

ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА СТАРТОВЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ 16S рРНК

© 2022 г. М. Ю. Сыромятников^{1, 2, *}, О. С. Корнеева³, Е. Ю. Нестерова^{1, 2},
М. И. Гладких¹, Е. С. Попов¹, В. Н. Попов^{1, 2}

¹Лаборатория метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, 394036 Россия

²Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Воронеж, 394018 Россия

³Кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, 394036 Россия

*e-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 02.09.2021 г.

После доработки 28.09.2021 г.

Принята к публикации 21.11.2021 г.

Для изготовления кисломолочных продуктов используют заквасочные культуры молочнокислых бактерий и некоторых других микроорганизмов. Для оценки коммерчески доступных стартовых культур (заквасок для кефира, йогурта, ряженки, наринэ и других ферментированных молочных продуктов) использован метод высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК. Из 22 изученных образцов фактический состав только 8 заквасок соответствовал указанному производителями. Бактериальный состав 63% образцов заквасочных культур отличался от заявленного. Установлено, что коммерчески доступные заквасочные культуры микроорганизмов могут либо не содержать заявленных таксонов бактерий, либо иметь таксоны бактерий, не указанные производителем. Показано, что количественное соотношение бактерий в заквасочных культурах может сильно варьировать. На основании соотношения прочтений гена 16S рРНК, полученных в ходе секвенирования, род *Streptococcus* значительно преобладал (более 70% всех бактерий в составе исследованных заквасок, которые содержали не менее 3 родов бактерий) над другими родами бактерий, обнаруженными в 6 образцах. Кроме того, ряд образцов содержал меньшее количество бактерий рода *Bifidobacterium* по сравнению с бактериями других родов. Так, относительное содержание *Bifidobacterium* было ниже 20% в 4 заквасках для приготовления йогуртов и ферментированных молочных продуктов, чей состав характеризовался наличием не менее 3 родов бактерий. Заквасочные культуры бактерий, отличающиеся по своему составу от заявленного производителем, могут привести к изменению свойств кисломолочных продуктов, приготовленных с использованием этих культур.

Ключевые слова: кисломолочные продукты, заквасочные культуры, молочнокислые бактерии, высокопроизводительное секвенирование, бактериальный состав, контроль качества

DOI: 10.56304/S0234275822010082

Кисломолочные продукты относятся к важнейшим источникам многих питательных веществ [1]. Бактерии, связанные с этими продуктами, принадлежат к таким родам как *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* и *Bifidobacterium* [2]. Молочная кислота – нелетучее соединение без запаха с нейтральным вкладом в развитие аромата при молочной ферментации [3]. Для приготовления кисломолочных продуктов исполь-

зуют стартовые культуры микроорганизмов. Критерии выбора заквасок должны учитывать сырье, свойства штамма, требования безопасности пищевых продуктов и характеристики качества [4]. Выбор пищевых культур предполагает системный подход, состоящий из нескольких этапов. Он включает оценку стрессоустойчивости, выработку основных метаболитов, безопасность и оценку технологических параметров [5]. Молочные белки, в частности казеины, выполняют функцию предшественников аромата, например для *Lactobacillus*, используемых в производстве сыра и йогурта [6]. Молочнокис-

Сокращения: ОТЕ – операционная таксономическая единица.

лые бактерии обладают несколькими функциональными характеристиками, такими как антимикробное, антиканцерогенное, антидепрессивное, антиоксидантное действия и снижающая уровень холестерина активность [7–9]. Среди них виды *Lactobacillus*, такие как *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactococcus lactis*, наиболее широко распространены в промышленности [10–12].

Для приготовления кисломолочных продуктов используют стартовые культуры молочнокислых бактерий, включая *Bifidobacteria* spp., поскольку исторически бактерии рода *Bifidobacterium* входят в группу молочнокислых бактерий [13]. В настоящее время для микробиологического контроля качества кисломолочных продуктов используют микробиологические методы, которые основаны на посеве на питательные среды с последующей оценкой выросших колоний. Недостатками такого подхода являются длительность анализа и возможность проверки качества только на целевые микроорганизмы из-за использования специализированных и селективных питательных сред.

