

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ХЛЕБОПЕКАРНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ»

На правах рукописи

ЛОКАЧУК МАРИНА НИКОЛАЕВНА

ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОМА ЗАКВАСОК И РАЗРАБОТКА
МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ
ТЕХНОЛОГИИ ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ
4.3.3. Пищевые системы

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель
Доктор технических наук, профессор РАН
Мартиросян Владимир Викторович

Научный консультант
Кандидат технических наук
Савкина Олеся Александровна

Санкт-Петербург - 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Микробиологическая и технологическая характеристики заквасок, применяемых в технологии хлебобулочных изделий.....	14
1.1.1 Таксономическое разнообразие бактерий и дрожжей в заквасках.....	14
1.1.2 Классификация заквасок по технологическим параметрам в отечественном и зарубежном хлебопечении.....	20
1.2 Закваски спонтанного брожения.....	23
1.2.1 Динамика микробиоты заквасок спонтанного брожения в процессе их ведения.....	23
1.2.2 Характеристика <i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i> - доминирующего вида молочнокислых бактерий в зарубежных заквасках типа I	30
1.3 Закваски с направленным культивированием микроорганизмов.....	34
1.3.1 Микробиота заквасок с направленным культивированием микроорганизмов.....	34
1.3.2 Основные преимущества применения заквасок в технологии хлебобулочных изделий.....	39
1.3.3 Технологические аспекты приготовления теста из ржаной муки.....	40
1.4 Микробные консорциумы для выведения ржаных заквасок.....	41
Заключение по обзору литературы.....	46
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА.....	48
2.1 Организация работы.....	48
2.2 Объекты исследований.....	48
2.3 Методы исследований.....	51

2.3.1 Реидентификация промышленноценных штаммов молочнокислых бактерий	52
2.3.2 Выделение изолятов молочнокислых бактерий из заквасок	53
2.3.3 Методы исследований биотехнологических свойств выделенных изолятов молочнокислых бактерий.....	54
2.3.4 Методы исследований качества сырья.....	55
2.3.5 Методы исследований свойств полуфабрикатов хлебопекарного производства.....	56
2.3.6 Методы исследований качества хлеба.....	61
2.3.7 Способы приготовления заквасок и хлеба.....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	72
3.1 Исследование микробной обсемененности ржаной муки как фактора, влияющего на микробиом заквасок.....	72
3.2 Исследование влияния таксономического состава микробиома ржаных заквасок с направленным культивированием микроорганизмов в процессе их ведения на свойства полуфабрикатов и показатели качества хлеба	74
3.2.1 Реидентификация промышленноценных штаммов лактобацилл, входящих в состав стартовых микробных композиций для заквасок, применяемых в технологии хлебобулочных изделий.....	74
3.2.2 Исследование таксономического состава микробиома густой ржаной закваски в процессе ее ведения.....	79
3.2.3 Исследование биотехнологических свойств густой ржаной закваски в процессе ее ведения.....	81
3.2.4 Исследование влияния густой ржаной закваски на показатели качества ржаного хлеба	86
3.2.5 Исследование таксономического состава микробиома жидкой ржаной закваски без заварки в процессе длительного ее ведения.....	89

3.2.6 Исследование биотехнологических свойств жидкой ржаной закваски без заварки в процессе ее ведения.....	91
3.2.7 Исследование влияния жидкой ржаной закваски без заварки на показатели качества ржаного хлеба	93
3.3 Исследование влияния таксономического состава микробиома ржаных заквасок спонтанного брожения в процессе их ведения на свойства полуфабрикатов и показатели качества хлеба	96
3.3.1 Исследование динамики микробиома заквасок спонтанного брожения в процессе их ведения.....	96
3.3.2 Исследование биотехнологических свойств ржаных заквасок спонтанного брожения в процессе их ведения.....	103
3.3.3 Исследование влияния заквасок спонтанного брожения на показатели качества ржаного хлеба.....	108
3.4 Разработка нового микробного консорциума с улучшенными биотехнологическими свойствами для повышения качества и безопасности хлебобулочных изделий	108
3.4.1 Выделение изолятов молочнокислых бактерий из зрелых густых ржаных заквасок.....	109
3.4.2 Исследование биотехнологических свойств выделенных изолятов молочнокислых бактерий.....	110
3.4.3 Разработка микробного консорциума на основе штамма <i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i> B131 и исследование его влияния на биотехнологические свойства густой ржаной закваски	111
3.5 Исследование влияния на показатели качества и сроки годности хлебобулочных изделий густой ржаной закваски на основе разработанного микробного консорциума.....	118

3.5.1 Исследование влияния на органолептические, физико-химические показатели качества ржаного хлеба и его устойчивость к микробной порче густой ржаной закваски на основе нового микробного консорциума.....	118
3.5.2 Исследование влияния на черствение и срок годности ржаного хлеба густой ржаной закваски на основе нового микробного консорциума.....	121
3.5.3 Исследование влияния на органолептические, физико-химические показатели заварных хлебобулочных изделий и их устойчивость к микробной порче густой ржаной закваски на основе нового микробного консорциума	124
3.5.4 Исследование влияния на черствение и срок годности заварных хлебобулочных изделий густой ржаной закваски на основе нового микробного консорциума	126
3.6 Совершенствование технологии хлебобулочных изделий с применением нового микробного консорциума, расчет экономического эффекта от его внедрения и проведение опытно-промышленной апробации.....	128
ВЫВОДЫ.....	136
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ.....	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	141
Приложение А. Таксономический состав микробиома муки ржаной обдирной и обойной.....	154
Приложение Б. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК промышленноценных штаммов молочнокислых бактерий.....	155
Приложение В. Влияние продолжительности ведения ржаных заквасок спонтанного брожения на показатели качества ржаного хлеба	158
Приложение Г. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК изолята лактобацилл.....	161
Приложение Д. Паспорт штамма <i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i> B131....	162
Приложение Е. Справка о депонировании штамма <i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i> B131.....	164

Приложение Ж. Уведомление о положительном результате формальной экспертизы заявки на изобретение.....	165
Приложение И. Технологические инструкции.....	166
Приложение К. Акты опытно-промышленной апробации хлеба на густой ржаной закваске «Деревенская».....	168
Приложение Л. Приложение Л. Акт внедрения диссертационной работы в курсы повышения квалификации НТЦ «Академия хлебопечения НИИХП».....	176
Приложение М. Дипломы участника конференций.....	177

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В соответствии со Стратегией повышения качества продуктов питания в РФ до 2030 года и национальным проектом «Технологическое обеспечение биоэкономики» одним из приоритетных направлений является стимулирование разработки технологий хлебобулочных изделий с использованием отечественных микробных консорциумов, обеспечивающих высокое качество и безопасность продукции.

Хлебобулочные изделия занимают ведущее место в ежедневном рационе питания населения всех возрастных групп. Эффективным способом управления технологическими процессами производства хлебобулочных изделий является использование заквасок с направленным культивированием микроорганизмов, обеспечивающих быстрое преобладание заквасочных микроорганизмов над микробиотой муки, в том числе нежелательной. Однако к настоящему времени не проводились исследования с применением современных молекулярно-генетических методов видовой принадлежности исходных стартовых культур микроорганизмов и изменений таксономического состава микробиома заквасок при длительном их ведении.

Значительная часть небольших хлебопекарных предприятий используют закваски спонтанного брожения, что не всегда обеспечивает требуемое качество хлебобулочных изделий. Отсутствие знаний о микробном составе муки и заквасок спонтанного брожения не позволяет оценить влияние сформировавшихся микробных сообществ на показатели качества и безопасности хлеба. Исследование микробиома зрелых заквасок позволит осуществить поиск высокоэффективных штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей для разработки новых отечественных заквасочных консорциумов и совершенствования технологии хлебобулочных изделий, обеспечивающей повышение их качества и безопасности.

Степень разработанности темы исследования.

В развитие заквасочных хлебопекарных технологий существенный научно-практический вклад внесли отечественные ученые: Казанская Л. Н., Плотников П. М., Шмидт З. И., Афанасьева О. В., Кузнецова Л. И., Парахина О. И., Богатырева Т. Г., Белявская И. Г., Магомедов Г.О., Китаевская С.В., Жаркова И. М.

Вопросами изучения микробиома заквасок занимались зарубежные ученые: M. Gobbetti, M. G. Gänzle, E. A. Landis, D. Ercolini, E. A. McKenney, F. Minervini, L. De Vuyst, S. Van Kerrebroeck, E. Rogalski.

Однако, несмотря на значительный объем исследований, данных по составу микробиома отечественных ржаных заквасок спонтанного брожения и с направленным культивированием микроорганизмов представлено недостаточно.

Исследование таксономического состава микробиома заквасок и скрининг высокоактивных штаммов микроорганизмов позволят разработать микробный консорциум для управления биотехнологическими свойствами закваски и обеспечения качества и безопасности хлебобулочных изделий, что является своевременным и актуальным.

Цель исследований – анализ таксономического состава микробиома ржаных заквасок и разработка микробного консорциума для совершенствования технологии хлебобулочных изделий, обеспечивающей повышение их качества и безопасности.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- исследовать микробиологические показатели и состав микробиома отечественной ржаной муки;
- определить влияние изменения таксономического состава микробиома заквасок с направленным культивированием микроорганизмов в процессе их ведения на свойства полуфабрикатов и показатели качества хлебобулочных изделий;

- определить влияние изменения таксономического состава микробиома заквасок спонтанного брожения в процессе их ведения на свойства полуфабрикатов и показатели качества хлебобулочных изделий;

- разработать стартовый микробный консорциум на основе выделенных штаммов молочнокислых бактерий с высокими биотехнологическими свойствами для повышения качества и безопасности хлебобулочных изделий;

- выявить влияние на показатели качества и сроки годности хлебобулочных изделий закваски на основе разработанного микробного консорциума;

- совершенствовать технологию хлебобулочных изделий с применением микробного консорциума, рассчитать экономический эффект от его внедрения и провести опытно-промышленную апробацию.

Научная новизна.

Установлено изменение таксономического состава микробиома на уровне семейства *Lactobacillaceae* отечественных заквасок с направленным культивированием в процессе их ведения, обусловленное доминированием лактобацилл видов *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Limosilactobacillus pontis* и *Lactobacillus helveticus*, оказывающее положительное влияние на биотехнологические свойства заквасок и качество хлебобулочных изделий с применением ржаной муки.

Впервые методом высокопроизводительного секвенирования исследован состав микробиома отечественных ржаных заквасок спонтанного брожения и установлено, что в начальный период ведения преобладают нехарактерные представители филумов *Proteobacteria* и *Firmicutes*, которые при дальнейшем ведении закваски вытесняются лактобациллами видов *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Limosilactobacillus pontis*, *Companilactobacillus paralimentarius*, способствующих стабилизации микробиома и улучшению биотехнологических свойств закваски.

Доказано, что состав микробных сообществ ржаной муки не оказывает влияния на микробиом ржанных заквасок спонтанного брожения, превалирующую роль в его формировании играют параметры ведения заквасок.

Установлено улучшение вкусо-ароматического профиля, замедление черствения и повышение устойчивости к микробной порче хлебобулочных изделий на закваске с применением микробного консорциума за счет действия органических кислот, образующихся в результате молочнокислого брожения, обусловленного метаболической активностью нового высокоактивного штамма лактобацилл вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis*.

Теоретическая и практическая значимость работы.

На основании анализа совокупности экспериментальных данных, полученных метагеномными и биотехнологическими методами, подтверждена целесообразность применения ржанных заквасок с направленным культивированием микроорганизмов в хлебопекарной промышленности; расширены теоретические знания в области создания микробных консорциумов для хлебопекарных заквасок и повышения качества хлебобулочных изделий.

Разработан стартовый микробный консорциум на основе штамма *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131, обеспечивающий стабильное качество и безопасность хлебобулочных изделий, выработанных на густой ржаной закваске (заявка № 2025135487 от 12.12.2025 г. на патент «Новые стартеры для ржанных заквасок и способ их применения»). Разработаны, утверждены и внедрены технологические инструкции: по производству микробного консорциума и приготовлению ржаной закваски «Деревенская» на его основе.

Разработаны технологические решения по улучшению органолептических и физико-химических показателей качества хлебобулочных изделий и повышению их устойчивости к микробной порче.

Результаты исследований использованы при формировании основополагающих терминов при создании отраслевого документа ГОСТ 32677-2025 «Хлебопекарное производство. Термины и определения».

Результаты исследований, научные рекомендации и выводы применяются при реализации курсов повышения квалификации для научных сотрудников и специалистов хлебопекарной отрасли в НТЦ «Академия хлебопечения НИИХП».

Проведена опытно-промышленная апробация выработки хлеба на густой ржаной закваске, выведенной с применением нового микробного консорциума на основе молочнокислых бактерий *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 и дрожжей *Kazachstania humilis* Y128, на предприятиях ООО «Опытный хлебозавод» (г. Москва), ООО «Здоровый хлеб» (г. Санкт-Петербург).

Методология и методы исследований. Экспериментальная часть работы выполнена на базе Санкт-Петербургского филиала ФГАНУ НИИХП. Определение состава микробных сообществ заквасок проводили методом высокопроизводительного секвенирования на базе ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. В процессе проведения экспериментов использованы общепринятые микробиологические, физико-химические, органолептические методы исследования сырья, полуфабрикатов и хлебобулочных изделий, а также метод высокопроизводительного метагеномного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina). Обработка экспериментальных данных осуществлялась методами математической статистики.

