

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Таксономическая структура бактериальных сообществ в хлебных заквасках спонтанного брожения

В.К. Хлесткин<sup>1</sup> , М.Н. Локачук<sup>2</sup>, О.А. Савкина<sup>2</sup>, Л.И. Кузнецова<sup>2</sup>, Е.Н. Павловская<sup>2</sup>, О.И. Парахина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия  
<sup>2</sup> Санкт-Петербургский филиал Научно-исследовательского института хлебопекарной промышленности, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия  
 dir2645@yandex.ru

**Аннотация.** Статья посвящена исследованию микробиома хлебных заквасок спонтанного брожения. Цель работы – изучение влияния технологических параметров ведения заквасок на таксономическую структуру микробиома хлебных заквасок спонтанного брожения. Объектами исследования являлись две закваски спонтанного брожения – густая ржаная и жидкая ржаная без заварки, приготовленные с использованием одной партии муки ржаной обдирной. Для изучения таксономической структуры заквасочного микробиома в динамике применяли метод высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК микроорганизмов. Показано, что технологические параметры ведения заквасок (влажность, температура) не оказывают влияния на таксономический состав микробиома густой ржаной и жидкой ржаной заквасок на уровне филумов/классов/родов (но не видов). Установлено, что в течение первых трех суток ведения в микробном сообществе доминировали бактерии из филумов Proteobacteria и Firmicutes. В филуме Proteobacteria большую долю занимали микроорганизмы из порядка Enterobacterales, которые сохранялись в течение трех суток ведения заквасок. Филум Firmicutes был представлен молочнокислыми бактериями родов *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactosoccus*. Классическими микробиологическими методами установлено, что через одни сутки брожения количество клеток молочнокислых бактерий было значительно выше в жидкой ржаной закваске по сравнению с густой, однако при дальнейшем ведении заквасок количество клеток было сопоставимым, при этом происходили существенные изменения на уровне родов и видов. Выявлено, что по мере увеличения относительной численности молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* происходило постепенное вытеснение кокковых форм *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*. При дальнейшем ведении заквасок через 10 суток положение доминирующих групп бактерий занимали представители филума Firmicutes – молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*. Показано влияние режима и параметров ведения заквасок на видовой состав лактобацилл, который демонстрировал низкое бактериальное разнообразие. В первые трое суток ведения в обеих заквасках доминировали лактобациллы *L. curvatus*, *L. brevis* и *Lactiplantibacillus* sp. Через месяц ведения в густой ржаной закваске доминировали *Fructilactobacillus sanfranciscensis* и *Companilactobacillus* sp., а в жидкой ржаной – *L. pontis*. Ключевые слова: ржаная закваска; микробиом; микробное сообщество; лактобактерии; высокопроизводительное секвенирование; ферментация; хлебобулочные изделия.

**Для цитирования:** Хлесткин В.К., Локачук М.Н., Савкина О.А., Кузнецова Л.И., Павловская Е.Н., Парахина О.И. Таксономическая структура бактериальных сообществ в хлебных заквасках спонтанного брожения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):385-393. DOI 10.18699/VJGB-22-47

## Taxonomic structure of bacterial communities in sourdoughs of spontaneous fermentation

V.K. Khlestkin<sup>1</sup> , M.N. Lockachuk<sup>2</sup>, O.A. Savkina<sup>2</sup>, L.I. Kuznetsova<sup>2</sup>, E.N. Pavlovskaya<sup>2</sup>, O.I. Parakhina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, Russia  
<sup>2</sup> Saint-Petersburg Branch of the Scientific Research Institute for the Baking Industry, Pushkin, St. Petersburg, Russia  
 dir2645@yandex.ru

**Abstract.** The article is devoted to the study of the microbiome of spontaneously fermented sourdoughs. The aim of the work was to study the influence of the technological parameters of sourdough propagations on the taxonomic structure of the microbiome of spontaneously fermented sourdoughs. Two spontaneously fermented sourdoughs were studied: dense rye sourdough and liquid rye sourdough, both prepared using the same batch of peeled rye flour. To study the taxonomic structure of the sourdough microbiome in dynamics, the method of high-throughput sequencing of 16S rRNA gene fragments of microorganisms was used. It was shown that the technological parameters of sourdough (humidity, temperature) do not affect the taxonomic composition of the microbiome of dense rye or liquid rye sourdough at the phylum/class/genus level. It was found that during the first three days of propagations, bacteria from the phyla Proteobacteria and Firmicutes dominated in the microbial community. In the phylum Proteobacteria, microorganisms from the order Enterobacterales took a large share, which persisted for three days of

backslopping. The phylum Firmicutes was represented by lactic acid bacteria of the genera *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*. It was established by classical microbiological methods that after a day of fermentation, the number of lactic acid bacteria cells was significantly higher in liquid rye sourdough compared to dense one. However, with further propagation of sourdoughs, the number of cells was comparable, while significant changes occurred at the level of genera and species. It was shown that as the relative number of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* increased, a gradual displacement of the coccal forms of *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* happened. With further propagation of sourdough after 10 days, the position of the dominant groups of bacteria was occupied by representatives of the phylum Firmicutes, lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus*. The influence of the mode and parameters of the sourdough on the species composition of lactobacilli, which demonstrated a low bacterial diversity, is shown. In the first three days of propagations, lactobacilli *L. curvatus*, *L. brevis*, and *Lactiplantibacillus* sp. dominated in both sourdoughs. After a month of backslopping, *Fructilactobacillus sanfranciscensis* and *Companilactobacillus* sp. dominated in dense rye sourdough, and *L. pontis* dominated in liquid rye sourdough.

Key words: rye sourdough; microbiome; microbial community; lactobacillus; high-throughput sequencing; fermentation; bakery products.

**For citation:** Khlestkin V.K., Lockachuk M.N., Savkina O.A., Kuznetsova L.I., Pavlovskaya E.N., Parakhina O.I. Taxonomic structure of bacterial communities in sourdoughs of spontaneous fermentation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):385-393. DOI 10.18699/VJGB-22-47

## Введение

В последние годы отмечается повышенный интерес к выработке хлебобулочных изделий на заквасках, в том числе в ремесленных и домашних условиях. Это связано с тем, что хлебобулочные изделия на заквасках характеризуются высокими показателями качества – вкусом, ароматом, питательной ценностью и устойчивостью к микробной порче. Закваска представляет собой полуфабрикат хлебопекарного производства, получаемый сбраживанием питательной смеси из муки и воды молочнокислыми бактериями или молочнокислыми бактериями и хлебопекарными дрожжами, которые могут попадать в закваску из исходного сырья или из промышленных стартовых микробных композиций (Ауэрман, 2009; De Vuyst et al., 2017).