Ранее показано, что высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена 16S рРНК может быть эффективным инструментом в оценке микробиологического состава пищевых продуктов [14–16], в том числе при анализе кисломолочных продуктов [17–20]. К преимуществам высокопроизводительного секвенирования относится возможность анализировать пищевой продукт сразу на все таксоны бактерий, что невозможно сделать классическими микробиологическими методами. Относительную обильность бактерий обычно оценивают в виде числа копий гена 16S рРНК [21–23]. Заметим, что до настоящего момента этот метод не использовали для оценки стартовых культур микроорганизмов для приготовления кисломолочных продуктов.

Целью работы был анализ коммерчески доступных на территории России стартовых культур для приготовления кисломолочных продуктов с помощью высокопроизводительного секвенирования.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Образцы

Объектом исследования служили сухие коммерчески доступные закваски для приготовления кисломолочных продуктов (табл. 1). Для последующего выделения ДНК в стерильных условиях отбирали 500 мг образца.

Выделение ДНК

ДНК экстрагировали с помощью набора FastDNA™ Spin Kit (MP Biomedicals, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Высокопроизводительное секвенирование

Библиотеки готовили с помощью ПЦР с использованием универсальных праймеров к области V4 гена 16S рРНК, в соответствии с ранее описанной методикой [24]. Использованы следующие пары праймеров: 515F (5'-GTGBCAG-CMGCCGCGGTAA-3') [25] и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTTMTCTAATCC-3') [26], где В = С/Г/Т; М = А/С; N = А/С/Т/Г; V = А/С/Г. Для каждого образца ДНК готовили две библиотеки, которые секвенировали параллельно с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 циклов) MS-103-1002 (Illumina, США) на секвенаторе MiSeq (Illumina), позволяющем считывать 150 п.н. с каждого конца. После секвенирования на выходе получали файлы fastq, содержащие информацию о последовательностях анализируемых участков гена 16S рРНК, а также 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 (если имелись последовательности с четырьмя и более подряд нуклеотидами с показателями качества $Q < 15$), распределением считываний на основе последовательностей штрих-кода и удалении технических последовательностей (включая последовательности праймеров для гена 16S рРНК), было получено распределение последовательностей по операционным таксономическим единицам (ОТЕ) на основе их сходства более 97%. Все манипуляции проводили с помощью соответствующих скриптов программного обеспечения QIIME [27]. Полученные ОТЕ биоинформатически идентифицировали с помощью SILVAngs 1.3 [28].

Исходные нуклеотидные последовательности доступны в NCBI BioProject (Acc.No. PRJNA727452).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качественный анализ бактериального состава заквасок

В результате проведенного высокопроизводительного секвенирования идентифицированы роды бактерий, которые содержались в анализируемых образцах кисломолочных заквасок. В табл. 2 представлен анализ соответствия заявленного бактериального состава заквасок фактическому (относительное содержание указанных таксонов бактерий составляло не менее 1% от всех идентифицированных таксонов бактерий в образце).

Из 22 образцов для восьми (№№ 1, 7, 10, 13, 14, 16, 17 и 21) содержание бактерий, указанное производителем, соответствовало реальному составу. Однако бактериальный состав 63% образцов заквасок отличался от заявленного. Так, в составе образцов №№ 19, 20 и 22 не обнаружено бактерий рода *Streptococcus*, заявленного производи-

Таблица 1. Анализируемые образцы
Table 1. Analyzed samples

Образец	Бактериальный состав*	Страна, город производства	Продукт
Закваска № 1	<i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>	Россия, Москва	Закваска для греческого йогурта
Закваска № 2	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Streptococcus thermophilus</i>	Россия, Москва	Закваска для кефира
Закваска № 3	<i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Болгария, София	Закваска для йогурта
Закваска № 4	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Россия, Москва	Закваска для кефира
Закваска № 5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Болгария, Баня	Закваска для кефира
Закваска № 6	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Leuconostoc</i> sp.	Россия, Санкт-Петербург	Закваска для кефира
Закваска № 7	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Россия, Санкт-Петербург	Закваска для наринэ
Закваска № 8	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Болгария, София	Закваска для биойогурта
Закваска № 9	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i>	Россия, Санкт-Петербург	Закваска для биойогурта
Закваска № 10	<i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Болгария, София	Закваска для йогурта
Закваска № 11	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Россия, Санкт-Петербург	Закваска для йогурта
Закваска № 12	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i>	Россия, Санкт-Петербург	Закваска для йогурта