Научные положения, выносимые на защиту:

- научно-практическое обоснование целесообразности применения ржаных заквасок с направленным культивированием микроорганизмов для обеспечения стабильного качества хлебобулочных изделий;
- экспериментальные данные по исследованию морфологических, культуральных и биотехнологических свойств штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из зрелых ржаных заквасок;
- совокупность технологических режимов, обеспечивающих повышение качества и увеличение сроков годности хлебобулочных изделий с применением закваски на новом микробном консорциуме.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует пунктам 3, 28 паспорта специальности 4.3.5. «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ»; пункту 4 паспорта специальности 4.3.3 - «Пищевые системы».

Степень достоверности и апробация результатов.

Исследования проведены на современном метрологически аттестованном оборудовании, достоверность полученных результатов основана на 3-х кратной повторности с применением стандартизированных и специальных методов анализа, а также статистической обработкой результатов исследований в Microsoft Excel 2010.

Основные результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на конференциях: «Поландовские чтения» (Санкт-Петербург, 2021; Москва, 2025); «Современные пищевые тенденции глазами молодых ученых: перспективы, инновации и прогрессивные технологии» (Санкт-Петербург, 2021); «От модернизации к опережающему развитию: обеспечение конкурентоспособности и научного лидерства АПК» (Екатеринбург, 2022, 2023); «Повышение качества и безопасности пищевых продуктов» (Махачкала, 2022); «Техника и технология пищевых производств» (Могилев, 2022, 2024); Международная научно - практическая конференция имени Д. И. Менделеева (Тюмень, 2022 г); «Химия. Экология. Урбанистика» (Пермь, 2023); «Нутрициология и диетология для здоровьесбережения населения России» (Москва, 2023); «Интеллектуальный потенциал молодых ученых как драйвер развития АПК» (Санкт-Петербург, 2025); «Оптимальное питание - основа продолжительной и активной жизни» (Москва, 2025).

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора.

Исследования были выполнены в рамках государственного задания №2593-2014-0018 «Разработать научные основы формирования микробных композиций и биосистем на их основе, обеспечивающих высокое качество и безопасность хлебобулочных изделий» и гранта РФФИ № 19-016-00085 «Исследование видового

разнообразия и симбиотических взаимодействий в микробиомах крахмало-белковых гидроколлоидных систем (хлебных заквасок)». Автором самостоятельно проведен анализ отечественной и зарубежной научно-технической литературы, сформулированы цели и задачи исследования, определены выбор и обоснование экспериментальных методов исследования, выполнены микробиологические исследования, математическая обработка полученных результатов, полученные результаты систематизированы и изложены в тексте работы, сформулированы выводы, проведена подготовка публикаций и научных докладов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 статей, в том числе - 8 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, 2 статьи в журналах, индексируемых в международных базах научного цитирования Web of Science и Scopus, а также 3 статьи в сборниках материалов конференций.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 156 страницах основного текста, включает 32 рисунка, 31 таблицу и 11 приложений. Список литературы содержит 143 источника, в том числе 29 российских и 114 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Микробиологическая и технологическая характеристики заквасок, применяемых в технологии хлебобулочных изделий

1.1.1 Таксономическое разнообразие бактерий и дрожжей в заквасках

Закваска – полуфабрикат хлебопекарного производства, получаемый сбраживанием питательной смеси чистыми культурами молочнокислых бактерий или молочнокислых бактерий и дрожжей, или других микроорганизмов, применяемых в хлебопекарном производстве (ГОСТ 32677-2025).

Молочнокислые бактерии (далее МКБ) и дрожжи играют важную роль в процессе брожения заквасок. Показатели качества заквасок и, следовательно, хлеба во многом зависят от микробиоты заквасок.

Микробиота заквасок представлена ограниченным количеством видов микроорганизмов: молочнокислые бактерии (преимущественно *Lactobacillaceae*), дрожжи (*Ascomycota*) и редко уксуснокислые бактерии (*Alphaproteobacteria*) [61, 64].

В заквасках с направленным культивированием заквасочные микроорганизмы вносят в водно-мучную питательную смесь в виде чистых культур или бакконцентратов [4]. В заквасках спонтанного брожения источником микроорганизмов может быть применяемое сырье, воздушная среда, поверхности оборудования [64].

Экосистемы заквасок представляют собой устойчивые ассоциации молочнокислых бактерий и дрожжей, обусловленные специальными питательными, трофическими и метаболическими взаимодействиями. Закваска с микробиологической точки зрения может рассматриваться как специфическая и стрессовая экосистема, что объясняется следующими факторами: 1) переменной концентрацией углеводов (в частности мальтозы) и других питательных веществ, возникающей во время постоянных освежений заквасок и зависящей от

продолжительности брожения, 2) низким значением рН (около 4,0), 3) ограниченным доступом кислорода. Перечисленные факторы в совокупности обеспечивают развитие только специфической микробиоты посредством адаптации [62, 63].

Содержание молочнокислых бактерий в заквасках как минимум в десять раз ($\geq 10^8$ КОЕ/г) превышает количество дрожжей ($\leq 10^7$ КОЕ/г). Соотношение дрожжи: МКБ обычно варьирует от 1:10 до 1:100 [4]. В отечественном хлебопечении для каждого вида заквасок установлено оптимальное соотношение дрожжи: МКБ, которое составляет 1:60-1:80 для густой ржаной закваски; 1:10-1:27 для жидкой ржаной закваски с заваркой; 1:37-1:57 – для жидкой ржаной закваски без заварки [4].

Молочнокислые бактерии - обширная гетерогенная группа микроорганизмов, образующих в результате брожения в качестве основного конечного метаболита молочную кислоту. Молочнокислые бактерии - грамположительные, каталазоотрицательные (или образующие псевдокаталазу), неспорообразующие, анаэробные (аэротолерантные) бактерии в форме палочек или кокков. Согласно современной филогенетической классификации МКБ относятся к типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales* [26, 36].

Молочнокислые бактерии, обнаруживаемые в заквасках, принадлежат к следующим семействам: *Lactobacillaceae* (роды *Fructobacillus*, *Lactobacillus* (по классификации до марта 2020 г), *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus* и *Weissella*), *Enterococcaceae* (в частности роды *Enterococcus* и *Tetragenococcus*) и *Streptococcaceae* (роды *Lactococcus* и *Streptococcus*). При этом в заквасках чаще обнаруживаются МКБ рода *Lactobacillus* (в соответствии с таксономией, действующей до марта 2020 г). Помимо лактобацилл в заквасках также могут быть другие субдоминантные виды молочнокислых бактерий, включая представителей родов *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* и *Streptococcus*. В заквасках с более высоким значением рН (>4,0) обычно преобладают бактерии родов *Enterococcus*, *Lactococcus*,

Leuconostoc, *Pediococcus*, *Streptococcus* и *Weissella*, которые обычно присутствуют и в муке [60, 71, 78, 133].

В 2020 г таксономия лактобацилл была существенно пересмотрена. Предпосылкой к изменениям послужило многообразие бактерий рода *Lactobacillus*, который включал в 2020 г 261 вид. Группой ученых была проведена реклассификация рода *Lactobacillus* на основе полифазного таксономического подхода, в результате которого было выделено 25 родов, в том числе измененные *Lactobacillus* и *Paralactobacillus* (гомоферментативные), и 23 новых рода (определены в 2020 г, включают микроорганизмы, ранее классифицированные как виды *Lactobacillus*), среди которых гомоферментативные *Amylolactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus* и гетероферментативные *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Lentilactobacillus* [93, 111, 117, 143].

Проведенные исследования позволили дифференцировать МКБ на две группы:

-гомоферментативные, которые сбраживают гексозы по пути Эмбдена-Мейергофа, образуя пируват в качестве ключевого промежуточного продукта метаболизма,

-гетероферментативные молочнокислые бактерии - метаболизируют гексозы через фосфокетотазный путь до пирувата и ацетилфосфата в качестве ключевых промежуточных продуктов [117, 143].

Метаболизм пентозы считается вариабельным. Таким образом, в настоящее время путь ферментации гексоз является признаком на уровне рода, а не вида [143].

Изменения в таксономии молочнокислых бактерий затронули и номенклатуру некоторых видов заквасочных лактобацилл. По последним данным в заквасках встречаются 62 вида гомоферментативных и 49 видов гетероферментативных МКБ [78]. Виды лактобацилл, обнаруживаемые в заквасках, представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Виды гомоферментативных и гетероферментативных лактобацилл, обнаруживаемые в заквасках [78].

Род лактобацилл	Вид лактобацилл
Гомоферментативные	
<i>Lactobacillus</i>	<i>amylolyticus, amylovorus, crispatus, helveticus, delbrueckii, acetotolerans, gallinarum, amylovorus, garvieae, johnsonii, ultunensis</i>
<i>Companilactobacillus</i>	<i>alimentarius, paralimentarius, crustorum, farciminis, nantensis, mindensis, kimchi, heilongjiangensis</i>
<i>Lacticaseibacillus</i>	<i>casei, paracasei, rhamnosus, pantheris, zaeae, saniviri, songhuajiangensis</i>
<i>Latilactobacillus</i>	<i>sakei, curvatus, graminis</i>
<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>plantarum, paraplantarum, pentosus, xiangfangensis</i>
<i>Loigolactobacillus</i>	<i>coryniformis</i>
<i>Schleiferilactobacillus</i>	<i>harbinensis, perolens</i>
<i>Ligilactobacillus</i>	<i>salivarius, agilis</i>
<i>Amylolactobacillus</i>	<i>amylophilus</i>
Гетероферментативные	
<i>Furfurilactobacillus</i>	<i>rossiae, siliginis siliginis</i>
<i>Limosilactobacillus</i>	<i>fermentum, mucosae, panis, pontis, reuteri, secaliphilus, frumenti, secaliphilus</i>
<i>Levilactobacillus</i>	<i>brevis, acidifarinae, hammesii, koreensis, namurensis, parabrevis, spicheri, zymae, senmaizukei, acidifarinae</i>
<i>Fructilactobacillus</i>	<i>sanfranciscensis, fructivorans, lindneri</i>
<i>Lentilactobacillus</i>	<i>buchneri, parabuchneri, kefir, diolivorans, hilgardii, kisonensis, farraginis, otakiensis</i>
<i>Secundilactobacillus</i>	<i>odoratitofui, malefermentans, collinoides</i>

Новая таксономия молочнокислых бактерий, опубликованная в 2020 г в работе J. Zheng и соавт. [143], существенно повышает разрешение высокопроизводительного секвенирования при изучении таксономической структуры микробиома заквасок. Так, например, при применении устаревшей таксономии выявлено, что в заквасках преобладают МКБ рода *Lactobacillus*, а в случае применения новой таксономии от 2020 г - роды *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, что способствует более точному описанию микробиома заквасок для более глубокого понимания микробных экосистем. Большинство баз данных последовательностей 16S рНК в настоящее время

приняли таксономические изменения семейства *Lactobacillaceae*. Следует отметить, что новая реклассификация МКБ отражает филогенетическое положение микроорганизмов и группирует лактобациллы в клады с общими экологическими и метаболическими свойствами [143].

В заквасках чаще всего обнаруживают менее трех видов молочнокислых бактерий. Микробиота заквасок отличается низким альфа - разнообразием (разнообразием внутри сообщества) и высоким бета - разнообразием (разнообразием между сообществами). Как правило, количество видов дрожжей, выделенных из одной закваски, равно или меньше обнаруживаемых видов молочнокислых бактерий [71, 72, 133].

В заквасках, как правило, доминируют один или два вида дрожжей. Подавляющее большинство дрожжей, обнаруженных в заквасках, относятся к семейству *Saccharomycetaceae* (тип *Ascomycota*, подтип *Saccharomycotina*, класс *Saccharomycetes*, порядок *Saccharomycetales*). Среди этого семейства наиболее часто обнаруживают два рода: *Saccharomyces* и *Kazachstania*. Наиболее широко распространены виды дрожжей – *S. cerevisiae* и *K. humilis*. Остальные описанные виды дрожжей относятся к родам *Pichia*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces*, *Yarrowia*. Следует отметить, что вид дрожжей *K. exigua*, ранее известный как *S. exigua*, возможно ошибочно идентифицирован в некоторых исследованиях и принят за близкородственные виды, такие как *K. humilis* [54, 63, 65, 78, 89, 131].

При исследовании французских заквасок было обнаружено восемь видов рода *Kazachstania*, в то время как род *Saccharomyces* был представлен только двумя видами (*S. uvarum* и *S. cerevisiae*). Дрожжи вида *S. cerevisiae* были обнаружены в 53 % образцов заквасок, однако доминировали (относительная численность более 50 %) только в 24 % проб. Доминирующее положение в заквасках занимали дрожжи рода *Kazachstania* (в 54 % проб), на уровне видов преобладали *K. humilis* и *K. bulderi* [105].

В заквасках происходят определенные взаимодействия между МКБ и дрожжами, которые могут быть синергическими, антагонистическими или

нейтральными [96, 99]. Выделяют следующие типы взаимодействий между микроорганизмами:

а) конкуренция за источники питания (ферментируемые углеводы, источники азота). Дрожжи *S. cerevisiae* и МКБ *Fructilactobacillus sanfranciscensis* конкурируют за глюкозу и мальтозу [96];

б) аменсализм (один организм оказывает негативное влияние на другой). МКБ могут продуцировать бактериоцины, которые ингибируют рост дрожжей, например, реутерин (*Limosilactobacillus reuteri*) и плантарицин (*Lactiplantibacillus plantarum*) [96];

в) комменсализм (один из микроорганизмов использует вторичные метаболиты другого). Дрожжи обогащают закваску рядом метаболитов: витаминами (рибофлавином, пантотеновой кислотой) и аминокислотами, в которых нуждаются МКБ. Дрожжи вида *S. cerevisiae* продуцируют валин и лейцин, которые являются фактором роста для некоторых молочнокислых бактерий, в том числе *Lactiplantibacillus plantarum* [128];

г) мутуализм (два разных организма получают преимущество от совместного существования). Например, МКБ вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis* могут ферментировать мальтозу, выделяя и накапливая в среде глюкозу, которая затем может использоваться дрожжами вида *K. humilis*, не сбраживающими мальтозу. Дрожжи могут гидролизовать сахарозу, обеспечивая фруктозой молочнокислые бактерии [96, 99] (Рисунок 1).