Ведение закваски – это технологический процесс, предусматривающий регулярное освежение закваски порцией муки и воды с последующим выбраживанием до готовности. После брожения часть спелой закваски идет на замес теста, а другая часть используется для нового освежения. Тем самым создается непрерывный процесс ведения закваски. Это позволяет поддерживать заквасочную микробиоту в активном состоянии и производить закваску с заданными биотехнологическими и физико-химическими показателями, что обеспечивает выработку хлебобулочных изделий с требуемыми потребительскими свойствами (Сборник современных технологий..., 2008; Ауэрман, 2009).

Нами ранее было впервые показано (Локачук и др., 2020), что в ходе длительного ведения отечественных заквасок, полученных с использованием стартовых микробных композиций, происходят значительные изменения видового разнообразия лактобацилл, приводящие к преобладанию видов, отличных от вносимых в фазу I разводочного цикла, и тем не менее позволяющие получить хлебобулочные изделия, соответствующие ГОСТ 2077-84. Так, нами установлена одна из причин, по которой потребители могут заметить разницу физико-химических и органолептических показателей продукции одного вида, поскольку изменения микробиома в процессе длительного ведения густой ржаной закваски приводят к существенно изменению в содержании молочной и уксусной кислот,

титруемой кислотности, подъемной силы, содержании спирта в закваске и тесте и, следовательно, готовой продукции. Образцы ржаного хлеба, приготовленные на закваске длительного ведения, отличались большей кислотностью, меньшим содержанием спирта и большим количеством летучих кислот (в основном уксусной).

Вместе с тем значительное внимание во всем мире уделяется изучению микробиома заквасок спонтанного брожения, в которых развивается исходная микрофлора сырья. При этом микробиом отечественных заквасок спонтанного брожения и его изменения в ходе технологических процессов остаются неизученными, несмотря на его важнейшую роль в формировании качества и безопасности хлебобулочных изделий.

В настоящее время применение высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК позволяет расширить знания о таксономической структуре микробиома заквасок. Это имеет большое значение, поскольку на разнообразие и структуру заквасочных микробных сообществ оказывает влияние множество факторов.

Несмотря на нестабильность качества и нестерильность сырья, закваски являются стабильными экосистемами, что может быть связано с метаболическими адаптациями в экосистеме закваски (Müller et al., 2001; Minervini et al., 2012; Viard et al., 2016).

В процессе ферментации заквасок температура выступает в качестве основного фактора, воздействующего на динамику микробного сообщества и кинетику продукции метаболитов. Температура брожения влияет на коэффициент ферментации, который представляет собой отношение концентраций молочной и уксусной кислот. Более высокие температуры вызывают сдвиг в сторону роста содержания молочной кислоты, тем самым увеличивая кислотность закваски. Гомоферментативные и факультативно гетероферментативные виды молочнокислых бактерий (МКБ), принадлежащие, например, к группе *Lactobacillus delbrueckii* и часто преобладающие в заквасках, ведущихся при повышенных температурах, вызывают быстрое снижение рН водно-мучной питательной смеси в основном за счет образования молочной кислоты. Гетероферментативные виды МКБ, как правило, преобладают в заквасках, которые ведутся при более низких температурах и в те-

чение длительных периодов ферментации, продуцируют смесь молочной, уксусной кислот и/или этанола (De Vuyst et al., 2017).

Существует положительная корреляция между температурой брожения (< 30 °С) и частотой обнаружения *L. sanfranciscensis* в заквасках. Напротив, такие температуры отрицательно коррелируют с присутствием в закваске МКБ видов *L. fermentum* и *L. plantarum*. Например, показано, что *L. sanfranciscensis* преобладает в традиционных возобновляемых густых заквасках, которые ведутся при температурах ниже 30 °С и имеют рН около 4, – закваски типа I по зарубежной классификации (Böcker et al., 1995; Hammes et al., 2005), – оптимально ассоциируясь с дрожжами *S. humilis* при температуре 25–30 °С (Van Kerrebroeck et al., 2017). Поскольку *S. humilis* имеет температурный оптимум 27–28 °С и не может расти при температурах выше 35 °С, повышенная температура отрицательно влияет на этот мутуалистический симбиоз. *L. sanfranciscensis* также неконкурентоспособна при повышенных температурах (Gänzle et al., 1998; Vogelmann, Hertel, 2011) по сравнению с другими видами МКБ.

Существенное влияние на микробное разнообразие в заквасках оказывают влажность и рН. Низкие значения рН стимулируют развитие кислотоустойчивых лактобацилл, тогда как более высокие значения благоприятны для видов *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* и *Weissella* (De Vuyst et al., 2017). Например, относительно высокие значения рН, обычно превышающие 4.0, во французских заквасках типа I могут объяснить обнаружение чувствительных к кислоте видов *P. pentosaceus*, *Leuconostoc* и *Weissella* (Robert et al., 2009).

Известно, что кислотность закваски влияет на содержание вида *L. sanfranciscensis*, оптимальное значение рН для роста которого составляет 5.0, тем не менее данный вид МКБ демонстрирует адаптацию к кислотному стрессу, как и многие другие штаммы МКБ, выделенные из заквасок.

Вид *L. sanfranciscensis* в основном встречается в заквасках типа I с низкой влажностью и вытесняется в заквасках со слишком низким значением рН, который сохраняется в течение значительного периода в процессе ведения закваски, поскольку этот вид лактобацилл не растет при рН ниже 3.8. Напротив, установлено, что кислотоустойчивые виды МКБ, такие как *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rossiae* и/или *L. pontis*, преобладают в жидких невозобновляемых заквасках, которые выводятся с использованием стартовых микробных композиций и отличаются более высокой температурой ведения (выше 30 °С) и длительным брожением, от 15 ч до 3 сут, – заквасках типа II (Meroth et al., 2003; Vogelmann, Hertel, 2011; De Vuyst et al., 2017).

В высушенных или стабилизированных жидких заквасках (тип III) содержатся МКБ, устойчивые к процессу сушки и способные сохранять жизнеспособность в такой форме: например, облигатно гетероферментативные *L. brevis*, факультативно гетероферментативные *L. plantarum*, *P. pentosaceus* (De Vuyst, Neysens, 2005; Hammes et al., 2005; Settanni et al., 2013).