Таблица 1. Продолжение

Образец	Бактериальный состав*	Страна, город производства	Продукт
Закваска № 13	<i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> (2 штамма), <i>Bifidobacterium lactis</i> (2 штамма), <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>	Россия, Москва	Закваска для пробиогурта
Закваска № 14	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Россия, Санкт-Петербург	Закваска для ряженки
Закваска № 15	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophiles</i>	Италия, Монтеротондо	Закваска для йогурта
Закваска № 16	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Россия, Углич	Закваска для ферментированной молочной продукции
Закваска № 17	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i>	Россия, Санкт-Петербург	Закваска для йогурта
Закваска № 18	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactobacillus kefir candida kefir</i>	Россия, Москва	Закваска для кефира
Закваска № 19	<i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>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>	Россия, Углич	Закваска для ферментированных молочных продуктов
Закваска № 20	<i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Россия, Углич	Закваска для ферментированных молочных продуктов

Таблица 1. Окончание

Образец	Бактериальный состав*	Страна, город производства	Продукт
Закваска № 21	<i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Россия, Углич	Закваска для ферментированных молочных продуктов
Закваска № 22	<i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Россия, Углич	Закваска для ферментированных молочных продуктов

* *Примечание:* Заявленный производителем состав.

* *Note:* The composition declared by the manufacturer.

телем. Аналогичная ситуация выявлена в образцах №№ 3, 8, 9, 12 и 15 (в их составе отсутствовали бактерии рода *Bifidobacterium*), 2 и 5 (нет рода *Leuconostoc*), 11 и 18 (нет рода *Lactobacillus*). Образцы №№ 4 и 6, несмотря на соответствие состава указанному на упаковке, содержали посторонние бактерии (род *Streptococcus*).

Необходимо отметить, что для 27% всех образцов характерно наличие в составе дополнительных, не указанных производителем продукции микроорганизмов. Это образцы заквасок №№ 3, 4, 5, 6, 8 и 18. Как правило, это представители родов *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*. Однако для образца закваски № 5 этот список оказался шире. Помимо *Streptococcus* и *Enterococcus*, он включал

представителей таких родов как *Lactobacillus*, *Thermus*, *Acinetobacter*, а также *Anoxybacillus*.

Количественный анализ бактериального состава заквасок

В некоторых образцах заквасок выявлены значительные количества не заявленных производителем родов бактерий. Так, по результатам секвенирования фрагментов гена 16S рРНК, в образце закваски № 4, помимо заявленных и идентифицированных родов *Leuconostoc* и *Lactococcus*, 47,5% всех прочтений приходилось на представителей рода *Streptococcus* (рис. 1).

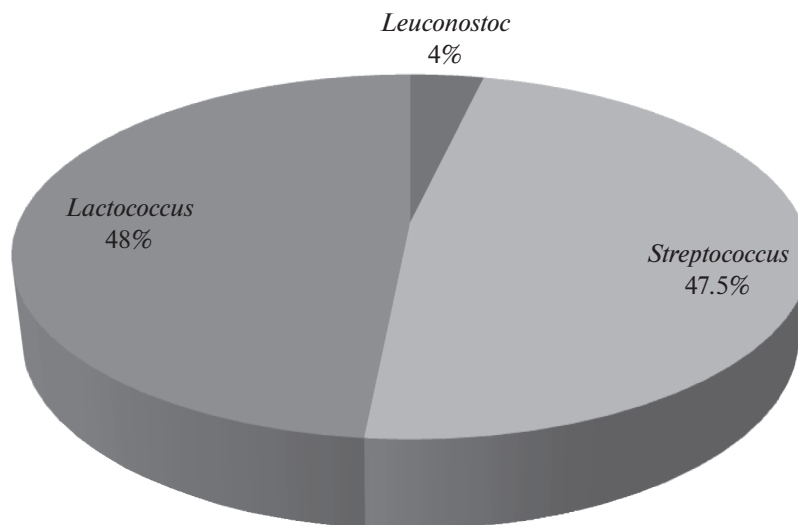


Рис. 1. Распределение таксонов бактерий в закваске № 4 на основании соотношения полученных в ходе секвенирования прочтений нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК для идентифицированных ОТЕ.

Fig. 1. Distribution of bacterial genera in the starter culture No. 4 based on the ratio of nucleotide sequences of the 16S rRNA gene fragment obtained during sequencing for the identified OTUs.