Дрожжи продуцируют спирт, который угнетает развитие посторонних видов бактерий, однако не влияет на молочнокислые бактерии. МКБ образуют молочную кислоту, подавляющую развитие гнилостных и маслянокислых бактерий, присутствие которых губительно для дрожжей [4].

Известно, что диоксид углерода, продуцируемый дрожжами в результате спиртового брожения, также может стимулировать рост молочнокислых бактерий, например видов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* и *Lactiplantibacillus plantarum* [99].

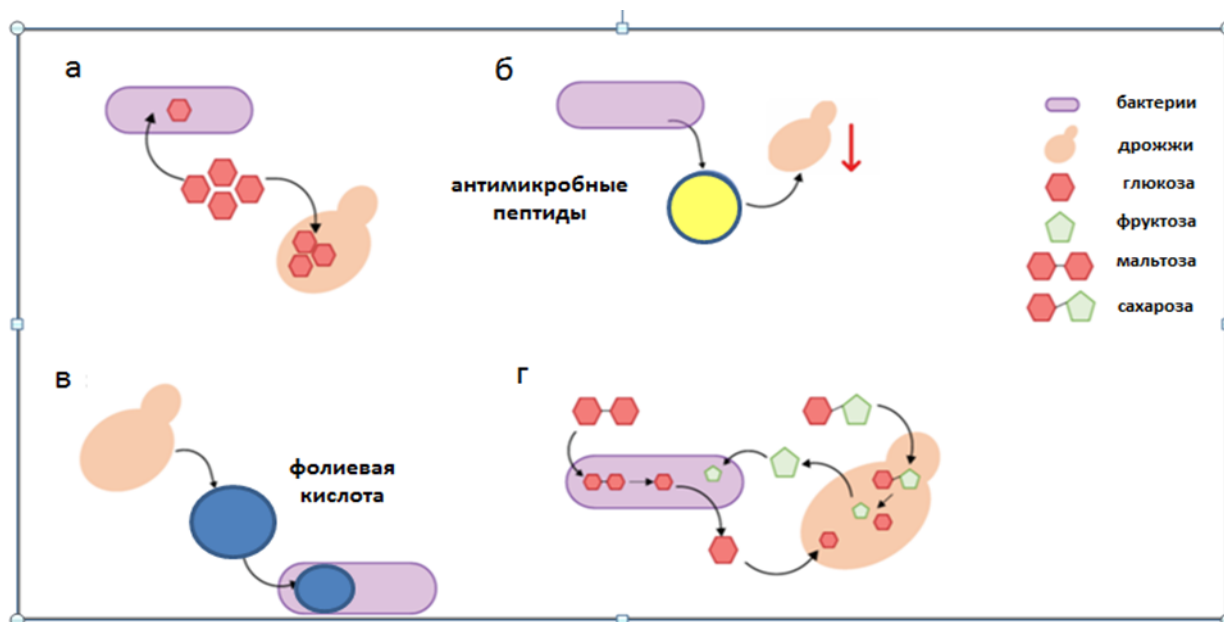


Рисунок 1- Основные формы взаимоотношений между МКБ и дрожжами в заквасках: а) конкуренция, б) аменсализм; в) комменсализм; г) мутуализм [99]

Второй группой бактерий, обнаруживаемой в заквасках, являются уксуснокислые бактерии - грамотрицательные, каталазоположительные, оксидазоотрицательные, неспорообразующие аэробные бактерии, принадлежащие к α - протеобактериям. В заквасках чаще встречаются представители родов *Acetobacter* и/или *Gluconobacter* [48, 53, 63, 92]. Были обнаружены следующие виды уксуснокислых бактерий: *A. cerevisiae*, *A. fabarum*, *A. indonesiensis*, *A. lovaniensis*, *A. malorum*, *A. orleanensis*, *A. oryzifermentans*, *A. pasteurianus*, *A. senegalensis*, *A. sicerae*, *A. tropicalis*, *G. cerinus*, *G. frateurii*, *K. sucrofermentans*, *K. xylinus* [63].

1.1.2 Классификация заквасок по технологическим параметрам в отечественном и зарубежном хлебопечении

В отечественном хлебопечении закваски классифицируют по следующим показателям: влажность, температура брожения, состав питательной смеси (водно-мучная, заварка или смесь муки, воды и заварки). Основные виды ржаных и пшеничных заквасок представлены в «Сборнике современных технологий хлебобулочных изделий» [24].

В зарубежном хлебопечении классификация заквасок существенно отличается от классификации, принятой в отечественном хлебопечении. Выделяют четыре типа заквасок (Рисунок 2).

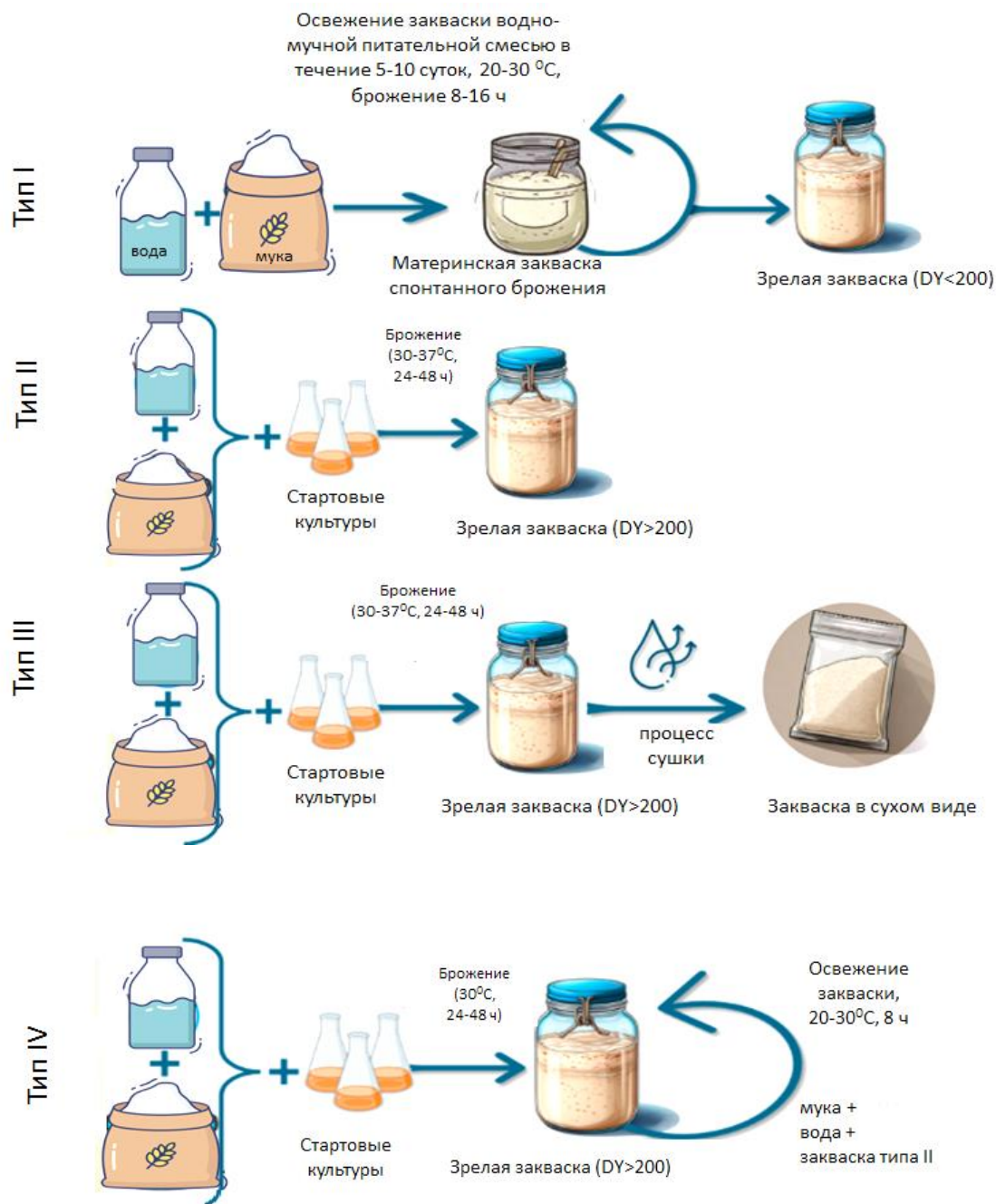


Рисунок 2 - Основные типы заквасок в соответствии с зарубежной классификацией [49]

Закваски типа I или традиционные густые закваски ($DY < 200$) являются заквасками спонтанного брожения, которые обычно ведут в небольших пекарнях или домашних условиях. Закваски типа I ежедневно освежают водно-мучной питательной смесью для поддержания микроорганизмов в активном состоянии. Продолжительность ферментации составляет от 6 до 24 ч при температуре окружающей среды (20-30 °C). Показатель активной кислотности - pH составляет около 4,0. Доминирующее положение в заквасках занимают МКБ *Fructilactobacillus sanfranciscensis* и дрожжи *K. humilis*. Также встречаются *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Companilactobacillus (crustorum, mindensis, nantensis, paralimentarius)*, *Leuconostoc*, *Weissella* [34, 49, 61, 63, 71, 93, 96, 99, 127].

В обзоре Gänzle M.G. [72] представлены данные о микробной популяции 227 заквасок типа I, которые были отобраны во Франции, Италии, Бельгии, Германии, Канаде, США. Показано, что в большинстве заквасок обнаруживали гетероферментативные виды молочнокислых бактерий отдельно или совместно с гомоферментативными. Вид *Fructilactobacillus sanfranciscensis* обнаруживали в большинстве исследуемых заквасок (в 178 образцах).

Закваски типа II или промышленные закваски представляют собой жидкие закваски ($DY > 200$), для выведения которых применяют стартовые культуры заквасочных микроорганизмов. Этот тип заквасок отличается длительным одноэтапным процессом брожения (обычно 24-72 ч) при температуре 30-37 °C. Процесс брожения заквасок обычно осуществляют в ферментаторах. Значение pH составляет менее 4,0, поэтому развиваются кислотоустойчивые виды МКБ родов *Limosilactobacillus* (виды *pontis*, *panis*, *frumenti*, *reuteri*) и *Lactobacillus* (виды *delbrueckii*, *amylovorus*, *crispatus*, *acidophilus*) [42, 61, 63, 96, 99, 127].

Закваски типа III выводят по аналогии с заквасками типа II путем инокуляции водно-мучной питательной смеси стартовыми культурами заквасочных микроорганизмов, а затем высушивают с помощью барабанной или распылительной сушки. При приготовлении теста на заквасках типа II и III необходимо добавлять хлебопекарные дрожжи, так как в таких заквасках дрожжи

инактивированы за счет высокой кислотности (закваски типа II) или в процессе сушки (закваски типа III). Указанные закваски применяют в качестве подкислителей [34, 42, 61, 63, 96, 99, 127].

Закваска типа IV представляет собой комбинацию заквасок типа I и типа II. Для выведения применяют стартовые культуры заквасочных микроорганизмов, а затем выброженную закваску ежедневно поддерживают путем регулярных освежений водно-мучной питательной смесью [42, 99, 112].

По способу формирования микробиома закваски можно классифицировать на два вида:

- 1) закваски спонтанного брожения;
- 2) закваски с направленным культивированием микроорганизмов

1.2 Закваски спонтанного брожения

1.2.1 Динамика микробиоты заквасок спонтанного брожения в процессе их ведения

В последние годы благодаря активному применению метагеномных подходов появились многочисленные публикации, посвященные изучению микробиома заквасок спонтанного брожения в странах Европы, США, Азии [35, 37, 48, 58, 80, 92, 97, 102, 104, 108, 137]. В заквасках спонтанного брожения источником микроорганизмов являются сырье (мука, зерновые продукты, фрукты, хмель, мед, травы, кефир, уксус, йогурт, вода), воздушная среда, поверхности оборудования и инвентаря, руки пекаря [8, 93, 118, 121].

В заквасках спонтанного брожения направление процесса ферментации определяют достаточно высокая исходная обсемененность муки (более $4 \lg$ КОЕ/г), содержание и доступность питательных веществ, параметры водно-мучной питательной смеси (температура, влажность, активная кислотность (pH), титруемая кислотность, содержание кислорода), а также продолжительность ферментации и охлаждения [63].

На формирование микробиома заквасок оказывает влияние большое количество факторов (Рисунок 3): физических, химических и биологических [42, 46, 52, 61, 63, 96, 99, 114, 133]. Однако влияние многих из перечисленных факторов изучено недостаточно.



Рисунок 3 - Факторы, влияющие на микробиоту заквасок [46]

Многочисленные зарубежные исследования показывают, что в процессе ведения заквасок спонтанного брожения, динамика популяции молочнокислых бактерий представляет собой «трехстадийную эволюцию» [46, 52, 61, 63, 67, 85, 106, 113, 114].

Брожение водно-мучной питательной смеси начинается с автохтонных, неспецифичных для заквасок бактерий, таких как протеобактерии, стафилококки и молочнокислые бактерии родов *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*. Далее начинают преобладать молочнокислые бактерии, принадлежащие к *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* и *Weissella*), которые способствуют быстрому подкислению водно-мучной питательной смеси. На

заклучительном этапе начинают превалировать специфичные для заквасок роды и виды молочнокислых бактерий (Рисунок 4), которые характерны для зрелых заквасок (*Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Companilactobacillus paralimentarius*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Pediococcus pentosaceus*) [63, 113].