Приведенные выше данные позволяют предположить, что в отечественных заквасках с разной влажностью и температурой ведения также могут быть выявлены су-

щественные различия в микробиоме и, в частности, в видовом составе лактобацилл.

На хлебопекарных предприятиях России для выработки ржаного и ржано-пшеничного хлеба уже много десятилетий широко используются пять видов ржаных заквасок: густая, жидкая без заварки, жидкая с заваркой, концентрированная молочнокислая и термофильная. По данным Научно-исследовательского института хлебопекарной промышленности (Кузнецова и др., 2021), наиболее часто используются густая ржаная закваска и жидкая без заварки. Обе закваски применяют при выработке хлебобулочных изделий из смеси ржаной и пшеничной муки при полной или частичной замене прессованных дрожжей, они позволяют получить качественный хлеб.

Выбор той или иной закваски на предприятии обуславливается технологическими возможностями (оборудованием, режимом работы). Жидкие закваски используются на предприятиях, спроектированных так, что необходимо транспортирование закваски по трубам из заквасочного цеха к месту замеса теста, и имеющих емкости с «рубашкой» для обеспечения нужной температуры. Для приготовления такой закваски задействуется питательная смесь из муки и воды влажностью 70–75 %, температура брожения составляет 30–32 °С. Густая ржаная закваска существенно отличается по технологическим параметрам: она имеет влажность 48–50 % и температуру брожения 26–28 °С. Ее проще консервировать при перерывах в работе, и она не требует применения для брожения емкостей с рубашкой, достаточно температуры в условиях цеха (Сборник современных технологий..., 2008). Высокая температура брожения жидкой закваски позволяет достигать необходимых технологических показателей (кислотности и подъемной силы) за более короткое время, что ускоряет технологический процесс. Учитывая существенную разницу в параметрах заквасок, значительный интерес представляет изучение различий в формировании их микробиома.

Целью работы было изучение влияния технологических параметров ведения заквасок на таксономическую структуру микробиома хлебных заквасок спонтанного брожения.

## Материалы и методы

**Приготовление и ведение заквасок.** Исследовали две закваски спонтанного брожения: густую ржаную и жидкую ржаную без заварки, выведенные с использованием одной партии муки ржаной обдирной (ОАО «ЛКХП Кирова», Россия). Показатели качества муки: число падения – 193 с, влажность 12.4 %. Влажность муки определяли по ГОСТ 9404-88, число падения – по ГОСТ 27676-88. Эксперимент проводили в двух повторностях.

В муке ржаной обдирной, исследованной в виде водно-мучной питательной смеси для закваски, выявлены молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* и *Leuconostoc*. Доминирующее положение занимал род *Lactobacillus*. Обнаружены лактобациллы видов *F. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *Companilactobacillus* sp., *L. curvatus*.

Закваски вели в лабораторных условиях в течение месяца. Из партии муки ржаной обдирной готовили питательные смеси влажностью 50 и 70 %, массой 1000 г. Для

этого смешивали до однородной консистенции муку с водой в соотношении 1:0.76 и 1:1.9 соответственно. Полученные водно-мучные питательные смеси влажностью 50 и 70 % оставляли для брожения в термостатах на двое суток при температурах  $26 \pm 1$  и  $32 \pm 1$  °C соответственно.

Выброженные закваски обновляли соответствующими питательными смесями в соотношении закваска : питание 1:1 и оставляли еще на сутки брожения при температурах  $26 \pm 1$  и  $32 \pm 1$  °C в зависимости от влажности (50 или 70 %) закваски.

В течение следующих суток закваски обновляли в соотношении 1:1 через 6.5–7 ч и 16 ч и выбраживали при соответствующих температурах. После 16-часового брожения закваски обновляли в соотношении 1:1, выбраживали каждую закваску в течение 3.5–4 ч при заданной температуре, контролировали качество (подъемную силу, титруемую кислотность, увеличение объема в % к первоначальному) и направляли на хранение в холодильник при температуре  $5 \pm 1$  °C на 2.5 сут. Кислотность определяли титрованием 0.1 н раствором гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина и выражали в градусах. Подъемную силу определяли по «шарику» и выражали в минутах (Пучкова, 2004).

В продолжение следующих 4 недель, с понедельника по четверг, закваски влажностью 50 % освежали в соотношении закваска : питательная смесь 1:3 и выбраживали при температуре 26 °C в течение 7 ч, а затем освежали в соотношении 1:5 при температуре 20 °C и оставляли на 16 ч при температуре 17–18 °C. В этот же период закваски влажностью 70 % освежали в соотношении 1:2 с температурой 32 °C и выбраживали в течение 7 ч. Затем их освежали в таком же соотношении, но с температурой около 20 °C и оставляли на брожение в течение 16 ч при температуре 17–18 °C. В пятницу закваски обновляли по установленному для каждой закваски режиму, выбраживали в течение 3.5–4 ч при заданной температуре и после контроля качества убирали в холодильник и хранили при температуре 4–5 °C в течение 2.5 сут.

Данные два температурных и влажностных режима фактически используются на предприятиях страны, в том числе и по техническим причинам. Так, для густой ржаной закваски технически невыполнимо обеспечить более высокую температуру брожения, поскольку из емкости с рубашкой невозможно разгрузить с помощью дежепрокидывателя, а транспортировка закваски по трубопроводу невозможна. Вести такую закваску можно только при тех режимах, которые установлены на предприятиях.

Задачей настоящего исследования было выявление влияния этих характерных для нашей промышленности режимов и параметров на микробиом заквасок.