Таблица 2. Заявленные и фактически идентифицированные роды бактерий
Table 2. Declared and actually identified bacterial genus

Образец	Род бактерий		Посторонние микроорганизмы
	заявленный	идентифицированный	
1	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	Отсутствуют
2	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i> Отсутствует <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>	Отсутствуют
3	<i>Streptococcus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i> Отсутствует <i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>
4	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>
5	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i>	<i>Lactococcus</i> Отсутствует	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Thermus</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Anoxybacillus</i> <i>Enterococcus</i>
6	<i>Lactococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>
7	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	Отсутствуют
8	<i>Bifidobacterium</i> <i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	Отсутствует <i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>
9	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> Отсутствует	Отсутствуют
10	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	Отсутствуют
11	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i> Отсутствует	Отсутствуют
12	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> Отсутствует	Отсутствуют
13	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	Отсутствуют

Таблица 2. Окончание

Образец	Род бактерий		Посторонние микроорганизмы
	заявленный	идентифицированный	
14	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	Отсутствуют
15	<i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i> Отсутствует <i>Streptococcus</i>	Отсутствуют
16	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	Отсутствуют
17	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	Отсутствуют
18	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> Отсутствует	<i>Streptococcus</i>
19	<i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus</i>	Отсутствует <i>Lactococcus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus</i>	Отсутствуют
20	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i>	Отсутствует <i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i>	Отсутствуют
21	<i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	Отсутствуют
22	<i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Bifidobacterium</i>	Отсутствует <i>Lactococcus</i> <i>Bifidobacterium</i>	Отсутствуют

В составе закваски № 6 также идентифицированы бактерии рода *Streptococcus*, но в гораздо меньшем соотношении (2.5% от общего числа прочтений гена 16S рНК). В этом образце 89.5% прочтений нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рНК приходилось на представителей рода *Lactococcus*, 7.0% – на *Lactobacillus* и 1.0% – на *Leuconostoc*, каждый из которых был заявлен производителем в бактериальном составе закваски № 6 (рис. 2).

Содержание закваски № 5 значительно отличалось от состава, представленного производителем продукта. Так, в составе заявлено наличие двух штаммов: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, – а также *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Однако на основании соотношения прочтений нуклеотидных последователь-

ностей фрагмента гена 16S рНК выявлено отсутствие в закваске видов рода *Leuconostoc*, а процентное содержание видов рода *Lactococcus* составило лишь 10.5% от общего числа видов. Таким образом, в образце № 5 порядка 90% прочтений приходилось на виды, которые не указаны производителем в перечне ингредиентов. Содержание представителей рода *Streptococcus* составило 72.5%, *Lactobacillus* – 7.5%, *Thermus* – 1.0%, *Acinetobacter* – 2.0%, *Anoxybacillus* – 1% и *Enterococcus* – 2.5% (рис. 3).

В целом, в основной состав (>99% всех родов бактерий) всех заквасок входили молочнокислые бактерии (табл. 3).

Можно отметить, что такие роды, как *Leuconostoc* и *Bifidobacterium*, встречались реже других. Их относительная обильность (на основании

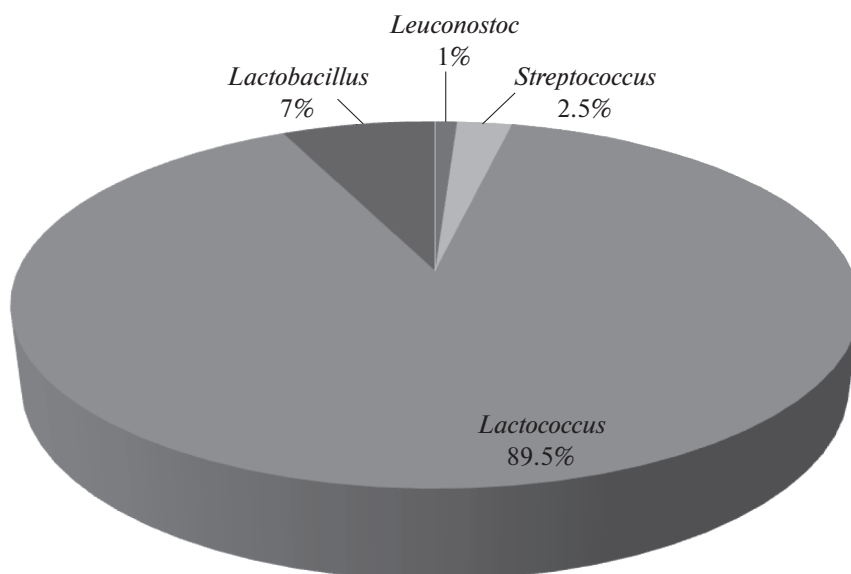


Рис. 2. Распределение таксонов бактерий в закваске № 6 на основании соотношения полученных в ходе секвенирования прочтений нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК для идентифицированных ОТЕ.
Fig. 2. Distribution of bacterial genera in the starter culture No. 6 based on the ratio of nucleotide sequences of the 16S rRNA gene fragment obtained during sequencing for the identified OTUs.