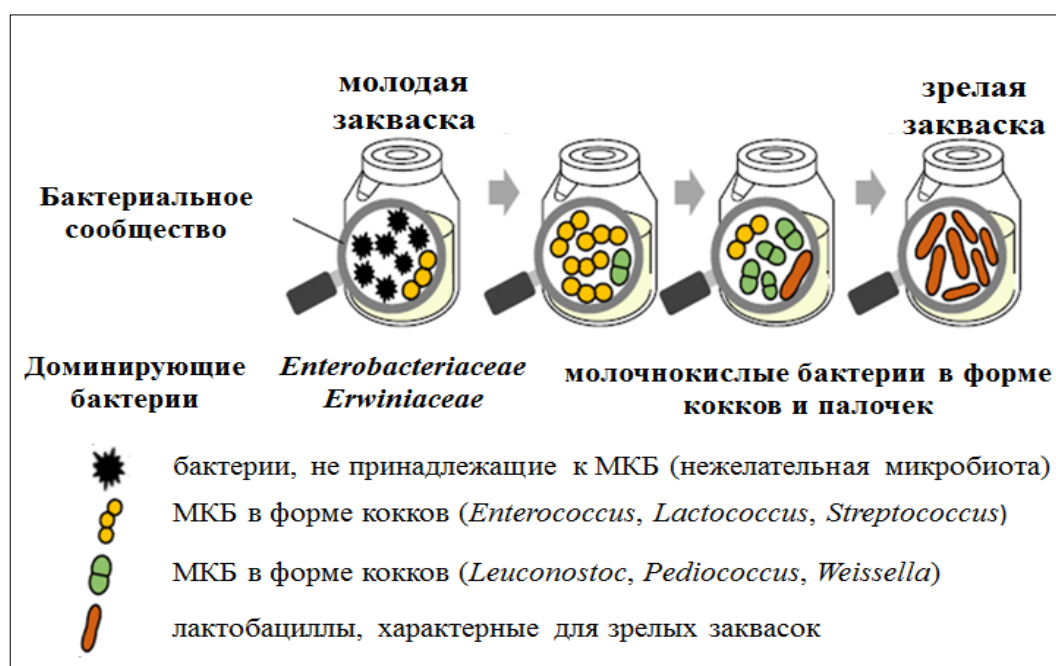


Рисунок 4 - Динамика популяции молочнокислых бактерий в заквасках спонтанного брожения [113]

В 2020 г J. Woreczek и соавт. [40] исследовали динамику бактериальной микробиоты трех польских заквасок спонтанного брожения, выведенных с использованием цельнозерновой муки: пшеничной, полбяной и ржаной. Закваски были приготовлены путем ферментации водно-мучной питательной смеси (DY 150, фактическая влажность 65 %) при 30 °C в ферментаторе BIO-FM-Ž 400 (Biostar), освежение закваски проводили дважды через каждые 24 ч. Установлено, что на третьи сутки во всех образцах заквасок доминировали бактерии рода *Lactobacillus*, далее следовали неклассифицированные представители *Lactobacillales*, неклассифицированные представители *Lactobacillaceae*, *Weissella*. Изучение динамики таксономической структуры микробиома ржаной закваски показало, что через 24 ч ферментации содержание *Weissella* было выше (36 %), чем *Lactobacillus*

(30 %). Однако в процессе ведения закваски доля *Weissella* снижалась (11 % через 48 ч; 5 % через 72 ч), в то время как доля *Lactobacillus* увеличивалась (52 % через 48 ч; 67 % через 72 ч). Содержание рода *Weissella* в других заквасках в процессе ведения также уменьшалось.

В 2018 г F. Minervini и соавт. [108] была изучена динамика структуры и разнообразия микробиома итальянских заквасок спонтанного брожения (DY 145-152), выведенных с использованием пшеничной муки (*Triticum durum* и *Triticum aestivum*) и поддерживаемых в трех ремесленных пекарнях в течение 12 месяцев, с применением культурально-зависимых и культурально-независимых подходов. Установлено, что в двух заквасках, которые вели при температуре 13-26,5 °С, доминирующее положение занимали лактобациллы вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, которые были обнаружены в используемой муке и на поверхностях технологического оборудования. В закваске, которую вели при температуре 10 °С и освежали каждые 24 ч, преобладали МКБ *Weissella cibaria*, часто доминирующие в пищевых продуктах (кимчи), ферментированных при низких температурах 10–15 °С [47]. Таким образом, превалирование *Weissella* в одной из исследуемых пшеничных заквасок является, по мнению авторов, результатом нескольких факторов: 1) обнаружением *Weissella* в используемой муке и на поверхностях технологического оборудования; 2) низкой температурой ферментации; 3) возможностью развития *Weissella* при более высоких значениях pH (4,5–4,8).

D. Ercolini и соавт. [67] исследовали динамику микробной популяции в итальянских заквасках спонтанного брожения (DY 160) из муки ржаной (*Secale cereale*) и пшеничной (*Triticum durum* и *Triticum aestivum*). Первая фаза брожения составляла 8 ч при температуре 25 °С, а при дальнейшем ведении заквасок в течение десяти суток продолжительность ферментации составляла 5 ч при 25 °С, после чего закваски выдерживали при температуре 10 °С. Показано, что в водно-мучных питательных смесях до брожения доминировали представители филума *Proteobacteria*, остальные филумы содержались в низком количестве, но уже в конце первой фазы брожения преобладали представители *Firmicutes*.

Следовательно, всего за одну фазу брожения происходит переход от *Proteobacteria* к *Firmicutes*.

В водно-мучных питательных смесях идентифицированы роды, принадлежащие к филумам *Proteobacteria* (например, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*) и *Bacteroidetes* (род *Chryseobacterium*). С некоторыми количественными вариациями эти бактерии сформировали общую популяцию бактерий ржаной и пшеничной муки. В процессе брожения (8 ч при 25 °С) эта популяция практически полностью ингибировалась. Единственным исключением являлось семейство *Enterobacteriaceae* (например, род *Enterobacter*), содержание которого даже увеличивалось во время ведения заквасок. Эти бактерии обнаруживали в пшеничных заквасках до пяти суток ведения. Энтеробактерии сохранялись некоторое время благодаря определенной устойчивости к кислотному стрессу. Для их ингибирования потребовалось несколько суток ведения закваски, что практически совпало с формированием зрелой закваски [67].

В ржаной закваске доминирующее положение занимали МКБ рода *Weissella* (94,3 %), который был выявлен в используемой партии муки, при этом остальные роды отличались низкой представленностью. Род *Weissella* оставался доминирующим на протяжении всего периода ведения заквасок. Однако через 10 суток ведения доля *Weissella* снизилась до 55,6 %, были выявлены роды *Lactobacillus* (32,5 %) и *Pediococcus* (6,3 %).

В пшеничных заквасках из твердых сортов пшеницы через сутки брожения преобладали *Weissella* (36,3 %), *Lactococcus* (28,8 %), *Leuconostoc* (10,3 %) и *Lactobacillus* (6,2 %). Через 10 суток доминирующее положение занимал род *Lactobacillus* (56,4 %), за которым следовали *Leuconostoc* (18,7 %), *Lactococcus* (11,1 %) и *Weissella* (8,8 %).

М. Bessmeltseva и соавт. [37] изучили динамику микробной популяции в ржаных заквасках (DY 200) спонтанного брожения, поддерживаемых при температурах 20 и 30 °С в течение 56 освежений. В заквасках, которые вели при 30 °С, через 56 освежений доминирующее положение занимал вид

Companilactobacillus paralimentarius (ранее *L. paralimentarius*). Показано, что в трех заквасках, поддерживаемых при 20 °С, даже приготовленных с применением ржаной муки из одного мешка, таксономическая структура микробиома на уровне семейства *Lactobacillaceae* значительно различалась, что, по мнению авторов, может быть объяснено низким содержанием МКБ в применяемой муке (менее 7 %) и использованием для приготовления заквасок небольшого количества муки, что в итоге способствовало неравномерному распределению лактобацилл в параллельных экспериментах. Так, в первой закваске преобладали *Companilactobacillus paralimentarius/kimchii* (ранее *L. paralimentarius/kimchii*) и *Levilactobacillus brevis* (ранее *L. brevis*), во второй - *Companilactobacillus crustorum* (ранее *L. crustorum*) и *Levilactobacillus brevis*, в третьей – *Lactiplantibacillus plantarum* (ранее *L. plantarum*) и *Levilactobacillus brevis*.

В 2023 г Е. А. McKenney и соавт. [102] исследовали изменение таксономической структуры микробиома заквасок, выведенных с использованием десяти различных сортов муки и поддерживаемых путем регулярных освежений в течение 14 суток. Как и предполагалось авторами, состав бактериальных таксонов в заквасках через сутки брожения определялся таксонами, содержащимися в муке и сырье. Например, *Pantoea* и *Enterobacteriaceae* доминировали как в образцах муки (33,1 и 20,3 % соответственно), так и в образцах заквасок через сутки брожения (23,8 и 26,7 % соответственно). Бактерии рода *Pseudomonas* обнаружены в относительно одинаковом количестве в воде (13 %), муке (10,1 %) и в заквасках через сутки брожения (12 %).

В молодых заквасках (менее 3 суток ведения) были обнаружены *Erwinia* (11,5 %), *Pseudomonas* (12,8–18,2 %), *Klebsiella* (11,2–13,2 %), *Pantoea* (21,3 %), *Enterobacteriaceae* (16,3–28,5 %), доля которых снижалась в процессе ведения заквасок. Молочнокислые бактерии родов *Weissella*, *Leuconostoc* и *Latilactobacillus* преобладали в заквасках с первые по десятые сутки, в то время *Levilactobacillus*, *Gluconobacter* и *Pediococcus* — в более зрелых заквасках (≥ 10 суток). Показано, что в двух заквасках через 14 суток ведения формировались уникальные микробные

сообщества. Так, в заквасках на муке из тефф преобладали роды *Pediococcus* (79,2 %) и *Leuconostoc* (18,1 %), однако не были обнаружены лактобациллы; а в закваске на амарантовой муке доминирующее положение занимал род *Latilactobacillus* (70,3 %).

Таким образом, полученные Е. А. McKenney и соавт. результаты соответствуют теории «трехстадийной эволюции». Пекари часто применяют «правило 10 дней», используя закваски для выпечки хлеба только после десяти суток ведения. Полученные авторами результаты подтвердили, что закваски пригодны для выпечки через десять суток ведения независимо от сорта применяемой муки.

Микробные сообщества заквасок следовали схожим моделям сукцессии в отношении меры равномерности: индексы биоразнообразия Симпсона и Шеннона (учитывает число видов и степень их доминирования) первоначально увеличивались, достигая максимума на 3–6 сутки ведения заквасок, а затем снижались на 10 сутки, что по времени совпадало с преобладанием *Lactobacillaceae* и стабилизацией значения pH.

Весьма неожиданной оказалась высокая доля уксуснокислых бактерий рода *Gluconobacter* (12,6–45,8 %) в семи исследованных заквасках. Полученные результаты позволяют предположить, что уксуснокислые бактерии могут играть более значимую роль в заквасках, чем считается в настоящее время.

Е. А. Landis и соавт. [92] провели масштабные исследования по изучению микробного разнообразия около 500 заквасок, большая часть из которых (83 %) поддерживалась в домашних условиях. Большинство образцов (429) были отобраны в США. Показано, что в заквасках преобладают гетероферментативные *Levilactobacillus brevis* (56 % заквасок), *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (30 %) и *Furfurilactobacillus rossiae* (15 %) и гомоферментативные молочнокислые бактерии *Lactiplantibacillus plantarum* (39 %), *Companilactobacillus paralimentarius* (28 %) и *P. parvulus* (26 %). Установлено, что виды *Lactiplantibacillus plantarum* и *Levilactobacillus brevis* обычно доминируют в молодых заквасках, в то время как

виды *Fructilactobacillus sanfranciscensis* и *P. parvulus* - в зрелых заквасках. Также исследователями в 147 заквасках были обнаружены уксуснокислые бактерии родов *Acetobacter*, *Gluconobacter* или *Komagataeibacter* (относительная численность >1 %), которые, по мнению авторов, исторически недооценивались в большинстве ранее проведенных исследований. Это факт, по мнению авторов, может иметь следующие объяснения: 1) отсутствие метагеномных подходов в проводимых исследованиях; 2) выбор питательных сред и условий культивирования, не подходящих для роста уксуснокислых бактерий. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять, каким образом летучие органические соединения, продуцируемые уксуснокислыми бактериями, влияют на качество выпеченного хлеба на закваске.

Е.А. Landis и соавт. [92] продемонстрировали, что географическое положение не определяет таксономическую структуру микробиома заквасок. Полученные результаты не подтверждают распространенное представление о региональной принадлежности микробиомов закваски (например, широко известная «закваска Сан-Франциско»). Этот факт возможно объяснить перемещением муки, заквасок, стартеров между странами, что стирает региональные различия в видах бактерий и дрожжей, которые могут содержаться в заквасках.

1.2.2 Характеристика *Fructilactobacillus sanfranciscensis* - доминирующего вида молочнокислых бактерий в зарубежных заквасках типа I

В результате анализа зарубежной литературы можно сделать заключение о доминировании в ржаных и пшеничных заквасках типа I (по зарубежной классификации) длительного ведения лактобацилл вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, которые преобладают над другими гетероферментативными и гомоферментативными видами более чем в 75 % заквасок [56, 71, 73, 95, 122, 133].

