

УДК 664.642.2; 663.18

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ И СОХРАНЯЕМОСТИ
ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ В ЖИДКОЙ РЖАНОЙ
ЗАКВАСКЕ****О.А. Савкина, М.Н. Локачук, Л.И. Кузнецова, Е.Н. Павловская, В.К. Хлесткин****Санкт-Петербургский филиал ФГАНУ НИИ хлебопекарной промышленности, Россия***ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Россия*

Хлебные закваски являются полуфабрикатом хлебопекарного производства, получаемым в результате сбраживания питательной смеси из муки и воды (или осахаренной мучной заварки) микроорганизмами, применяемыми в хлебопекарной промышленности. В результате микробиологических процессов в заквасках происходят существенные изменения биополимеров муки, накапливаются низкомолекулярные метаболиты, что может приводить к изменению свойств готовых хлебобулочных изделий. Большая часть заквасок на хлебопекарных предприятиях нашей страны выводятся с использованием чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей из коллекции ФГАНУ НИИ хлебопекарной промышленности и его Санкт-Петербургского филиала и ведется в промышленности достаточно длительное время от полугода до года, а иногда и дольше. При этом может происходить изменение микробиома заквасок под влиянием различных экзогенных факторов, таких как состав и собственный микробиом мучной среды, температура, влажность, режим введения свежей питательной среды (мучной болтушки). Динамика изменений в микробиоме заквасок при длительном ведении на сегодняшний день изучена не достаточно. В частности, нет сведений об изменении микробиома отечественных хлебных заквасок в процессе длительного ведения, хотя степень микробной контаминации основного сырья – муки в России и Европе значительно отличается. В России работы по исследованию динамики изменений микробиома ржаных заквасок при длительном ведении проводятся коллективом проекта, включающим в себя сотрудников Санкт-Петербургского филиала НИИХП и Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных.

Цель исследований – изучить динамику микробиома и сохраняемость чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей в жидкой ржаной закваске для хлеба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью исследования динамики микробиоты ржаных заквасок с направленным культивированием микроорганизмов выводили по разводочному циклу и вели жидкую ржаную закваску без заварки. В разводочном цикле применяли чистые культуры молочнокислых бактерий *L. fermentum* 34, *L. parabuchneri* 30, *L. parabuchneri* 26, *L. plantarum* 1 и дрожжей *S. milleri* Чернореченский, *S. cerevisiae* Л-1 из коллекции культур микроорганизмов «Молчнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности» СПбФ ФГАНУ НИИХП. Используемые для выведения заквасок чистые культуры молочнокислых бактерий и дрожжей были выделены из спонтанных заквасок хорошего качества в 1960-х гг. Они были идентифицированы до вида в соответствии с имеющимися на тот момент методиками. Позже, в 1970-хх годах, были проведены дополнительные исследования с помощью более современных методов (метод люминисцирующих антител) [1,2,3]. В рамках темы госзадания № 0593–2019–0006 «Разработать научные основы формирования микробных композиций и биосистем на их основе, обеспечивающих высокое качество и безопасность хлебобулочных изделий» проведена реидентификация промышленно-ценных штаммов молочнокислых бактерий [4].

Для исследования микробных популяций закваски использовали традиционные методы культивирования в сочетании с фенотипическими (физиологическими и биохимическими) и генотипическими методами определения видовой принадлежности микробиоты. Качественный состав микрофлоры и соотношение микроорганизмов определяли при помощи молекулярно-генетических методов.

Количественный состав микрофлоры заквасок определяли методом постоянных окрашенных препаратов по Бургвицу. Количество жизнеспособных клеток дрожжей и молочнокислых бактерий определяли по ГОСТ 10444.12–2013 и ГОСТ 10444.11–2013.

Для выделения ДНК из образцов был использован набор реактивов (MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Soil) компании MACHEREY-NAGEL (Германия) согласно инструкции производителя.

В каждом образце был определен таксономический состав грибного и бактериального сообщества на основании анализа ампликонных библиотек фрагментов рибосомальных оперонов.

С целью исследования влияния микрофлоры на качество полуфабрикатов и хлеба закваску использовали для приготовления хлеба ржаного из обдирной муки формового (ГОСТ 2077–84).

В полуфабрикатах (закваска, тесто) определяли физико – химические показатели (влажность, кислотность, температуру, подъемную силу, содержание летучих кислот и спирта).

В готовых изделиях определяли физико-химические показатели (влажность мякиша по ГОСТ 21094–75; кислотность по ГОСТ 5670–96, пористость – по ГОСТ 5669–96, удельный объем хлеба методом определения вытесненного объема, сжимаемость мякиша с помощью автоматизированного пенетрометра АП-4–1, а также органолептические показатели (вкус, запах, окраска корок и мякиша, состояние пористости и др.). Содержание летучих кислот в заквасках и хлебе определяли полумикрометодом ВНИИХПа, а содержание спирта в полуфабрикатах и хлебе – методом Мартена в его йодометрической модификации, разработанным во ВНИИХПе.

Исследовали влияние микробного состава на накопление химических веществ в закваске и хлебе, а также на вкус и аромат хлеба. Содержание молочной и уксусной кислот определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования микрофлоры жидкой ржаной закваски без заварки показали, что видовой состав микрофлоры в процессе ведения значительно изменялся, что оказало влияние на показатели качества заквасок и хлеба.