**Микробиологический анализ заквасок.** В процессе ведения заквасок контролировали количество жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий. Для этого 10 г образца закваски гомогенизировали вручную в ступке в 90 мл 0.9 % раствора натрия хлорида. Готовили серию десятикратных последовательных разведений и производили посев на Sanfrancisco agar (Picozzi et al., 2005). Для создания анаэробных условий культивирования использовали газ-пакеты AnaeroGen, обеспечивающие уровень

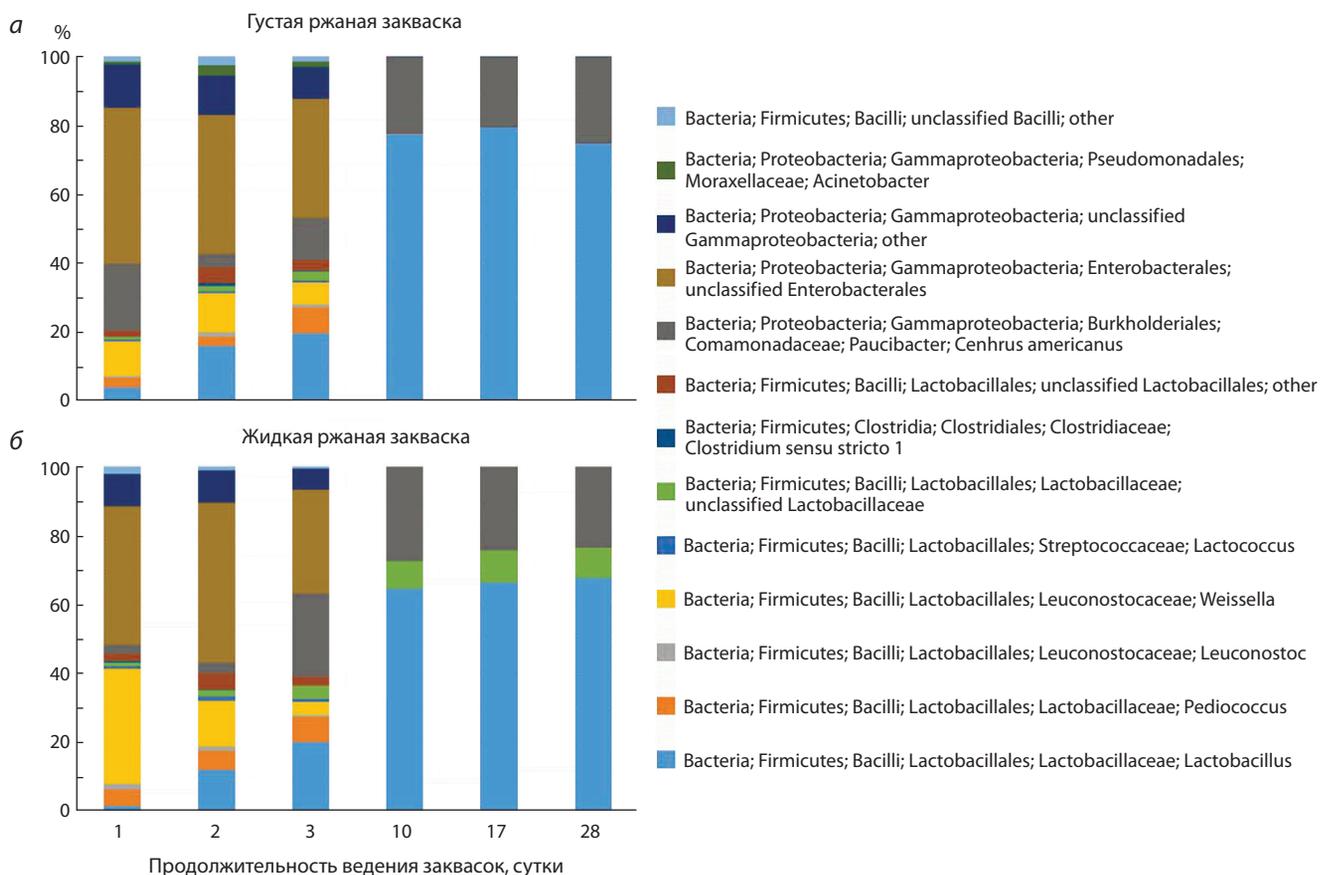
углекислого газа от 9 до 13 % и содержание кислорода менее 1 %. Посевы инкубировали при 30 °C.

**Определение состава микробных сообществ методом высокопроизводительного секвенирования фрагмента гена 16S рРНК.** В каждом образце была определена таксономическая структура микробиома методом высокопроизводительного секвенирования на базе ЦКП «Генные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Для выделения ДНК из образцов применяли набор реактивов (MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Soil) компании MACHEREY-NAGEL (Германия) согласно инструкции производителя. В каждом образце был определен таксономический состав бактериального сообщества на основании анализа ампликонных библиотек фрагментов рибосомальных оперонов. Таксономический анализ бактериального сообщества выполняли с универсальными праймерами F515/R806 на вариабельный участок гена 16SpРНК-v4 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA/GGACTACVSGGGTATCTAAT), специфичными для широкого круга микроорганизмов, включая бактерии и археи (Bates et al., 2010). Все праймеры имели служебные последовательности, содержащие линкеры и баркоды (необходимые для секвенирования по технологии Illumina).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была осуществлена в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5–1 единицу активности полимеразы Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 10 нг ДНК-матрицы и 2 нМ каждого dNTP (Life Technologies, США). Смесь денатурировали при 94 °C 1 мин, после чего следовало 35 циклов: 94 °C – 30 с; 50 °C – 30 с; 72 °C – 30 с. Финальную элонгацию проводили при 72 °C 3 мин. ПЦР-продукты очищали по рекомендованной Illumina методике с использованием AMPureXP (BeckmanCoulter, США). Дальнейшую подготовку библиотек осуществляли в соответствии с инструкцией производителя MiSeq Reagent Kit Preparation Guide (Illumina, США). Библиотеки секвенировали в соответствии с инструкцией изготовителя на приборе Illumina MiSeq (Illumina) с использованием набора реактивов MiSeq<sup>®</sup> ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2\*300 н).

Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывали с использованием пакетов программного обеспечения Trimmomatic (Bolger et al., 2014) и QIIME (Caporaso et al., 2010). На первом этапе проводили первичный анализ качества прочтения, отбор последовательностей на основе качества чтения отдельных оснований (base pair quality), объединение парно-концевых последовательностей с участком перекрытия не менее 35 оснований, а также удаление последовательностей, длина которых составляет менее 180 п. н. На втором этапе осуществляли удаление из библиотек всех служебных участков (праймеров), а также последовательностей, содержащих протяженные гомополимерные повторы. При анализе бактериальных сообществ использовали *de novo* ОТЕ-пикинг. Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили с помощью базы данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>).