Вид *Lactobacillus sanfrancisco* был впервые выделен и описан в 1971 г. L. Kline, T. F. Sugihara [122], которыми была разработана питательная среда SDB (Sour Dough Bacteria) для выделения лактобацилл из широко известной закваски

San Francisco. Питательная среда (pH 5,6) имела следующий состав: мальтоза (2 %), дрожжевой экстракт (0,3 %), свежеприготовленный дрожжевой экстракт (от 0,5 до 1,5 %), твин 80 (0,03 %), казеиновый пептон (0,6 %) [90].

Лактобациллы указанного вида также были обнаружены в различных заквасках из Европы, но первоначально были идентифицированы как *L. brevis var. lindneri*. Вид *Lactobacillus sanfrancisco* не был включен в утвержденные списки названий бактерий и не имел статуса в бактериологической номенклатуре до тех пор, пока это название не было возрождено N. Weiss и U. Schillinger в 1984 году. В соответствии с Правилами Международного кодекса номенклатуры прокариот видовой эпитет был изменен на *L. sanfranciscensis* [135]. В 2020 г вид был реклассифицирован как *Fructilactobacillus sanfranciscensis* из-за способности использовать фруктозу в качестве акцептора электронов [143]. Указанный вид лактобацилл встречается в заквасках в устойчивой ассоциации с дрожжами *Kazachstania humilis* (ранее *Candida humilis*, син. *Candida milleri*) и *Kazachstaniga exigua* (син. *Saccharomyces exiguus*) [63, 124].

Следует отметить, что большинство изолятов этого вида были выделены из заквасок типа I по зарубежной классификации, тогда как другие виды лактобацилл, обнаруживаемые в заквасках, часто встречаются и в других источниках. Только некоторые лактобациллы, например, гетероферментативный вид *Fructilactobacillus sanfranciscensis* («образ жизни, адаптированный к насекомым») и гомоферментативный вид *Companilactobacillus paralimentarius* («образ жизни, связанный с другими *Lactobacillaceae*»), по-видимому, адаптированы к экосистеме закваски и могут быть редко выделены из других источников [61, 72, 78, 133]. Вид *Companilactobacillus paralimentarius* имеет геном в два раза больше (2,55 млн п.н.), чем у *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (1,23 млн п.н.), что, возможно, отражает его образ жизни, связанный с другими *Lactobacillaceae* и/или экологическими нишами [63, 72, 78, 143]. В заквасках часто совместно с видом *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, который сбраживает мальтозу, обнаруживаются лактобациллы

Companilactobacillus (par)alimentarius, не сбраживающие мальтозу, из-за отсутствия конкуренции между этими видами [96, 133].

Другие гетероферментативные виды МКБ, например, *Levilactobacillus brevis* («образ жизни, связанный с окружающей средой или растениями»), и гомоферментативные, например, *Lactiplantibacillus plantarum* («кочевой образ жизни»), могут быть выделены не только из заквасок, но и многих других пищевых и непищевых сред [72, 78, 100].

Вид *Fructilactobacillus sanfranciscensis* характеризуется: 1) очень малым размером генома 1,2–1,3 млн п.н.; 2) ограниченным спектром сбраживаемых углеводов (мальтоза, фруктоза, рибоза, глюконат; в случае некоторых штаммов только мальтоза); 3) узким диапазоном pH (pH 3,9–6,6) для развития, что подтверждает адаптацию к строго определенной экологической ниши [135, 143].

Минимальный уровень pH для развития *Fructilactobacillus sanfranciscensis* составляет 3,9, в то время как рост и продуцирование молочной кислоты видом *Lactiplantibacillus plantarum* продолжаются до тех пор, пока pH не достигнет значения 3,1. Известно, что МКБ переносят концентрации недиссоциированной уксусной и молочной кислот, значительно превышающие те концентрации, которые обычно встречаются в заквасках. Рост *Fructilactobacillus sanfranciscensis* наблюдается при концентрации лактата до 300 ммоль/л. Также указанный вид МКБ хорошо переносит высокие концентрации уксусной кислоты. В отличие от МКБ, обладающих высокой устойчивостью к органическим кислотам, дрожжи ингибируются недиссоциированными органическими кислотами, но не низким показателем pH. Таким образом, так как в клетку диффундируют только недиссоциированные кислоты, то тип кислоты в большей степени, чем значение pH, влияет на ингибирование дрожжей [78].

Следует отметить, что источник *Fructilactobacillus sanfranciscensis* в заквасках в настоящее время точно не определен. В работе [107] показано, что основным источником этого вида лактобацилл являются среда пекарни, поверхности оборудования и инвентаря (тестомесильная машина, контейнеры для

хранения). Ранее сообщалось, что лактобациллы этого вида были обнаружены в воздухе складских и рабочих помещений, а также на поверхностях оборудования в бельгийских пекарнях, что свидетельствует о циркуляции данного вида в производственной среде [126].

В настоящее время известно, что некоторые виды рода *Fructilactobacillus* являются преобладающими в кишечной микробиоте насекомых, и были изолированы из кишечника последних, ферментированных пищевых продуктов, цветов [143]. Молочнокислые бактерии *Fructilactobacillus sanfranciscensis* были обнаружены в кишечнике плодовых мух *Drosophila simulans* [82].

Установлено, что кишечник мучных жуков (хрущаков) *Tribolium confusum* и *Tribolium castaneum*, взрослые особи и личинки которых заселяют муку и дробленое зерно, может являться резервуаром для размножения лактобацилл *Fructilactobacillus sanfranciscensis* [38, 142].

Молочнокислые бактерии *Fructilactobacillus sanfranciscensis* были обнаружены в пшеничных заквасках (DY 200), приготовленных с использованием цветков вероники персидской, боярышника, ягод мирта и уксуса, через десять циклов освежений [121]. Эти результаты еще раз подтверждают идею, что происхождение этого вида лактобацилл связано с насекомыми, которые загрязняют зерно или цветы, используемые в качестве ингредиентов для приготовления заквасок.

Несмотря на полученные данные нельзя сделать окончательный вывод о природном резервуаре *Fructilactobacillus sanfranciscensis* и путях ее распространения. Необходимы дальнейшие исследования с применением чувствительных методов, способных дифференцировать *Fructilactobacillus sanfranciscensis* на уровне штаммов [142].

В ряде зарубежных исследований показано, что штаммы *F. sanfranciscensis* представляют интерес для хлебопекарной промышленности. Так, бактериоцины, продуцируемые *F. sanfranciscensis* C57, обладают выраженными антибактериальными свойствами. Показано, что штамм

F. sanfranciscensis Ls-1001 оказывает сильное ингибирующее действие на *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и другие пищевые патогены [86]. Кроме того, обнаружено, что экзополисахариды, продуцируемые штаммом Ls-1001, обладают выраженной антиоксидантной активностью *in vitro* [141]. Известно, что экзополисахариды оказывают положительное влияние на реологию, объем, текстуру и срок хранения хлеба [91]. Более того, *F. sanfranciscensis* улучшает вкус хлеба благодаря продуцированию летучих соединений, включающих уксусную кислоту, альдегиды, спирты и этилацетат [142]. Ферментация заквасок с применением молочнокислых бактерий, в том числе штаммов *F. sanfranciscensis*, повышает биодоступность минералов и биологически активных соединений в хлебе [57].

Кислоты, продуцируемые *F. sanfranciscensis* (капроновая, уксусная, муравьиная, масляная, валериановая, пропионовая), играют ключевую роль в подавлении плесневых грибов *Fusarium graminearum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Monilia*. Фениллактат является одним из метаболитов *F. sanfranciscensis*, который ингибирует рост плесневых грибов и предотвращает порчу хлеба [142].

Лактобациллы вида *F. sanfranciscensis* обладают антагонистической активностью по отношению к возбудителям картофельной болезни хлеба (*B. subtilis*, *B. licheniformis*) [70, 83].

1.3 Закваски с направленным культивированием микроорганизмов

1.3.1 Микробиота заквасок с направленным культивированием микроорганизмов

На отечественных хлебопекарных предприятиях традиционно применяют закваски с направленным культивированием микроорганизмов. Внесение чистых культур заквасочных микроорганизмов (МКБ и дрожжей) в водно-мучную питательную смесь обеспечивает правильное направление процесса ферментации,

подавляет развитие посторонней нежелательной микрофлоры, попадающей из сырья, позволяет получить качественную и безопасную закваску, начиная с первой фазы разводочного цикла [4]. Для выведения заквасок по разводочному циклу на хлебопекарных предприятиях РФ применяют различные виды бакконцентратов («Лактобактерин», «Вита», «Грантум») [19, 24], содержащие чистые культуры МКБ и дрожжей из коллекции культур микроорганизмов «Молочнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности» ФГАНУ НИИХП [2]. Такой подход базируется на факте, что внесение чистых культур обеспечивает быстрое превалирование заквасочных микроорганизмов над посторонней микрофлорой, источником которой является хлебопекарное сырье [4]. С целью стандартизации качества готового продукта должен осуществляться строгий контроль микрофлоры заквасок.

Согласно существующим рекомендациям [4] закваски выводят с применением стартовых культур или бакконцентратов в условиях лаборатории 1-4 раза в год в соответствии с графиком, принятым на каждом предприятии, или в случаях значительного ухудшения физико-химических, органолептических показателей качества заквасок, использования новой партии муки, продолжительных простоев или нарушений технологического процесса. Однако, несмотря на широкое применение чистых культур заквасочных микроорганизмов в хлебопекарной промышленности, их сохраняемость в процессе длительного ведения заквасок не была изучена с помощью современных молекулярно-генетических методов. Последние исследования, посвященные изучению сохраняемости стартовых культур при ведении густых ржанных заквасок, были проведены к.б.н. Афанасьевой О.В. в 1960-1970 гг. Для этого в закваске, выведенной по разводочному циклу с применением чистых культур «дрожжей *S. minor* 7 и молочнокислых бактерий А63, В5, В78», изучали микробный состав в течение шести месяцев, применяя разработанный метод люминесцирующих антител, основанный на реакции между искомым антигеном и специфическим антителом, маркированным люминесцирующим красителем. В случае

положительной реакции в люминесцирующем микроскопе можно наблюдать микробные клетки, окруженные светящимся ободком. Было установлено, что в период до 5 месяцев ведения в заквасках наблюдался устойчивый видовой состав. Однако после 5-6 месяцев ведения происходило изменение видового состава МКБ и количественного соотношения отдельных видов в закваске, что в итоге приводило к ухудшению качества хлеба. На основании проведенных исследований был сделан вывод о необходимости обновления густых заквасок через 5-6 месяцев с момента их приготовления [1].

Ряд зарубежных исследований посвящен изучению сохраняемости стартовых культур лактобацилл в процессе ведения заквасок с направленным культивированием микроорганизмов [77, 109, 123, 129, 130].

F. Minervini и соавт. [109] изучили сохраняемость семи штаммов вида *Lactiplantibacillus plantarum* в процессе ведения пшеничных заквасок типа I (DY 160) в течение десяти дней. Авторами с помощью молекулярно-генетического анализа RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) установлено, что в пяти заквасках через десять суток ведения содержание клеток стартовых культур было достаточно высоким (около $9 \lg$ КОЕ/г). В двух других заквасках содержание стартовых культур значительно снижалось ($<5 \lg$ КОЕ/г), т.е. они были вытеснены автохтонной микробиотой муки. В применяемой для ведения заквасок муке были обнаружены МКБ *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus* sp., *Furfurilactobacillus rossiae*, *Lacticaseibacillus casei*. Показано, что в шести исследуемых заквасках в процессе ведения появился, по крайней мере, один автохтонный штамм вида *Lactiplantibacillus plantarum*. При этом штаммы *Furfurilactobacillus rossiae* и *Lacticaseibacillus casei*, обнаруженные в муке, в заквасках не были выявлены. Штамм *P. pentosaceus* был обнаружен только в одной закваске.

Поскольку штаммы вида *Lactiplantibacillus plantarum* часто обнаруживаются в муке, то в случае их применения в качестве стартовых культур им приходится конкурировать не только с другими видами лактобацилл, но и с другими штаммами этого вида. Устойчивость штаммов *Lactiplantibacillus plantarum* может быть связана

с несколькими факторами: конкуренцией за питательные вещества, ферментацией гексоз и пентоз, интенсивным кислотонакоплением, продуцированием диацетила, перекиси водорода и бактериоцинов [76, 109].

Изучена сохраняемость девяти штаммов вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis* в пшеничных заквасках типа I в течение десяти дней ведения [129]. Установлено, что только три штамма доминировали в течение всего периода ведения заквасок (9 lg КОЕ/г), в то время как содержание остальных шести штаммов значительно снижалось (≤ 3 lg КОЕ/г), т.е. они были вытеснены автохтонной микробиотой муки. В пшеничной муке были обнаружены *Weissella confusa*, *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Furfurilactobacillus rossiae*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus* spp. Единственным видом МКБ, не ставшим доминирующим при ведении заквасок, являлся *Levilactobacillus brevis*. Было обнаружено, что один автохтонный штамм *Fructilactobacillus sanfranciscensis* был доминирующим во всех заквасках в конце эксперимента.

Другими исследователями показано, что в пшеничных и ржаных заквасках (DY 200), выведенных с применением смеси четырех штаммов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (TMW 1.1150, TMW 1.392, TMW 1.2142 и TMW 1.2138), и поддерживаемых при температуре 28 °С, штамм TMW 1.392 стал доминирующим уже через двое суток ведения и являлся единственным выявляемым штаммом в течение пяти суток ведения заквасок [123]. Метод CLLP-PCR оказался полезным для исследования активности различных штаммов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* в заквасках. Таким образом, CLLP-PCR может быть применен в качестве инструмента для исследования активности микроорганизмов в процессе ферментации пищевых продуктов на уровне штаммов.