В муке, используемой для приготовления жидкой закваски, содержание молочнокислых бактерий было крайне низким и составляло 0,1 %, а дрожжи не были выявлены. В первой фазе разводочного цикла закваски содержание молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* составляло 63 %, так же в незначительном количестве (1,2 %) обнаружены молочнокислые бактерии рода *Weissella*. Присутствовали все четыре внесенных штамма молочнокислых бактерий, из которых доминировал вид *L. parabuchneri*. Дрожжей вида *S.millleri* было 58 %, а вида *S.cerevisiae* – 41 % от общего количества грибной микрофлоры. Содержание посторонних бактерий (семейства *Enterobacteriaceae*) составляло 18–20 %. Также в закваске обнаружены бактерии семейства *Clostridiaceae* (1,7 %).

Во втором освежении производственного цикла содержание молочнокислых бактерий уменьшилось до 48 %, однако внесенные чистые культуры еще присутствовали в достаточном количестве. Содержание дрожжей также уменьшилось: вида *S.millleri* – до 48 %, а вида *S.cerevisiae* – до 28 %. Количество посторонних бактерий (*Enterobacteriaceae*) снизилось до 3 %. Появились плесневые грибы рода *Alternaria* (8,5 %), источником которых является мука. Они сохранялись на протяжении всего периода ведения закваски.

При таком видовом составе микрофлоры жидкая ржаная закваска без заварки в разводочном цикле и первых освежениях производственного цикла имела характерные для нее физико-химические показатели: кислотность 10,2–12,2 град, подъемную силу 13–19 минут, содержание летучих кислот 24,6–31,4 %, спирта 1,67–2,49 %СВ. Закваски имели характерный заквасочный запах. Соотношение дрожжи: МКБ составляло 1: (21–55).

К 42 освежению производственного цикла физико-химические показатели существенно не изменились. Однако отмечалось изменение видового состава лактобацилл: все четыре первоначально внесенные штамма не были выявлены, но появились новые виды *L.pontis* (из муки) и *L.sanfranciscensis* (в муке не обнаружен, источник не известен). Содержание дрожжей также изменилось: *S.millleri* – 61 %, а вид *S.cerevisiae* не обнаруживался. Исчезновение вида *S.cerevisiae* может быть связано с тем, что при ведении закваски в силу технологических причин было отмечено превышение показателя кислотности в некоторых фазах (до 15,4 град). Дрожжи данного вида не являются кислотоустойчивыми (переносят кислотность до 12 град), поэтому они не смогли сохраниться в закваске.

К 81 освежению производственного цикла физико-химические показатели также существенно не изменились, за исключением содержания летучих кислот (снизились в 1,8 раз), что было связано с изменением видового состава лактобацилл: доминировал неуточненный по базе данных GenBank вид *Lactobacillus*, содержание вида *L.pontis* снизилось, а вид *L.sanfranciscensis* не обнаруживался. Из дрожжей присутствовал только вид *S.millleri* (58 %).

К 93 освежению отмечается резкое снижение содержания спирта (в 4–9 раз), ухудшение подъемной силы (до 40 минут), что объясняется значительным снижением содержания клеток дрожжей в закваске. Однако, в общем видовом разнообразии процентное содержание вида *S.millerei* существенно не изменилось (58 %). Видовой состав лактобацилл не изменился по сравнению с 81 освежением.

К 42 и 93 освежению количество молочной кислоты увеличивалось, а уксусной несколько снижалось, что в полной мере подтверждает данные по изменению содержания летучих кислот и изменению видового состава заквасочной микрофлоры.

Изучение влияния микрофлоры заквасок на биотехнологические характеристики закваски в течение длительного времени ее ведения, химический состав и качество хлеба показало следующее. В хлебе, приготовленном на исследуемой закваске 2 – 68 освежений производственного цикла, кислотность составляла 7,6–8,6 градусов. Содержание летучих кислот и спирта в процессе ведения уменьшалось с 36,8 % до 24,4 % и с 0,55 до 0,32 % СВ. Хлеб имел традиционный запах и вкус.

В 93 освежении отмечалось существенное снижение содержания спирта до 0,02 % СВ, что связано со снижением содержания дрожжей в закваске. Хлеб имел выраженный кислый вкус.

Содержание органических кислот в хлебе изменялось также, как и в закваске, что связано с изменением видового состава дрожжей и лактобацилл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что внесение чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей приводит к получению качественной закваски с доминированием правильной бродильной микрофлоры уже в первой фазе разводочного цикла. Однако, при длительном ведении заквасок отмечается значительное изменение видового разнообразия лактобацилл. Штамм дрожжей *S.millerei* при этом сохранялся на протяжении всего периода ведения закваски. Изменение микробиома закваски оказывает существенное влияние на показатели качества закваски и хлеба.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьева, О.В. Микробиология хлебопекарного производства / О.В. Афанасьева; С. – Петер. Фил. Гос. НИИ хлебопекар. Пром-ти (СПб Ф ГосНИИХП). – СПб.: Береста, 2003. – 220 с.
- Каталог культур микроорганизмов «Молочнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности» из Коллекции Санкт-Петербургского филиала ГНУ ГОСНИИХП Россельхозакадемии / О.В. Афанасьева, Е.Н. Павловская, Л.И. Кузнецова. – М.: Россельхозакадемия, 2008. – 98 с.
- Афанасьева, О.В. Микробиологический контроль хлебопекарного производства/ О.В. Афанасьева. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 143 с.
- Локачук М.Н. и др Микрофлора хлебных заквасок. Реидентификация отечественных промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий // Хлебопродукты. – 2020. – № 5. – С. 37–39.