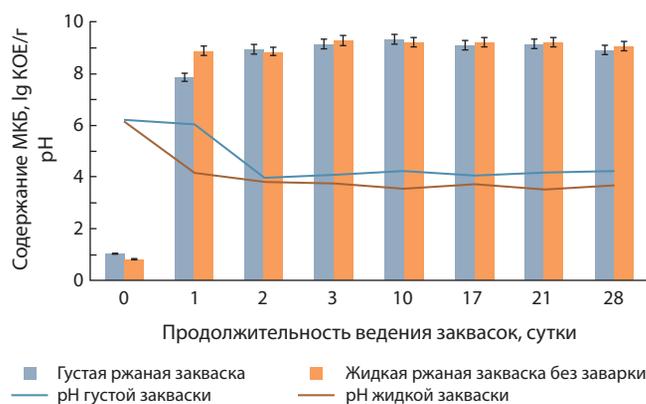
**Рис. 1.** Состав микробных сообществ, по данным анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК, в спонтанных заквасках: густой ржаной (а) и жидкой ржаной без заварки (б).

## Результаты

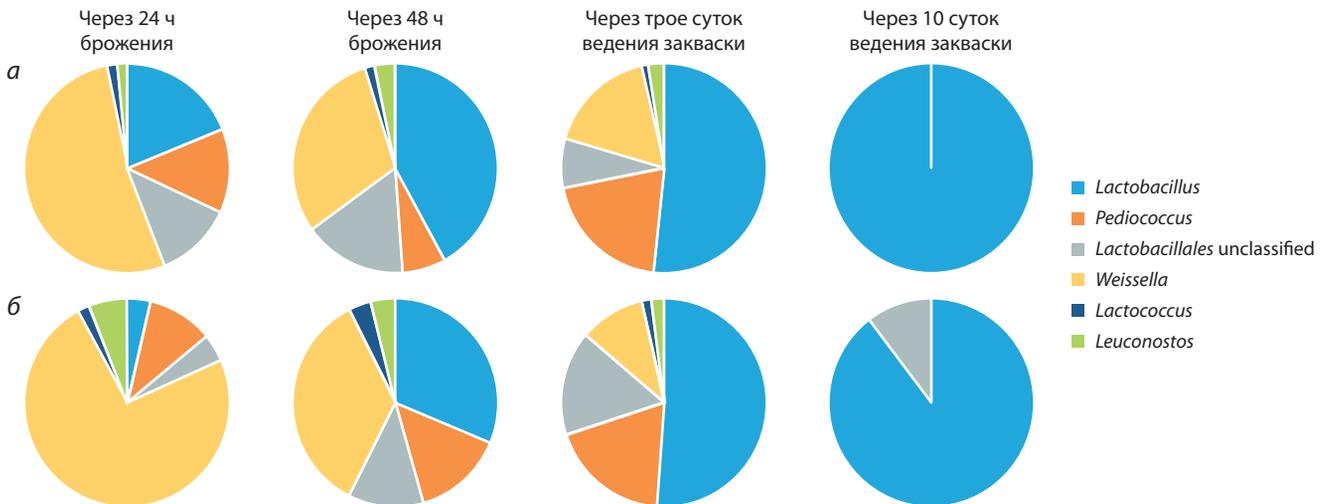
В муке ржаной обдирной, исследованной в виде водно-мучной питательной смеси для закваски, выявлены молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* и *Leuconostoc*, характерные для естественного природного обсеменения зерна и муки. Доминирующее положение занимал род *Lactobacillus*. Обнаружены лактобациллы видов *F. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *Companilactobacillus* sp., *L. curvatus*.

В течение первых трех суток ведения заквасок бактериальный комплекс исследованных заквасочных микробиомов, по полученным данным, был сформирован представителями двух филумов: Proteobacteria (доминировал класс Gammaproteobacteria) и Firmicutes (молочнокислые бактерии родов *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*). Филум Protobacteria был представлен бактериями порядка Enterobacteriales (около 40%), которые через 48 ч брожения также были выявлены в значительном количестве (рис. 1). На третьи сутки ведения заквасок количество бактерий порядка Enterobacteriales незначительно снизилось до 30%. Следует отметить, что на протяжении этого периода закваски имели неприятный гнилостный запах. При дальнейшем ведении заквасок через 10 сут доминировали представители филума Firmicutes молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, посторонние бактерии порядка Enterobacteriales не обнаруживались. Обе закваски приобрели характерный заквасочный запах.

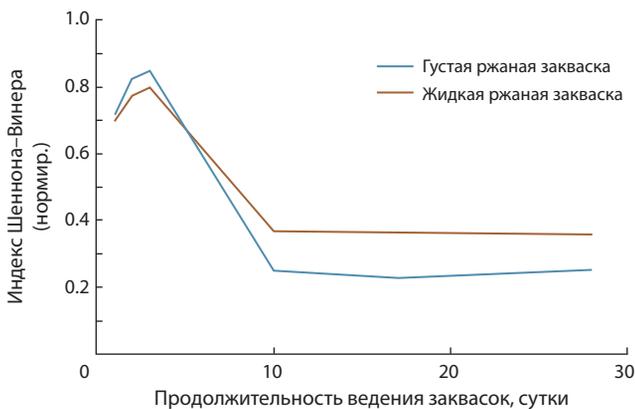
Контроль количества жизнеспособных клеток МКБ классическими микробиологическими методами показал, что через одни сутки брожения количество клеток МКБ было значительно выше в жидкой ржаной закваске. Это может объясняться более высокой температурой ведения, 32 °С, по сравнению с густой закваской, которую вели при температуре 26 °С. При дальнейшем ведении заквасок количество клеток МКБ было сопоставимым, однако происходили существенные изменения на уровне родов и видов (рис. 2).



**Рис. 2.** Изменение количества клеток МКБ и pH заквасок в процессе ведения закваски в течение 28 сут.



**Рис. 3.** Представленность родов МКБ от их общего количества (%), по данным анализа метагенома 16S рРНК, в: густой ржаной закваске (а); жидкой ржаной закваске без заварки (б).



**Рис. 4.** Изменение биоразнообразия в процессе ведения заквасок.

В обеих заквасках через одни сутки брожения доминировали молочнокислые бактерии рода *Weissella* (53 % от общего количества МКБ в густой и 74 % в жидкой закваске), также были обнаружены МКБ родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* (рис. 3). При этом в жидкой закваске отмечалось крайне низкое содержание наиболее значимого для заквасок рода *Lactobacillus* (3 %). При дальнейшем ведении заквасок по мере увеличения количества МКБ рода *Lactobacillus* происходило постепенное вытеснение кокковых форм *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*. Через трое суток количество лактобацилл увеличилось в обеих заквасках до 50 %. На 10-е сутки ведения обнаруживались только МКБ рода *Lactobacillus*.