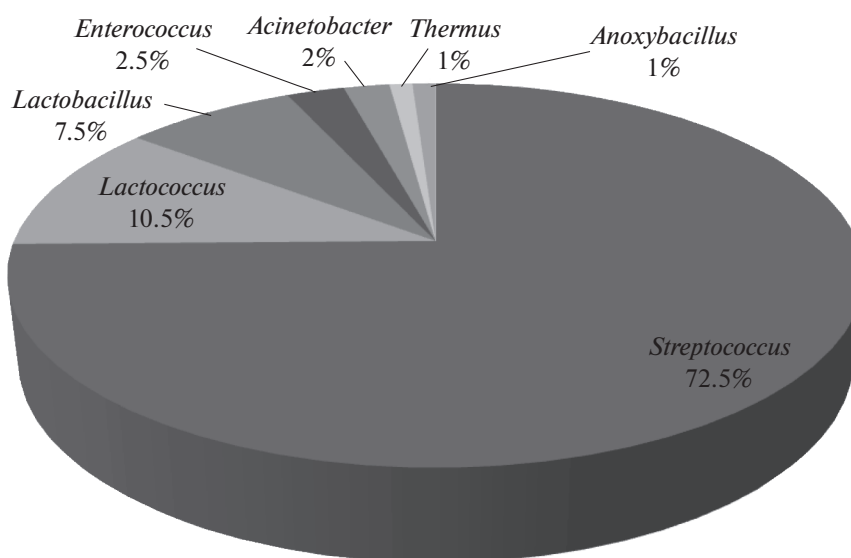


Рис. 3. Распределение таксонов бактерий в закваске № 5 на основании соотношения полученных в ходе секвенирования прочтений нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК для идентифицированных ОТЕ.
Fig. 3 Distribution of bacterial genera in the starter culture No. 5 based on the ratio of nucleotide sequences of the 16S rRNA gene fragment obtained during sequencing for the identified OTUs.

полученных прочтений нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК) в образцах №№ 1, 13, 17, 19 и 22 для *Bifidobacterium* и в №№ 4, 6 и 18 для *Leuconostoc* не превышала 20%.

Наиболее часто встречающимся родом бактерий был *Streptococcus* – представители этого рода обнаружены в 17 из 22 образцов. В составе 40% заквасок содержание *Streptococcus*, по данным

Таблица 3. Роды бактерий, наиболее представленные в исследованных заквасках, на основании данных высокопроизводительного секвенирования**Table 3.** The most abundant bacteria genera in the starter cultures based on high-throughput sequencing data

Образец	Род бактерий, %				
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>
1	18.5	31.0	—	—	50.5
2	—	2.0	65.5	—	31.5
3	—	17.5	—	—	73.5
4	—	—	48.0	3.5	47.5
5	—	7.5	10.5	—	72.5
6	—	7.0	89.5	1.0	2.5
7	—	66.0	—	—	33.5
8	—	16.5	—	—	78.0
9	—	—	—	—	99.5
10	—	20.0	—	—	79.0
11	—	—	—	—	99.0
12	—	1.0	—	—	98.0
13	9.5	22.0	—	—	68.5
14	—	—	—	—	99.0
15	—	4.5	—	—	94.5
16	—	99.5	—	—	—
17	10.0	79.5	—	—	10.0
18	—	—	87.5	1.0	10.0
19	3.5	14.0	81.5	—	—
20	—	4.5	94.5	—	—
21	—	28.5	68.0	—	1.0
22	9.0	—	89.0	—	—

секвенирования, превышало 70% от общего числа бактерий.

Относительная обильность родов *Lactobacillus* и *Lactococcus*, на основании данных секвенирования, в исследованных образцах заквасок варьировала в широком диапазоне. Из 16 заквасок в 10 содержание *Lactobacillus* не превышало 20%, в четырех — 70%, а в двух было более 71%. Представители рода *Lactococcus* обнаружены в 9 образцах. В пяти из девяти заквасок относительная обильность *Lactococcus* превышала 70%.