В 2022 г V. Tolu и соавт. [130] изучена динамика микробиоты трех жидких заквасок (DY 200) на крупке из твердых сортов пшеницы (семолина), которые поддерживали путем регулярных освежений в условиях лаборатории в течение 22 суток. Для выведения заквасок применяли стартовые культуры МКБ

Lactiplantibacillus plantarum и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lambica* с целью обеспечения нужного направления процесса брожения начиная с первой фазы и доминирования в зрелой закваске. Для исследования динамики микробной популяции применяли культурально-зависимые методы, а также метатаксономический подход на основе анализа 16S рРНК (для бактерий) и ITS региона (для грибов). Было показано, что, несмотря на внесение стартовой культуры *Lactiplantibacillus plantarum* в водно-мучную питательную смесь, другие виды МКБ, содержащиеся в сырье, развивались в заквасках и даже становились доминирующими видами (Таблица 2). Альфа-разнообразие (индекс Шеннона) увеличивалось на протяжении всего отбора проб для заквасок SD1 и SD3, тогда как для SD2 разнообразие снижалось, что совпадало по времени с началом доминирования вида *F. sanfranciscensis*.

Таблица 2- Микробиота заквасок на крупке из твердых сортов пшеницы [130]

№	Параметры ферментации	Доминирующие виды МКБ и дрожжей через 22 суток ведения заквасок	
		МКБ	дрожжи
SD1	5 ч при 25 °С; рН 6,5 перед добавлением стартовых культур, которые вносили совместно	<i>Levilactobacillus brevis</i> <i>Leuconostoc citreum</i>	<i>S. cerevisiae</i>
SD2	8 ч при 20 °С; рН был снижен до 5,5 перед внесением стартовых культур, которые вносили совместно	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
SD3	1) инокуляция <i>L. plantarum</i> , брожение при 20 °С в течение 17 ч (предварительно снижение рН до 5,5) 2) инокуляция дрожжей, ферментация при 20 °С в течение 8 ч.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>Dipodascus australiensis</i> <i>W. anomalus</i>

Следует отметить - ряд исследователей показали, что стабильность микробиома закваски зависит от применяемого штамма лактобацилл. Показано, что в немецких ржаных заквасках устойчивость штамма *Limosilactobacillus reuteri* в течение десяти лет обусловлена его продуцированием антибактериального метаболита реутерициклина [74]. Аналогично, в ржаных заквасках типа II (по зарубежной классификации) штамм *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, являющийся продуцентом бактериоцина амиловорин L, являлся устойчивым [94].

1.3.2 Основные преимущества применения заквасок в технологии хлебобулочных изделий

Закваска является важным полуфабрикатом хлебопекарного производства, определяющим во многом качество продукции, поскольку метаболиты микроорганизмов влияют на качество закваски и хлеба, что позволяет улучшить вкус, запах, снизить крошковатость мякиша, а также замедлить микробную порчу готовых изделий. Проведенные многочисленные исследования и практический опыт применения заквасок показывают положительное влияние заквасок на качество хлебобулочных изделий. Проводимые научные исследования за рубежом посвящены изучению влияния заквасок на вкус и запах, срок годности, гликемический индекс хлеба, деградацию антипитательных факторов, повышение биодоступности минералов, белков и пищевых волокон, а также на профилактику и лечение некоторых заболеваний. Преимущества применения заквасок в технологии хлебобулочных изделий включают: улучшение вкуса и запаха хлебобулочных изделий; повышение биодоступности минералов (Fe^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2}) за счет деградации фитиновой кислоты; снижение содержания антипитательных факторов в хлебе (раффиноза, вицин, конвицин, конденсированные танины, сапонины, ингибиторы трипсина); снижение гликемического индекса; повышение антиоксидантной активности; снижение ферментируемых олигосахаридов, дисахаридов, моносахаридов и полиолов (FODMAP); обогащение постбиотиками (короткоцепочечные жирные кислоты, β -глюкан, пептидогликан); увеличение доступности пищевых волокон и выработка пребиотических компонентов (арабиноксилан-олигосахариды, AXOS); обогащение витаминами; продуцирование бактериоцинов и биосурфактантов, которые подавляют патогенные микроорганизмы и предотвращают образование биопленок; синтез экзополисахаридов; снижение аллергии на пшеницу и рожь, синтез биоактивных пептидов и производных аминокислот, снижение содержания акриламида [31, 34, 43, 69, 78, 79, 81, 88, 110, 112, 115, 119, 120].

1.3.3 Технологические аспекты приготовления теста из ржаной муки

При приготовлении пшеничного хлеба применение заквасок не является технологической необходимостью, так как его можно приготовить с использованием только хлебопекарных дрожжей. Традиционные технологии ржаного хлеба основаны на применении заквасок, что обусловлено особенностями белково-протеиназного и углеводно-амилазного комплексов ржаной муки. Молочнокислые бактерии играют важную роль в брожении ржаных полуфабрикатов.

По структуре и свойствам ржаное тесто значительно отличается от пшеничного. В ржаном тесте отсутствует клейковина, которая создает упругий и эластичный каркас теста. В ржаной муке, в отличие от пшеничной, помимо β -амилазы, содержится активный фермент - α -амилаза, который способствует накоплению в тесте декстринов, ухудшающих качество мякиша, делая его липким и заминающимся. Такой мякиш по своему состоянию напоминает мякиш непропеченного хлеба. Высокая кислотность теста ингибирует действие амилолитических ферментов, улучшает реологические свойства теста, предупреждает липкость мякиша. Кислотность ржаного теста и, в первую очередь, содержание в нем молочной кислоты существенно влияют на степень пептизации белков, за счет чего увеличивается вязкость теста и его газодерживающая способность. Для достижения установленной кислотности ржаного теста необходимы ржаные закваски с активной кислотообразующей микробиотой. Таким образом, высокая кислотность ржаного хлеба необходима не только для придания вкуса, а также для того, чтобы затормозить деятельность амилолитических ферментов, и этим улучшить физические свойства теста [4, 7, 18, 21, 28]. Основные виды ржаных заквасок [23, 24], применяемых на отечественных хлебопекарных предприятиях для производства ржаного хлеба и хлебобулочных изделий из смеси ржаной и пшеничной муки, представлены на рисунке 5.

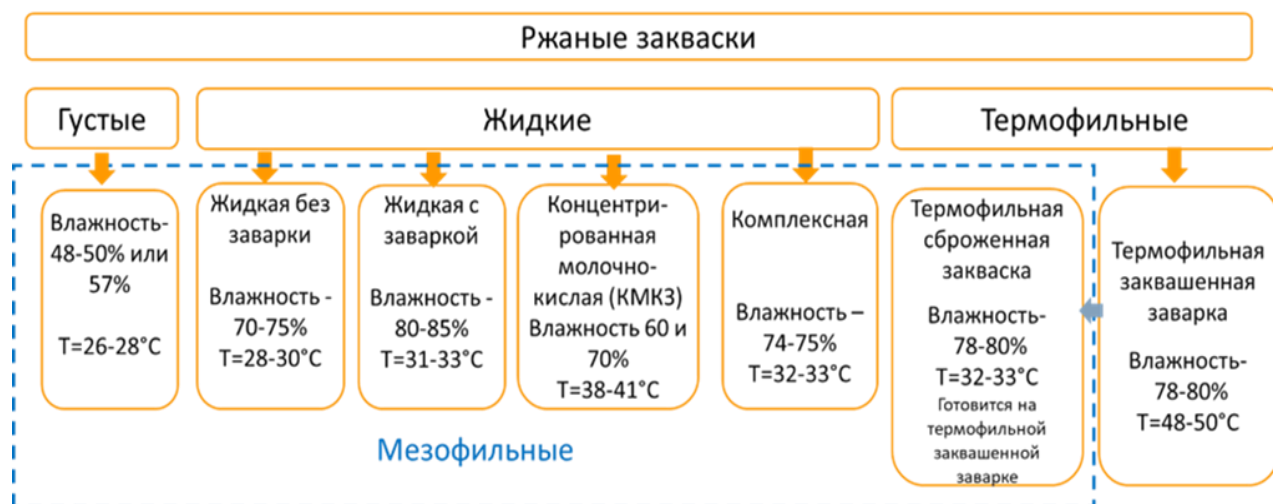


Рисунок 5 - Виды ржаных заквасок в отечественном хлебопечении [23]

Представленные виды ржаных заквасок позволяют культивировать заквасочные микроорганизмы (МКБ и дрожжи), обеспечивая продуцирование органических кислот и разрыхление полуфабрикатов.

Наибольшее распространение на отечественных хлебопекарных предприятиях получили густая ржаная закваска и жидкая ржаная закваска без заварки [12], которые представлены в работе в качестве объектов исследования. Выбор того или иного вида закваски на хлебопекарном предприятии определяется имеющимся технологическим оборудованием (дежи, емкости с рубашкой) и режимом работы.

1.4 Микробные консорциумы для выведения ржаных заквасок

На протяжении многих десятилетий на хлебопекарных предприятиях страны для выведения ржаных заквасок по разводочному циклу применяют чистые культуры МКБ и дрожжей, выращенные на жидких или плотных (агаризованных) питательных средах, из коллекции культур микроорганизмов «Молочнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности» ФГАНУ НИИХП [2]. Технология приготовления хлебобулочных изделий на заквасках многофазна, длительна и требует квалифицированного контроля качества полуфабрикатов. На хлебопекарных предприятиях для поддержания заквасочных микроорганизмов в

активном состоянии и формирования стабильного микробиома, характерного для каждой конкретной технологической схемы, проводят регулярные освежения заквасок питательной смесью из муки и воды. Применение чистых культур заквасочных микроорганизмов позволяет получить хлеб с заданными физико-химическими и органолептическими характеристиками [4]. Однако, при применении культур в нативном виде имеется ряд трудностей, обусловленных небольшим сроком хранения микроорганизмов из-за снижения их ферментативной активности, чувствительностью к температурному режиму при транспортировке.

Применяемые технологии замораживания и сублимационной сушки микроорганизмов позволили разрабатывать стартовые микробные композиции для выведения заквасок в сухом виде. Так, в СПбФ ГосНИИХП в 1980-1982 гг. были проведены исследования по лиофилизации культур лактобацилл, в результате которых был разработан сухой биопрепарат «Лактобактерин» [4]. Применение сухого лактобактерина для выведения заквасок имеет ряд преимуществ по сравнению с культурами в нативном виде:

- удобство при пересылке и транспортировке;
- длительный срок годности (12 месяцев) при температуре 4-6 °С без потери активности;
- ускорение технологического процесса (отсутствует необходимость пересева и наращивания культур МКБ);
- отсутствие необходимости микробиологической лаборатории.

В настоящее время ФГАНУ НИИ хлебопекарной промышленности является единственным отечественным производителем стартовых микробных консорциумов для выведения заквасок по разводочному циклу. В течение многих десятилетий отечественные хлебопекарные предприятия для выведения заквасок по разводочному циклу применяют стартовые микробные консорциумы на основе МКБ и дрожжей. В настоящее время наиболее распространены около 20 видов ржаных и пшеничных заквасок, которые различаются технологическими

параметрами ведения (влажностью, температурой, рН, продолжительностью брожения и охлаждения) [24].

Для каждого вида заквасок были разработаны и внедрены стартовые микробные консорциумы, включающие подобранные комбинации чистых культур МКБ и дрожжей, которые производятся в различных формах [23]. Грамотный подбор стартовых культур подразумевает применение отдельных видов или микробных консорциумов, характерных для данного технологического процесса и способных развиваться в определенных условиях. Подбор культур требует всестороннего исследования микробиоты и роли каждого вида микроорганизмов в процессе брожения заквасок [4]. В НИИ хлебопекарной промышленности для выведения ржаных заквасок был разработан бакконцентрат «Вита», состоящий из смеси чистых культур лактобацилл и дрожжей, иммобилизованных на наполнителе из продуктов переработки зерновых культур. Состав бакконцентрата зависит от вида закваски. Для выведения каждого вида закваски могут быть использованы разные формы стартовых микробных консорциумов. Например, жидкую ржаную закваску без заварки можно приготовить с использованием чистых культур в нативном виде, комплекта культур на основе сухого лактобактерина и чистых культур дрожжей на скошенном сусло–агаре, бакконцентрата «Вита» [24]. Виды стартовых микробных консорциумов для разных видов ржаных заквасок, разработанные ФГАНУ НИИХП, приведены в таблице 3.

Стартеры, производимые западными производителями, для выведения заквасок также содержат чистые культуры заквасочных микроорганизмов, иммобилизованные на наполнителях, и выпускаются как в сухом, так и в пастообразном виде (в виде брикетов). Основными производителями стартеров для ржаных заквасок являются Lesaffre (стартер Livendo® LV4), Ernst Böcker GmbH & Co. KG (линейка заквасочных стартеров Böcker), DIOSNA (стартер DIOStart® rye bread fermentation) [19, 22]. Рекомендации производителей обычно предусматривают частое выведение закваски по разводочному циклу с использованием новой партии стартера при каждой смене партии муки или перед

каждым замесом теста, при этом расходуется вся закваска без оставления части на освежение.