Установлено, что в процессе ведения закваски происходили существенные изменения на уровне не только родов МКБ, но и видов лактобацилл.

Через 24 ч брожения в обеих заквасках доминировали лактобациллы *Latilactobacillus curvatus*. Микробиота через 48 ч брожения в обеих заквасках была представлена лактобациллами *L. curvatus*, *Levilactobacillus brevis* и *Lactiplantibacillus plantarum/paraplantarum/pentosus/*

*fabifermentans* (не удалось точно идентифицировать из-за низкого различия в нуклеотидных последовательностях гена 16S рРНК у данных видов), которые были выявлены в исходной водно-мучной питательной смеси до брожения. При дальнейшем ведении заквасок содержание этих родов уменьшалось.

Через 10 сут ведения и на протяжении всего оставшегося периода в густой ржаной закваске доминировали облигатно гетероферментативные лактобациллы вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, которые были также обнаружены в муке ржаной обдирной. Через один месяц ведения закваски был выявлен вид, принадлежащий к *Companilactobacillus* sp., который не удалось однозначно идентифицировать с помощью базы данных RDP. Источником этого вида МКБ также была мука ржаная обдирная, однако в течение первых двух недель ведения закваски этот вид присутствовал в закваске в незначительном количестве.

В жидкой ржаной закваске без заварки преобладали облигатно гетероферментативные МКБ вида *Limosilactobacillus pontis*, которые также были обнаружены в пробе муки.

Проведена оценка альфа-разнообразия (рис. 4). Индекс Шеннона-Винера был рассчитан по формуле

$$H = -\sum p_i \cdot \lg(p_i),$$

где  $i$  – число обнаруженных в закваске видов лактобактерий,  $p_i$  – доля, занимаемая конкретным видом в общей совокупности видов лактобактерий.

Полученные результаты полностью подтверждают факт, что параметры ведения заквасок (температура, влажность) существенно влияют на видовое разнообразие лактобацилл, которое в обеих заквасках было низким.

## Обсуждение

В настоящей работе впервые изучено влияние технологических параметров ведения заквасок на таксономическую структуру микробиома отечественных хлебных заквасок спонтанного брожения. С помощью культурально-незави-

симого метода высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК показано, что в заквасках в течение первых трех суток были обнаружены бактерии, принадлежащие к двум филумам, Firmicutes и Proteobacteria. Относительное количество протеобактерий уменьшалось в процессе ферментации и через 10 сут ведения они не выявлялись. Это полностью согласуется с предыдущими результатами зарубежных исследователей, показывающими, что несколько филумов бактерий в дополнение к Firmicutes (например, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria и Proteobacteria) могут присутствовать в закваске до начала ферментации. Большинство из них представляют собой неактивные популяции и полностью вытесняются Firmicutes (Ercolini et al., 2013; Rizzello et al., 2015; Menezes et al., 2020). При этом источником посторонней микробиоты является сырье.

Обычно бактериальную популяцию ржаной и пшеничной муки, не относящуюся к филуму Firmicutes, составляют представители филумов Proteobacteria (например, рода *Erwinia*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Enterobacter* и *Sphingomonas*) и *Bacteroidetes* (например, *Chryseobacterium*). Эта популяция, как правило, почти полностью подавляется в первые сутки ведения заквасок. Исключение составляют представители семейства Enterobacteriaceae, которые обнаруживаются до 5 сут ведения заквасок, вероятно, благодаря способности к синтезу органических кислот и определенной устойчивости к кислотному стрессу (Ercolini et al., 2013). Таким образом, в процессе ферментации происходит изменение микробного разнообразия с увеличением доли филума Firmicutes и вытеснением представителей филума Proteobacteria.

Филум Firmicutes был представлен молочнокислыми бактериями. Установлено, что в первые сутки в обеих заквасках через 24 ч брожения доминировали представители рода *Weissella*. Бактерии родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* содержались в меньшем количестве, а уже через трое суток количество МКБ рода *Lactobacillus* увеличилось в обеих заквасках до 50 % от общего количества МКБ, а кокковые формы *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* вытеснялись. На 10-е сутки ведения обнаруживались только МКБ рода *Lactobacillus*. При исследовании польских ржаных заквасок отмечена похожая динамика (Boreczek et al., 2020): через 24 ч брожения в закваске содержание бактерий рода *Weissella* составляло 36 %, а через 72 ч – всего 5 %, при этом содержание рода *Lactobacillus* к третьему дню ведения закваски увеличилось с 30 до 67 %.

Полученные результаты несколько расходятся с данными, полученными для итальянских заквасок, в которых через 10 дней содержание представителей рода *Weissella* было почти в 2 раза больше, чем рода *Lactobacillus* (Ercolini et al., 2013). Авторы предполагают, что это связано с тем, что род *Weissella* доминировал в итальянской ржаной муке. Действительно, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* и *Weissella* обычно содержатся в зерне и муке соответственно, но не способны выдерживать длительный процесс подкисления, так как для их развития нужны более высокие значения pH по сравнению с лактобациллами (Van Kerrebroeck et al., 2017). В ряде исследований показано, что рост представителей рода *Weissella* ингибируется

при pH 4.5, однако они способны к росту при pH 6.5–6.8. Кислая среда закваски стимулирует смену сообществ МКБ в заквасках и создает нишу, благоприятную для развития кислотоустойчивых лактобацилл, таких как *L. brevis* и *L. sanfranciscensis* (Oshiro et al., 2020).

Обобщая известные и полученные данные, можно отметить, что стабилизация микробиома с преобладанием рода *Lactobacillus* происходит к 10-м суткам (Van der Meulen et al., 2007; Weckx et al., 2010). Это коррелирует с нашими данными об изменении альфа-разнообразия (см. рис. 4) густой и жидкой ржаных заквасок.

Показано, что в течение этого же периода происходят значительные изменения в видовом составе лактобацилл. Доминирующий через 24 ч брожения вид *Latilactobacillus curvatus* был обнаружен через 48 ч совместно с видами *Levilactobacillus brevis* и *Lactiplantibacillus plantarum/paraplantarum/pentosus/fabifermentans*, которые обнаруживались в незначительном количестве и в исходной водно-мучной питательной смеси до брожения.