В проведенном исследовании мы применили метод высокопроизводительного секвенирования для анализа бактериального состава коммерчески доступных стартовых культур микроорганизмов, предназначенных для приготовления кисломолочных продуктов. К главным преимуществам этого метода относится возможность

проводить анализ сразу на все таксоны бактерий, а не только на целевые группы, как это происходит при классическом микробиологическом анализе. Кроме того, по соотношению прочтений гена 16S рРНК в ходе секвенирования можно судить о соотношении различных таксонов бактерий в образце. Необходимо отметить, что у этого подхода имеются и недостатки. Так, число копий гена 16S рРНК может варьировать между различными таксонами бактерий, что приводит к искажению реального паттерна их содержания в образце [29–31]. Кроме того, важно иметь в виду, что метод секвенирования не позволяет оценивать жизнеспособность бактериальных клеток, так как выявляет только геномную ДНК, которая присутствует не только в живых, но и в мертвых клетках.

Показано, что коммерчески доступные стартовые культуры микроорганизмов иногда либо не

содержат заявленные производителем таксоны бактерий, либо несут неуказанные микроорганизмы. Несмотря на то, что среди не заявленных производителем таксонов бактерий нами не идентифицированы опасные микроорганизмы (в большинстве случаев это молочнокислые бактерии), наличие дополнительных родов бактерий может привести к изменению свойств кисломолочных продуктов, которые готовят на основе стартовых культур. Отсутствие указанных производителем таксонов бактерий может приводить к снижению качества и полезных свойств кисломолочных продуктов. Свойства ферментированного молока зависят от метаболической активности бактерий, которые в процессе роста взаимодействуют с компонентами среды и тем самым преобразуют определенные продукты метаболизма, в частности органические кислоты [32]. Кроме того, виды бактерий, которые используют при производстве кисломолочных продуктов, влияют на физические характеристики продукта. Молочнокислые бактерии играют важную роль в ферментации молока с образованием кислоты, которая выступает в роли консерванта и придает продуктам вкусовые характеристики. Кроме того, молочнокислые бактерии оказывают детоксицирующее действие на молоко [33].

Важно отметить, что в исследованных нами коммерчески доступных стартовых культурах бактерий, для которых указано более 3 родов, количественное соотношение последних может сильно отличаться. Например, в 6 образцах стартовых культур, которые содержали как минимум 3 рода бактерий, относительная обильность *Streptococcus* значительно преобладала (свыше 70% всех полученных прочтений) над другими родами. И наоборот, содержание бактерий рода *Bifidobacterium* в комплексных стартовых культурах было ниже, чем других родов. Так, в четырех стартовых культурах, которые содержали как минимум 3 рода бактерий, относительная обильность *Bifidobacterium* была ниже 20%. Известно, что соотношение микроорганизмов в заквасках — важный фактор при производстве кисломолочных продуктов. Необходимо учитывать возможные взаимодействия между штаммами, входящими в состав молочного продукта. Это позволяет оптимизировать состав и технологические характеристики продукта, как в процессе производства, так и хранения [34, 35]. Это относится, например, к симбиотическим отношениям между *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *S. thermophilus* [36]. Совместное использование этих бактерий может сократить время ферментации [37]. Не все штаммы совместимы и может возникать дисбаланс роста бактерий в процессах ферментации

стартовыми культурами, состоящими из нескольких таксонов бактерий. Ранее, при анализе совместимости пробиотических культур, показано, что *Lactobacillus acidophilus* подавляется другими видами (такими как *Lactobacillus casei* и *Bifidobacterium* sp.) [38]. Отрицательные и положительные взаимодействия, изменяющие метаболизм и рост молочнокислых бактерий или дрожжей, могут влиять на формирование аромата изделия и/или время созревания [39]. Так, пробиотические бактерии *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus plantarum* плохо растут в молоке из-за отсутствия необходимой протеолитической активности [40, 41], а практический подход заключается в культивировании этих видов вместе со *Streptococcus thermophilus*. В результате в процессе ферментации сокращается время и увеличивается жизнеспособность пробиотических бактерий [42, 43].