Таблица 3 - Виды стартовых микробных консорциумов, производимые ФГАНУ НИИХП для ржанных заквасок

Наименование закваски	Вид микробного консорциума		
	Комплект чистых культур в нативном или лиофилизированном виде		Бакконцентраты на основе чистых культур микроорганизмов, иммобилизованных на наполнителе
	В нативном виде	Сухой лактобактерин и чистые культуры дрожжей	
Ржанные закваски			
Густая	<i>L. brevis</i> 78, <i>L. plantarum</i> 63, <i>L. brevis</i> 5, <i>C. milleri</i> Черноморский	«Лактобактерин сухой» для густых хлебных заквасок» и штамм дрожжей <i>C. milleri</i> Черноморский	«Вита» для густых хлебных заквасок; «Вита форте» для густых хлебных заквасок
Жидкая без заварки	<i>L. brevis</i> 1, <i>L. casei</i> 26, <i>L. plantarum</i> 30, <i>L. fermentum</i> 34, <i>C. milleri</i> Черноморский <i>S. cerevisiae</i> Л-1	«Лактобактерин сухой» для жидких хлебных заквасок» и 2 штамма дрожжей <i>C. milleri</i> Черноморский и <i>S. cerevisiae</i> Л-1	«Вита» для жидких хлебных заквасок без заварки
Жидкая с заваркой	<i>L. brevis</i> 1, <i>L. casei</i> 26, <i>L. plantarum</i> 30, <i>L. fermentum</i> 34 <i>S. cerevisiae</i> Л-1	«Лактобактерин сухой» для жидких хлебных заквасок» и 1 штамм дрожжей <i>S. cerevisiae</i> Л-1	«Вита» для жидких хлебных заквасок с заваркой
КМКЗ	<i>L. brevis</i> 1, <i>L. casei</i> 26, <i>L. plantarum</i> 30, <i>L. fermentum</i> 34	«Лактобактерин сухой» для жидких хлебных заквасок»	«Вита» для концентрированной молочнокислой закваски
Термофильная закваска	<i>L. delbrueckii</i> 76	«Лактобактерин сухой» для термофильных заквашенных заварок»	«Вита» для термофильных заквашенных заварок
Термофильная сброженная закваска	<i>L. delbrueckii</i> 76, <i>S. cerevisiae</i> 17	«Лактобактерин сухой» для термофильных заквашенных заварок» с культурой дрожжей <i>S. cerevisiae</i> 17	-
Жидкие дрожжи	<i>L. delbrueckii</i> 76 и 1 штамм дрожжей <i>S. cerevisiae</i> (М-23, Б-14, 512, Краснодарская)	«Лактобактерин сухой» для термофильных заквашенных заварок» в сочетании с культурой дрожжей вида <i>S. cerevisiae</i> (штаммы М-23, Б-14, 512, Краснодарская)	-

Стартер для ржанных заквасок BÖCKER Reinzucht-Sauerteig (Германия) применяется в хлебопекарной промышленности для производства ржанных, цельнозерновых и ржано-пшеничных сортов хлеба. Содержит МКБ *Fructilactobacillus sanfranciscensis* и дрожжи вида *Candida milleri*. Содержание клеток МКБ составляет - $1 \times 10^9 (\pm 50 \%)$ КОЕ/г, дрожжей - $5 \times 10^6 (\pm 50 \%)$ КОЕ/г. Срок хранения - 35 суток при температуре от +4 °С до +6 °С, после вскрытия необходимо использовать сразу. Производитель рекомендует выводить закваску по разводочному циклу еженедельно. Перед началом разводочного цикла пакет со стартером в виде брикета вскрывают и смешивают 1 часть стартера с 10 частями ржаной муки и 10 частями воды. Температура брожения составляет 26-28 °С. Продолжительность брожения 16 – 18 ч. Титруемая кислотность - 17-19 град [22].

Компанией Lesaffre разработана стартовая микробная композиция Livendo® LV4 для производства ржанных и ржано-пшеничных сортов хлеба. Стартовая культура Саф Левен LV4 содержит дрожжи *Saccharomyces chevalieri* и молочнокислые бактерии *Levilactobacillus brevis*. Содержание клеток дрожжей и МКБ составляет не менее 1 млрд клеток в 1 г закваски. Для приготовления жидкой ржаной закваски 50 г стартера LV4 добавляют в 10 кг воды с температурой 35-38 °С, тщательно перемешивают, выдерживают 3-5 мин для регидратации и вносят 10 кг муки ржаной обдирной. Продолжительность брожения I фазы составляет 15 ч при температуре 26-32 °С. Затем по достижении заквасочной кислотности 10-12 град добавляют водно-мучную питательную смесь (10 кг муки и 10 кг воды) и осуществляют брожение в течение 6-8 ч. Далее к выброженной закваске добавляют равное количество питательной смеси (10 кг муки и 10 кг воды) и продолжают брожение в течение 6-8 ч. Выброженную закваску используют для приготовления производственной закваски [22].

В настоящее время перспективным направлением исследований является поиск высокоэффективных штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей, позволяющих разработать новые отечественные стартовые микробные консорциумы, обеспечивающие высокое качество хлебобулочных изделий и

импортонезависимость хлебопекарных предприятий страны. Разработка новых микробных консорциумов является актуальной задачей, поскольку позволит управлять качеством закваски и вырабатывать хлеб с прогнозируемыми органолептическими, структурно-механическими, физико-химическими показателями.

Заключение по обзору литературы

Для изучения микробиоты заквасок за рубежом, наряду с культуральными методами, широко применяются современные метагеномные методы на основе высокопроизводительного секвенирования, к преимуществам которых можно отнести возможность определения в заквасках сразу всех таксонов бактерий, в том числе минорных, а также некультивируемых микроорганизмов, способных играть важную роль в функционировании микробных экосистем, что невозможно осуществить при применении классических культуральных методов.

В настоящее время классические микробиологические методы определения заквасочных микроорганизмов уступают современным молекулярно-генетическим методам. Технологии секвенирования нового поколения произвели революцию в изучении микробиома заквасок, так как с их помощью была получена подробная информация о составе микробных сообществ. В последние годы достигнут большой прогресс в определении состава бактериальных и грибных сообществ зарубежных хлебопекарных заквасок благодаря развитию технологий секвенирования с использованием приборных комплексов различных типов - Illumina и Oxford Nanopore Technologies (ONT). Однако микробиота отечественных заквасок может существенно отличаться из-за особенностей микробиоты муки, условий ее помола и хранения, а также вида и технологии ведения заквасок.

Показано, что метод высокопроизводительного секвенирования может быть применен для контроля изменения микробиома заквасок в процессе последовательных освежений водно-мучной питательной смесью, что невозможно осуществить классическими микробиологическими методами. Метагеномные

методы могут быть использованы для контроля относительного содержания бактерий для разработки поливидовых заквасок с заданным соотношением штаммов лактобацилл.

Обзор технической и технологической литературы показал, что до настоящего времени метагеномные методы исследования не применялись для изучения таксономического состава микробиома отечественных заквасок. В литературе не представлены сведения о разнообразии заквасочной микробиоты отечественных заквасок с направленным культивированием микроорганизмов и спонтанного брожения, полученные с помощью культурально-независимых методов.

Для полного понимания процессов, происходящих в ржаных заквасках, представляет фундаментальный и практический интерес исследовать динамику бактериальных сообществ отечественных заквасок, приготовленных с применением разных сортов и партий ржаной муки в соответствии с технологиями, принятыми в отечественной хлебопекарной промышленности.

В настоящее время является актуальным выделение новых штаммов МКБ и дрожжей из заквасок с устойчивым микробиомом для разработки новых отечественных микробных консорциумов, обеспечивающих стабильное качество и безопасность хлебобулочных изделий.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА.

2.1 Организация работы

Исследования проведены в условиях лабораторий Направления заквасочных культур и микробиологических исследований и Направления научно – прикладных и технологических разработок хлебобулочных изделий на основе ржаной муки Санкт-Петербургского филиала ФГАНУ НИИХП в рамках выполнения работ по государственному заданию №2593-2014-0018 «Разработать научные основы формирования микробных композиций и биосистем на их основе, обеспечивающих высокое качество и безопасность хлебобулочных изделий» и при поддержке фонда РФФИ (проект №19-016-00085 «Исследование видового разнообразия и симбиотических взаимодействий в микробиомах крахмало-белковых гидроколлоидных систем (хлебных заквасок)»). Молекулярно-генетические исследования - с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии». Производственные испытания осуществляли в условиях ООО «Опытный хлебозавод» (г. Москва), ООО «Здоровый хлеб» (г. Санкт-Петербург). Структурная схема исследований представлена на рисунке 6.

2.2 Объекты исследований

Объектами исследований являлись промышленноценные штаммы молочнокислых бактерий из коллекции культур микроорганизмов «Молочнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности» [2] Санкт-Петербургского филиала ФГАНУ НИИХП, мука ржаная обойная и обдирная, ржаные закваски с направленным культивированием микроорганизмов и спонтанного брожения, хлебобулочные изделия.



Рисунок 6 – Структурная схема исследований

Данные об источнике выделения, методе первоначальной идентификации промышленноценных штаммов лактобацилл в музейной коллекции представлены в таблице 4. В настоящее время указанные штаммы поддерживаются в коллекции

методом периодических пересевов (на солодовом сусле), а также методами долгосрочного хранения (криоконсервация при – 80 °С).

Таблица 4 - Характеристика промышленноценных штаммов лактобацилл [3]

№	Шифр в коллекции	Наименование штамма в коллекции (по паспорту)	Источник выделения, год	Автор штамма	Применение штамма	Температурный оптимум роста, °С
1	B5	<i>L. brevis</i> 1	жидкая ржаная закваска хлебозавода №1, г.Ярославль, 1971 г	Афанасьева О.В.	для приготовления жидких ржаных и пшеничных заквасок с заваркой и без заварки и бакконцентратов «Лактобактерин сухой» для жидких хлебных заквасок, «Вита» для жидких хлебных заквасок с заваркой», «Вита» для жидких хлебных заквасок без заварки», «Вита» для концентрированной молочнокислой закваски»	37 °С
2	B7	<i>L. casei</i> 26				
3	B33	<i>L. plantarum</i> 30				
4	B28	<i>L. fermentum</i> 34				
5	B32	<i>L. plantarum</i> 63	густая ржаная закваска из пекарни Черная речка (Ленинградская обл.), 1962 г	Шмидт З.И.	для приготовления густых ржаных и пшеничных заквасок и бакконцентратов «Лактобактерин сухой» для густых хлебных заквасок», «Вита» для густых хлебных заквасок»	30 °С
6	B3	<i>L. brevis</i> 5	густая ржаная закваска из белорусской деревни Красницы, 1962 г			
7	B4	<i>L. brevis</i> 78				

При проведении исследований использовали следующее сырье:

- муку ржаную хлебопекарную обдирную (ГОСТ 7045-2017), изготовитель ООО «Удмуртмельпром», г. Ижевск, Россия;

- муку ржаную хлебопекарную обдирную (ГОСТ 7045-2017), изготовитель ГУП "Продовольственный фонд", г. Санкт-Петербург, Россия;

- муку ржаную хлебопекарную обдирную (ГОСТ 7045-2017), изготовитель АО «Коротоякский элеватор», Алтайский край, Россия;

- муку ржаную хлебопекарную обдирную (ГОСТ 7045-2017), изготовитель АО «Ленинградский комбинат хлебопродуктов им. С.М. Кирова» (АО «ЛКХП Кирова»), Санкт-Петербург, Россия;
- муку ржаную хлебопекарную обдирную (ГОСТ 7045-2017), изготовитель ГУП "Продовольственный фонд", г. Санкт-Петербург, Россия;
- муку ржаную хлебопекарную обойную (ГОСТ 7045-2017), изготовитель АО «Ленинградский комбинат хлебопродуктов им. С.М. Кирова» (АО «ЛКХП Кирова»), Санкт-Петербург, Россия;
- соль пищевую - ГОСТ Р 51574-2018;
- муку пшеничную хлебопекарную первого сорта (ГОСТ 26574-2017), изготовитель АО «Ленинградский комбинат хлебопродуктов им. С.М. Кирова» (АО «ЛКХП Кирова»), г. Санкт-Петербург, Россия;
- дрожжи хлебопекарные прессованные «Люкс Экстра» (ТУ 10.89.13-038-48975583-2018), изготовитель ООО «САФ-НЕВА», Россия;
- солод ржаной ферментированный (ГОСТ Р 52061-2003), изготовитель ОАО «Чебоксарская пивоваренная фирма «Букет Чувашии», г. Чебоксары, Россия;
- воду питьевую по СанПиН 2.1.3684-21, СанПиН 1.2.3685-21, ГОСТ Р 51232-98.

2.3 Методы исследований

Для исследования свойств и показателей качества сырья, полуфабрикатов хлебопекарного производства и хлебобулочных изделий применяли общепринятые методы определения физико-химических, микробиологических, органолептических показателей. Для исследования таксономического состава микробиома заквасок применяли технологии высокопроизводительного секвенирования.

2.3.1 Реидентификация промышленноценных штаммов молочнокислых бактерий

Для проведения исследования промышленноценные штаммы МКБ, поддерживаемые в коллекции на солодовом сусле (12% сухих веществ), пересевали на бульон MRS (ООО «НПЦ «Биокомпас-С») и культивировали в течение 2-х суток при оптимальной для каждого штамма температуре. Затем проводили поверхностный посев на чашки Петри с агаризованной средой MRS (ООО «НПЦ «Биокомпас-С») методом истощающего штриха. Чашки с посевами помещали в анаэроустат с анаэробным газогенератором (bioMerieux, Франция) и инкубировали в течение суток при оптимальной для каждого штамма температуре (30 ± 1 , 37 ± 1 °C).

Для проведения биохимической идентификации, основанной на изучении ферментации углеводов и их производных, применяли тест-систему API 50 CHL (bioMerieux, Франция) в соответствии с инструкцией к набору. Для этого на основе среды API 50 CHL готовили суспензию тестируемой культуры лактобацилл и вносили в лунки стрипа API 50 CH, а затем во все лунки поверх суспензии добавляли минеральное масло для создания анаэробных условий. Инкубировали стрипы в аэробных условиях при 29 ± 2 °C или 36 ± 2 °C в течение 48 ч.