Снижение содержания *Latilactobacillus curvatus* в процессе ведения заквасок было отмечено и зарубежными исследователями. Установлено, что на первых этапах ведения корейских заквасок содержание отдельных видов МКБ составляло: *L. curvatus* (9.5 log КОЕ/г), *F. sanfranciscensis* (< 5 log КОЕ/г), *L. brevis* (6.5 log КОЕ/г), в то время как после 11-го освежения значительно увеличилось количество *F. sanfranciscensis* (> 9.0 log КОЕ/г), тогда как содержание *L. curvatus* и *L. brevis* снизилось, что, по мнению авторов (Baek et al., 2021), связано с отрицательным влиянием повышенного содержания молочной кислоты в среде на развитие *L. curvatus*. В исследованиях (Landis et al., 2021) показано, что *L. plantarum* и *L. brevis* были наиболее часто обнаруживаемой парой одновременно встречающихся таксонов (в 177 из 500 заквасок), в то время как вид *L. sanfranciscensis* доминировал в большинстве заквасок длительного ведения, и его содержание отрицательно коррелировало с содержанием видов *L. plantarum* и *L. brevis*, которые преобладали в молодых заквасках.

При дальнейшем ведении заквасок отмечались значительные отличия в формировании микробиоты в жидких и густых ржаных заквасках. В густой ржаной закваске наблюдалось увеличение содержания бактерий вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis*. Согласно литературным данным, этот вид считается наиболее адаптированным и является автохтонным микроорганизмом микробиоты заквасок типа I (Siragusa et al., 2009; Vogel et al., 2011; Rogalski et al., 2020). Доминирование данного вида в густой ржаной закваске объясняется созданием оптимальных условий для его развития (температура менее 30 °C, pH в пределах 4.1–4.3, влажность 50 %). Однако через месяц ведения в закваске, помимо *F. sanfranciscensis*, были обнаружены молочнокислые бактерии *Companilactobacillus* sp., источником которых была мука.

Выявленные в жидкой ржаной закваске без заварки облигатно гетероферментативные МКБ вида *Limosilactobacillus pontis* развивались при более высоких значениях температуры (32 °C) и влажности (70 %) и более низком pH (3.6–4.0). Очевидно, что такие условия благоприятны для развития этого вида, что подтверждается литературными данными (De Vuyst et al., 2017).

## Заключение

В результате проведенных исследований впервые методом высокопроизводительного секвенирования изучено разнообразие прокариот в отечественных заквасках спонтанного брожения. Установлено, что в течение первых трех суток ведения бактериальный комплекс исследованных заквасок был представлен филумами Proteobacteria (класс Gammaproteobacteria) и Firmicutes (молочнокислые бактерии родов *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*). При дальнейшем ведении заквасок через 10 сут доминировали представители филума Firmicutes молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*.

Сравнительный анализ таксономического состава микробиома густой и жидкой ржаной закваски без заварки не продемонстрировал глубоких различий на протяжении всего периода ведения заквасок как на уровне филумов/классов, так и на родовом уровне. Однако отмечено различие на уровне видов лактобацилл, что связано с влиянием на формирование заквасочного микробиома экзогенных факторов, таких как температура и влажность заквасок.

Дальнейшие исследования промышленных и лабораторных заквасок длительного ведения позволят установить, имеет ли место стабилизация микробиома с доминированием одного-двух видов, происходят ли периодические колебания состава микробиома или же реализуются другие сценарии.

## Список литературы / References

Ауэрман Л.Я. Технология хлебопекарного производства. СПб.: Профессия, 2009.  
[Auerman L.Ya. Technology of Bakery Production. Saint-Petersburg, Profesiya Publ., 2009. (in Russian)]  
Кузнецова Л.И., Парахина О.А., Савкина О.А., Буркина М.С. Стартовые композиции микроорганизмов для хлебных заквасок. *Хлебопекарный и кондитерский форум*. 2021;49:54-57.  
[Kuznetsova L.I., Parakhina O.A., Savkina O.A., Burykina M.S. Starting compositions of microorganisms for sourdoughs. *Khlebopekarnyy i Konditerskiy Forum = Bakery and Confectionery Forum*. 2021;49:54-57. (in Russian)]  
Локачук М.Н., Хлесткин В.К., Савкина О.А., Кузнецова Л.И., Павловская Е.Н. Изменение микробиоты густой ржаной закваски в процессе длительного ведения. *Хлебопродукты*. 2020;11:33-37.  
DOI 10.32462/0235-2508-2020-29-11-33-37.  
[Lokachuk M.N., Khlestkin V.K., Savkina O.A., Kuznetsova L.I., Pavlovskaya E.N. Changes in the microbiota of dense rye sourdough during long-term propagation. *Khleboprodukty = Bread Products*. 2020;11:33-37. DOI 10.32462/0235-2508-2020-29-11-33-37. (in Russian)]  
Пучкова Л.И. Лабораторный практикум по технологии хлебопекарного производства: учеб. пособ. для вузов. СПб.: ГИОРД, 2004.  
[Puchkova L.I. Laboratory Workshop on the Technology of Bakery Production. Saint-Petersburg: GIORD Publ., 2004. (in Russian)]  
Сборник современных технологий хлебобулочных изделий. Под общ. ред. А.П. Косована. М.: ГНУ ГОСНИИ хлебопекарной промышленности, 2008.  
[Kosovan A.P. (Ed.). Collection of Modern Bakery Technologies. Moscow, 2008. (in Russian)]  
Baek H.W., Bae J.H., Lee Y.G., Kim S.A., Min W., Shim S., Han N.S., Seo J.H. Dynamic interactions of lactic acid bacteria in Korean sourdough during back-slopping process. *J. Appl. Microbiol.* 2021; 131(5):2325-2335. DOI 10.1111/jam.15097.

Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.* 2010;5:908-917. DOI 10.1038/ismej.2010.171.  
Böcker G., Stolz P., Hammes W.P. Neue Erkenntnisse zum Ökosystem sauerartige und zur Physiologie der sauerartige typischen Stamme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl. und Brot.* 1995;49:370-374.  
Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-2120. DOI 10.1093/bioinformatics/btu170.  
Boreczek J., Litwinek D., Żylińska-Urban J., Izak D., Buksa K., Gawor J., Gromadka R., Bardowski J.K., Kowalczyk M. Bacterial community dynamics in spontaneous sourdoughs made from wheat, spelt, and rye wholemeal flour. *MicrobiologyOpen.* 2020;9(4):1-13. DOI 10.1002/mbo3.1009.  
Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 2010; 7(5):335-336. DOI 10.1038/nmeth.f.303.  
De Vuyst L., Neysens P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.* 2005;16(1-3): 43-56. DOI 10.1016/j.tifs.2004.02.012.  
De Vuyst L., Van Kerrebroeck S., Leroy F. Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 2017;100:49-160. DOI 10.1016/bs.aambs.2017.02.003.  
Ercolini D., Pontonio E., De Filippis F., Minervini F., La Stora A., Gobetti M., Di Cagno R. Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(24):7827-7836. DOI 10.1128/AEM.02955-13.  
Gänzle M., Ehmann M.R., Hammes W. Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64(7):2616-2623. DOI 10.1128/AEM.64.7.2616-2623.1998.  
Hammes W.P., Brandt M.J., Francis K.L., Rosenheim J. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci. Technol.* 2005; 16(1-3):4-11. DOI 10.1016/j.tifs.2004.02.010.  
Landis E.A., Oliverio A.M., McKenney E.A., Nichols L.M., Kfoury N., Biango-Daniels M., Shell L.K., Madden A.A., Shapiro L., Sakunala S., Drake K., Robbat A., Booker M., Dunn R.R., Fierer N., Wolfe B.E. The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *Elife.* 2021;10:e61644. DOI 10.7554/eLife.61644.  
Menezes L.A.A., Sardaro M.L.S., Duarte R.T.D., Mazzon R.R., Neviani E., Gatti M., De Dea Lindner J. Sourdough bacterial dynamics revealed by metagenomic analysis in Brazil. *Food Microbiol.* 2020;85:103302. DOI 10.1016/j.fm.2019.103302.  
Meroth C.B., Hammes W.P., Hertel C. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69(1):475-482. DOI 10.1128/AEM.69.1.475-482.2003.  
Minervini F., Lattanzi A., De Angelis M., Di Cagno R., Gobetti M. Influence of artisan bakery- or laboratory-propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012;78(15):5328-5340. DOI 10.1128/AEM.00572-12.  
Müller M., Wolfrum G., Stolz P., Ehrmann M., Vogel R. Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during rye flour fermentation. *Food Microbiol.* 2001;18:217-227. DOI 10.1006/fmic.2000.0394.  
Oshiro M., Tanaka M., Zendo T., Nakayama J. Impact of pH on succession of sourdough lactic acid bacteria communities and their fermentation properties. *Biosci. Microbiota Food Health.* 2020;39(3): 152-159. DOI 10.12938/bmfh.2019-038.

- Picozzi C., Gallina S., Dell Fera T., Foschino R. Comparison of cultural media for the enumeration of sourdough lactic acid bacteria. *Ann. Microbiol.* 2005;55(4):317-320.
- Rizzello C.G., Cavoski I., Turk J., Ercolini D., Nionelli L., Pontonio E., De Angelis M., De Filippis F., Gobbetti M., Di Cagno R. Organic cultivation of *Triticum turgidum* subsp. *durum* is reflected in the flour-sourdough fermentation-bread axis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015;81(9):3192-3204. DOI 10.1128/AEM.04161-14.
- Robert H., Gabriel V., Fontagné-Faucher C. Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific. *Int. J. Food Microbiol.* 2009; 135(1):53-59. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.006.
- Rogalski E., Ehrmann M.A., Vogel R.F. Role of *Kazachstania humilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in the strain-specific assertiveness of *Fructilactobacillus sanfranciscensis* strains in rye sourdough. *Eur. Food Res. Technol.* 2020;9:1817-1827. DOI 10.1007/s00217-020-03535-7.
- Settanni L., Ventimiglia G., Alfonso A., Corona O. An integrated technological approach to the selection of lactic acid bacteria of flour origin for sourdough production. *Food Res. Int.* 2013;54(2):1569-1578. DOI 10.1016/j.foodres.2013.10.017.
- Siragusa S., Di Cagno R., Ercolini D., Minervini F., Gobbetti M., De Angelis M. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(4):1099-1109. DOI 10.1128/AEM.01524-08.
- Van der Meulen R., Scheirlinck I., Van Schoor A., Huys G., Vancanneyt M., Vandamme P., De Vuyst L. Population dynamics and metabolite target analysis during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(15):4741-4750. DOI 10.1128/AEM.00315-07.
- Van Kerrebroeck S., Maes D., De Vuyst L. Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends Food Sci. Technol.* 2017;68:152-159. DOI 10.1016/j.tifs.2017.08.016.
- Viiard E., Bessmeltseva M., Simm J., Talve T., Aaspõllu A., Paalme T. Diversity and stability of lactic acid bacteria in rye sourdoughs of four bakeries with different propagation parameters. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148325. DOI 10.1371/journal.pone.0148325.
- Vogel R.F., Pavlovic M., Ehrmann M.A., Wiezer A., Liesegang H., Offschanka S., Voget S., Angelov A., Böcker G., Lieb W. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microb. Cell Factories.* 2011;10(Suppl. 1): 1-11. DOI 10.1186/1475-2859-10-S1-S6.
- Vogelmann S.A., Hertel C. Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiol.* 2011;28(3):583-589. DOI 10.1016/j.fm.2010.11.010.
- Weckx S., Van der Meulen R., Maes D., Scheirlinck I., Huys G., Vandamme P. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiol.* 2010; 27(8):1000-1008. DOI 10.1016/j.fm.2010.06.005.

#### ORCID ID

V.K. Khlestkin [orcid.org/0000-0001-9605-8028](https://orcid.org/0000-0001-9605-8028)  
M.N. Lockachuk [orcid.org/0000-0001-5074-2457](https://orcid.org/0000-0001-5074-2457)  
O.A. Savkina [orcid.org/0000-0002-2372-4277](https://orcid.org/0000-0002-2372-4277)  
O.I. Parakhina [orcid.org/0000-0002-0508-2813](https://orcid.org/0000-0002-0508-2813)  
L.I. Kuznetsova [orcid.org/0000-0002-1149-6043](https://orcid.org/0000-0002-1149-6043)

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 19-016-00085 «Исследование видового разнообразия и симбиотических взаимодействий в микробиомах крахмало-белковых гидроколлоидных систем (хлебных заквасок)». Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.11.2021. После доработки 27.03.2022. Принята к публикации 28.03.2022.