В целом, на основании полученных результатов можно говорить о том, что необходим строгий контроль стартовых культур микроорганизмов, которые предназначены для производства кисломолочной продукции. И высокопроизводительное секвенирование — вполне подходящий современный инструмент для такого контроля.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект 21-74-00065).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tamime A.Y. Fermented milks: a historical food with modern applications a review. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2002, 4, 2–15. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601657>
2. Ghosh T., Beniwal A., Semwal A., et al. Mechanistic insights into probiotic properties of lactic acid bacteria associated with ethnic fermented dairy products. *Front. Microbiol.*, 2019, 10, 502. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00502>
3. Johnson M.E., Steele J.L., Doyle M.P., et al. Fermented dairy products. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Boundaries*, 4th edition. Eds Doyle M.P. & Buchanan R.L., ASM Press, Washington, 2013, 825–840. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch32>
4. Holzapfel W.H., Schillinger U., Geisen R., Lücke F.-K. Starter and protective cultures. In: *Food Preservatives*. Eds Russell N.J. & Gould G.W., Springer, Boston, 2003, 291–320. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-1549-1>
5. De Melo Pereira G.V., De Carvalho Neto D.P., De Junqueira A.C., et al. A review of selection criteria for starter culture development in the food fermentation industry. *Food Rev. Int.*, 2019, 36, 135–167. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1630636>

6. Li B., Wu D., Cai Y., et al. Genetic individualization of sable (*Martes zibellina* L. 1758) using microsatellites. *Anim. Cells Syst.*, 2018, 22, 253–258. <https://doi.org/10.1080/19768354.2018.1494039>
7. Ooi L.G., Liong M.T. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, 11(6), 2499–2522. <https://doi.org/10.3390/ijms11062499>
8. Marchesi J.R., Adams D.H., Fava F., et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 2016, 65, 330–339. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>
9. Zoumpopoulou G., Tzouvanou A., Mavrogonatu E., et al. Probiotic features of lactic acid bacteria isolated from a diverse pool of traditional Greek dairy products regarding specific strain-host interactions. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2018, 10, 313–322. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9311-9>
10. Randazzo C.L., Pitino I., De Luca S., et al. Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 122, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.005>
11. Simova E.D., Beshkova D.M., Angelov M.P., et al. Bacteriocin production by strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BB18 during continuous prefermentation of yogurt starter culture and subsequent batch coagulation of milk. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 35, 559–567. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0317-x>
12. De Souza C.H.B., Buriti F.C.A., Behrens J.H., et al. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2008, 43, 871–877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01534.x>
13. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 4th edition. Eds Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., von Wright A. CRC Press, 2012, 798. <https://doi.org/10.1201/b11503>
14. Mayo B., Rachid C.T., Alegría A., et al. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Curr. Genomics*, 2014, 15, 293–309. <https://doi.org/10.2174/1389202915666140616233211>
15. Sekse C., Holst-Jensen A., Dobrindt U., et al. High throughput sequencing for detection of foodborne pathogens. *Front. Microbiol.*, 2017, 8, 2029. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02029>
16. Mira Miralles M., Maestre-Carballe L., Lluésma-Gomez M., et al. High-throughput 16S rRNA sequencing to assess potentially active bacteria and foodborne pathogens: a case example in ready-to-eat food. *Foods*, 2019, 8, 480. <https://doi.org/10.3390/foods8100480>
17. Dobson A., O'Sullivan O., Cotter P.D., et al. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2011, 320, 56–62. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02290.x>
18. Liu W., Zheng Y., Kwok L.Y., et al. High-throughput sequencing for the detection of the bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented cow's milk in Russia. *BMC Microbiol.*, 2015, 15, 45. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0385-9>
19. Zhong Z., Hou Q., Kwok L., et al. Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk are shaped by both geographic origin and sample type. *J. Dairy Sci.*, 2016, 99, 7832–7841. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10825>
20. Luzzi G., Brinks E., Fritsche J., et al. Microbial composition of sweetness-enhanced yoghurt during fermentation and storage. *AMB Express*, 2020, 10, 131. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01069-5>
21. Wang Y., Qian P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*, 2009, 4(10), e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
22. Tkacz A., Hortala M., Poole P.S. Absolute quantitation of microbiota abundance in environmental samples. *Microbiome*, 2018, 6, 110. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0491-7>
23. Zemb O., Achard C.S., Hamelin J., et al. Absolute quantitation of microbes using 16S rRNA gene metabarcoding: a rapid normalization of relative abundances by quantitative PCR targeting a 16S rRNA gene spike-in standard. *MicrobiologyOpen*, 2020, 9, e977. <https://doi.org/10.1002/mbo3.977>
24. Fadrosch D.W., Gajer B.M.P., Sengamalay N., et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, 2014, 2, 6. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>
25. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., et al. Dege Prime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, 80, 5116–5123. <https://doi.org/10.1128/AEM.01403-14>
26. Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O.A., et al. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities. *Microbiology*, 2019, 88, 671–680. <https://doi.org/10.1134/S0026261719060110>
27. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 2010, 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
28. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.*, 2013, 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
29. Větrovský T., Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacte-

