "ВГУИТ") (RU)*

Авторы: *Нестерова Екатерина Юрьевна (RU), Гладких Мария Ивановна (RU), Сыромятников Михаил Юрьевич (RU), Крюкова Ольга Николаевна (RU), Корнеева Ольга Сергеевна (RU)*

Заявка № 2024134906

Приоритет изобретения 21 ноября 2024 г.

Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 04 июля 2025 г.

Срок действия исключительного права на изобретение истекает 21 ноября 2044 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

Сертификат: 0692e761e6390f8f542e01670d0cc2026
Владелец: **Зубов Юлий Сергеевич**
Действителен с 10.07.2024 по 03.10.2025

Ю.С. Зубов



Патент на изобретение – 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 рРНК