- rial community analyses. *PLoS One*, 2013, 8, e57923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
30. Louca S., Doebeli M., Parfrey L.W. Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome*, 2018, 6, 41. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0420-9>
 31. Kembel S.W., Wu M., Eisen J.A., et al. Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance. *PLoS Comput. Biol.*, 2012, 8, e1002743. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002743>
 32. Masco L., Ventura M., Zink R., et al. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, 54, 1137–1143. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03011-0>
 33. Serra M., Trujillo A.J., Guamis B., et al. Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. *Int. Dairy J.*, 2009, 19, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.08.002>
 34. Gemechu T. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *Afr. J. Food Sci.*, 2007, 9, 170–175. <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1276>
 35. Vinderola C.G., Mocchiutti P., Reinheimer J.A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J. Dairy Sci.*, 2002, 85, 721–729. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74129-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74129-5)
 36. Saccaro D.M., Tamime A.Y., Pilleggi A.L., et al. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C. *Int. J. Dairy Technol.*, 2009, 62, 397–404. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00497.x>
 37. Radke-Mitchell L., Sandine E. Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: a review. *J. Food Prot.*, 1984, 47, 245–248. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-47.3.245>
 38. Horiuchi H., Sasaki Y. Short communication: effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.*, 2012, 95, 2904–2909. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5147>
 39. Gadaga T.H., Mtukumira A.N., Narvhus J.A. The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, 68, 21–32. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00466-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00466-4)
 40. Klaver F.A.M., Kingma F., Weerkamp A.H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth. Milk. Dairy J.*, 1993, 47, 151–164.
 41. Settachaimongkon S., van Valenberg H.J.F., Gazi I., et al. Influence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on post-acidification, metabolite formation and survival of starter bacteria in set-yoghurt. *Food Microbiol.*, 2016, 59, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.04.008>
 42. Casarotti S.N., Monteiro D.A., Moretti M.M.S., et al. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Res. Int.*, 2014, 59, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.068>
 43. Li S.N., Tang S.H., He Q., et al. Physicochemical, textural and volatile characteristics of fermented milk co-cultured with *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* or *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2019, 55, 461–474. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14279>

High-Throughput Sequencing of the 16S rRNA Gene for Evaluation the Composition of Bacterial Starter Cultures Used for the Preparation of Fermented Milk Products

M. Yu. Syromyatnikov^{a, b, *}, O. S. Korneeva^c, E. Yu. Nesterova^{a, b},
M. I. Gladkikh^a, E. S. Popov^a, and V. N. Popov^{a, b}

^aLaboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, 394036 Russia

^bDepartment of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia

^cDepartment of Biochemistry and Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, 394036 Russia

*e-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru

Abstract—Starter cultures of lactic acid bacteria and some other microorganisms are used for the preparation of fermented dairy products. To assess the commercially available starter cultures (starter cultures for kefir, yogurt, fermented baked milk, narine, and other fermented products), the method of high-throughput sequencing of 16S rRNA gene fragments was used. Only 8 of 22 samples actually had a bacterial composition that matched the one declared by the manufacturer. It was shown that the bacterial population of 63% samples of the starter bacterial cultures differed from the indicated composition: the microbial cultures may either

not contain the declared bacterial taxa, or have bacterial taxa not specified by the manufacturer. The quantitative ratios of bacteria in the starter cultures can vary significantly. According to the 16S rRNA gene reads obtained, the *Streptococcus* genus markedly prevailed in 6 samples over other bacterial genera found (more than 70% of all bacteria in the starter cultures that contained at least 3 bacterial genera). In addition, the starter cultures contained fewer bacteria of the *Bifidobacterium* genus compared to other bacterial genera; for instance, the relative content of *Bifidobacterium* was lower than 20% in 4 starter cultures for yoghurts and fermented dairy products that contained at least 3 bacterial genera. Starter cultures that differ in their composition from those declared by the manufacturer can lead to changes in the properties of fermented milk products that are prepared using them.

Keywords: fermented milk products, starter cultures, lactic acid bacteria, high-throughput sequencing, bacterial composition, quality control