В ходе инкубации при утилизации углеводов накапливаются кислые продукты, что приводит к изменению цвета pH-индикатора. В результате формируется биохимический профиль, по которому идентифицируют изучаемый микроорганизм. Учет результатов проводили через 48 ч инкубации. При подкислении среды API 50 CHL в лунках, в результате накопления продуктов метаболизма, индикатор бромкрезоловый красный меняет цвет на желтый, что говорит об утилизации данного углевода (положительный результат), за исключением лунки с эскулином, в которой индикатор меняет цвет на черный. Идентификация культур проводилась с использованием программного обеспечения API WEB.

Для проведения видовой идентификации и проведения реклассификации коллекционных штаммов заквасочных микроорганизмов использовали секвенирование гена 16S рРНК методом Сэнгера на базе ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии».

Для выделения ДНК использовали биомассу бактерий, полученную из 5 мл культуральной среды. ДНК выделяли с использованием набора реагентов GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва) согласно рекомендациям фирмы производителя.

Для амплификации гена 16S рРНК (фрагмент гена около 1500 п.н.) использовали праймеры fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') [139]. ПЦР-продукты выделяли из агарозного геля при помощи набора PureLink™ Quick kit (Invitrogen, США). Прямое секвенирование очищенных ПЦР-продуктов проводили на генетическом анализаторе ABI 3500xl (Applied Biosystems, США). Поиск гомологичных последовательностей в базе данных GenBank и идентификацию микроорганизмов проводили с помощью алгоритма BLAST [32].

2.3.2 Выделение изолятов молочнокислых бактерий из заквасок

Выделение изолятов лактобацилл из заквасок проводили стандартными микробиологическими методами [14, 17]. Культуры лактобацилл получали прямым посевом из образцов заквасок на питательные среды. Выделение лактобацилл проводили на плотной питательной среде San Francisco Medium Modified (Condalab, Испания). Посевы инкубировали при 30⁰С в анаэробных условиях. Выросшие колонии микроорганизмов характеризовали и группировали по колониально-морфологическим признакам, а также клеточной морфологии. Принадлежность отобранных колоний к молочнокислым бактериям рода *Lactobacillus* устанавливали по отношению к окраске по Граму, наличию каталазы. Для определения каталазной активности на предметное стекло наносили отдельно две

капли раствора перекиси водорода с массовой долей 10%. Отделяли колонию от агаризованной среды пластиковой палочкой и осторожно суспендировали ее в одной из капель. Немедленно, а также через несколько минут отмечали отсутствие или образование пузырьков кислорода. Для определения грампринадлежности выросших колоний применяли тест Греггерсена (КОН-тест). Молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus* являются грамположительными, каталазоотрицательными. Изолированные колонии отсеивали на SFM бульон, культивировали при температуре 30 °С в течение 48 ч. Состав SFM бульона (г/л): глюкоза - 7,0; фруктоза - 7,0; мальтоза - 7,0; мясной экстракт - 2,0; триптон -10,0; дрожжевой экстракт - 7,0; аммоний лимоннокислый 2-замещенный - 5,0; КН₂РО₄ - 2,5; ацетат натрия - 5,0; глюконат натрия - 2,0; твин 80 - 1 мл; цистеин - L гидрохлорид - 0,5; МnSO₄ - 0,05; MgSO₄ - 0,2, FeSO₄ - 0,01, свежеприготовленный дрожжевой экстракт [75, 84, 116]-150 мл. Оценку чистоты выделенных изолятов проводили путем микроскопии фиксированных окрашенных метиленовым синим препаратов при увеличении x1500 (микроскоп NIKON ECLIPSE E 200), а также при визуальном контроле роста колоний на агаризованной питательной среде.

2.3.3 Методы исследований биотехнологических свойств выделенных изолятов молочнокислых бактерий

Для изучения кислотообразующей активности в водно-мучные питательные смеси из ржаной обдирной муки массой 500 г с гидратацией 100 % (соотношение мука:вода 1:1) вносили исследуемые культуры в виде бактериальных суспензий в количестве 10 мл, а затем осуществляли брожение при температуре 30 °С в течение 24 ч. Бактериальные суспензии готовили из суточных культур путем смыва клеток, выращенных на плотной питательной среде San Francisco Base Medium Modified (Condalab, Испания) с добавлением дрожжевого экстракта [75, 84, 116] при температуре 30 °С в анаэробных условиях. Бактериальные взвеси доводили до мутности, соответствующей концентрации $1,5 \times 10^9$ клеток/мл, что равно 5 единицам МакФарланда с помощью денситометра BioSan DEN-1. Таким образом,

в водно – мучную питательную смесь вносили лактобациллы в количестве 3×10^7 КОЕ/г. Через 24 ч брожения проводили определение титруемой и активной кислотности (рН) по методам, принятым в хлебопекарной промышленности. Содержание лактобацилл и наличие посторонней микробиоты определяли по методу Бургвица [4]. Определение содержания молочной и уксусной кислот проводили методом капиллярного электрофореза (Методика М 04-95-2022 «Хлебобулочные изделия, полуфабрикаты и сырье хлебопекарного производства») с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия). Метод измерений основан на извлечении компонентов из проб дистиллированной водой, дальнейшем их разделении и количественном определении методом капиллярного электрофореза. Детектирование компонентов проводили при длине волны 190 нм.

2.3.4 Методы исследований качества сырья

Определяли следующие физико-химические показатели качества муки:

- влажность - по ГОСТ 9404-88;
- число падения - по ГОСТ 27676-88

Физико-химические показатели качества муки ржаной обдирной и обойной, применявшейся в работе для ведения заквасок, представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Физико-химические показатели качества муки ржаной обдирной и обойной

Шифр образца	Мука ржаная	Изготовитель	Влажность, %	Число падения, с
Мука 1	обдирная	АО «ЛКХП Кирова», г. Санкт-Петербург	12,4	193
Мука 2		АО «Коротоякский элеватор», Алтайский край	12,5	266
Мука 3		ООО «Удмуртмельпром», г. Ижевск	11,8	241
Мука 5		ГУП "Продовольственный фонд" (г. Санкт-Петербург)	11,4	133
Мука 6			11,6	139
Мука 7		АО «ЛКХП Кирова», г. Санкт-Петербург	11,6	191
Мука 4	обойная	АО «ЛКХП Кирова», г. Санкт-Петербург	11,8	234

В муке определяли количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) по ГОСТ 10444.15-94, плесневых грибов и дрожжей по ГОСТ 10444.12-2013.

Содержание спорообразующих бактерий определяли бактериологическим методом [4]. Навеску муки массой 10 г переносили в колбу с 90 см³ стерильной воды. Приготовленную пробу тщательно перемешивали и нагревали на водяной бане в течение 10 минут при температуре 90-95 °С, охлаждали, затем готовили последовательные десятикратные разведения и производили глубинный посев на мясо - пептонный агар (МПА). Чашки с посевами инкубировали при 37 °С, после чего подсчитывали количество выросших колоний спорообразующих бактерий. Результаты исследований микробиологических показателей муки представлены в разделе 3.1.

2.3.5 Методы исследований свойств полуфабрикатов хлебопекарного производства

Физико-химические методы

В полуфабрикатах (закваска, тесто) определяли физико-химические показатели согласно общепринятым методам.

Температуру заквасок измеряли техническим термометром со шкалой температур до 100 °С с точностью отсчета до 1 °С [9]. Влажность заквасок определяли ускоренным методом с использованием анализатора влажности «ЭЛЕКС-7» (Россия), предназначенного для определения влажности пищевого сырья и продуктов. Титруемую кислотность полуфабрикатов определяли при титровании 0,1 н раствором гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина и выражали в градусах. В процессе ведения заквасок контролировали активную кислотность с помощью рН - метра («Эксперт-рН», Россия) с электродом стеклянным комбинированным ЭСК-10601/7 в соответствии с инструкцией к прибору. Для оценки активности дрожжевой микробиоты определяли подъемную силу заквасок методом всплывающего шарика, выражая результат в минутах, и

содержание спирта методом Мартена в его йодометрической модификации, выражая результат в процентах на сухое вещество [9]. Об активности молочнокислых бактерий в заквасках и изменении состава микробиома на уровне семейства *Lactobacillaceae* судили по содержанию летучих кислот, результат выражали в градусах и в процентах к титруемой кислотности [4, 9].

Определение содержания молочной и уксусной кислот проводили методом капиллярного электрофореза (Методика М 04-95-2022 «Хлебобулочные изделия, полуфабрикаты и сырье хлебопекарного производства») с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия).

Микробиологические методы

Содержание МКБ и дрожжей, наличие посторонней микробиоты определяли путем подсчета на окрашенных фиксированных препаратах в 50-ти полях зрения по методу Бургвица [4].

В процессе ведения заквасок контролировали содержание жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий и дрожжей. Для этого навеску заквасок массой 10 г растирали в фарфоровой ступке пестиком с 90 см³ 0,9 % раствора натрия хлорида и переносили в стерильную колбу, перемешивали путем энергичного встряхивания, получая разведение 1:10 (10^{-1}). Далее готовили ряд последовательных десятикратных разведений, которые тщательно встряхивали на перемешивающем устройстве ПЭ-6200 (вортексе).

Для определения содержания дрожжей проводили поверхностный посев на сусло-агар (8 % сухих веществ). Чашки с посевами инкубировали при температуре 30 °С. Применение сусло-агара позволяет дифференцировать заквасочные дрожжи видов *S. cerevisiae* и *K. humilis* (ранее *C. milleri*). Цвет колоний и наличие блеска являются хорошим отличительным признаком. Так, дрожжи вида *S. cerevisiae* формируют колонии округлой формы желтовато-белого цвета с выпуклым центром, матовые, с гладкой поверхностью и ровным краем. Дрожжи вида

K. humilis образуют более мелкие колонии серовато-белого цвета с приподнятым центром, гладкой, блестящей поверхностью и ровным краем [4].

С целью определения содержания молочнокислых бактерий в заквасках проводили глубинный посев на сусло-агар (12 % сухих веществ) с мелом, посеvy термостатировали при 30 °С. При таком способе посева лактобациллы образуют колонии в виде правильных линз (чечевицеобразные), треугольные, вокруг которых отчетливо видна зона растворения мела.

Для количественного определения МКБ в заквасках спонтанного брожения проводили поверхностный посев на агаризованную питательную среду MRS (Condalab, Испания) следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; мясной экстракт – 8,0; пептон – 10,0; дрожжевой экстракт – 4,0; твин 80 – 1,0; цитрат аммония – 2,0; $MnSO_4$ – 0,05; $MgSO_4$ – 0,2; ацетат натрия – 5,0; KH_2PO_4 – 2,0; бактериологический агар – 10,0.

Для определения содержания заквасочных лактобацилл, не дающих роста на среде MRS, применяли модифицированную среду Сан-Франциско (San Francisco Medium Modified, Condalab, Испания), содержащую (г/л): глюкозу – 7,0; фруктозу – 7,0; мальтозу – 7,0; мясной экстракт – 2,0; триптон – 10,0; дрожжевой экстракт – 7,0; глюконат натрия – 2,0; $MgSO_4$ – 0,2; $MnSO_4$ – 0,5; ацетат натрия – 5,0; твин 80 – 1,0; $FeSO_4$ – 0,1; K_2HPO_4 – 2,5; аммоний лимоннокислый 2-замещенный – 5,0; цистеин - L гидрохлорид – 0,5, бактериологический агар – 15,0, с добавлением после автоклавирования приготовленного согласно [84, 75, 116] дрожжевого экстракта. Для обеспечения анаэробных условий культивирования применяли сухие газогенерирующие пакеты AnaeroGen (OXOID, Великобритания). Посевы инкубировали при 30 °С.

Подтверждение принадлежности типичных выросших колоний к молочнокислым бактериям проводили в соответствии с ГОСТ 10444.11— 2013. К молочнокислым бактериям относили грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, каталазоотрицательные палочки (короткие или длинные) и грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные или образующие

псевдокаталазу кокки. В случае обнаружения неспорообразующих, грамположительных, каталазоотрицательных палочек обнаруженные микроорганизмы относили к роду *Lactobacillus*.

В заквасках спонтанного брожения определяли содержание плесневых грибов по ГОСТ 10444.12-2013. Определение количества спорообразующих бактерий проводили бактериологическим методом [4].

Метагеномные методы

Определение таксономического состава бактериального микробиома заквасок проводили методом высокопроизводительного метагеномного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК на базе ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ по договорной работе в рамках реализации проекта РФФИ №19-016-00085.

Перед выделением ДНК из образцов исследуемых заквасок осуществляли гомогенизацию бактериальных клеток с помощью шарикового гомогенизатора Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция) со скоростью 6000 встряхиваний в минуту два раза по 30 с. Для выделения ДНК из образцов заквасок был использован СТАВ метод.

Определение качественных и количественных характеристик препаратов ДНК. Определение концентрации двуцепочечной ДНК осуществляли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Invitrogen, США) с использованием набора реагентов Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США). Чистоту полученных препаратов ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Конструирование и секвенирование ампликонных библиотек.

Очищенные препараты ДНК использовали для создания ДНК-библиотек, полученных методом ПЦР. В случае бактериального сообщества использовали универсальные праймеры F515/R806 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA/GGACTACVSGGGTATCTAAT),

амплифицирующие переменный участок гена 16S рРНК V4 [45]. Все праймеры были удлинены специальными адаптерными последовательностями для обеспечения совместимости с ячейками для секвенирования Illumina.

ПЦР проводилась в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5 – 1 единицу активности полимеразы Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 1 - 10 нг ДНК-матрицы и 2нМ каждого dNTP (LifeTechnologies, США). Смесь денатурировали при 94 °С 1 мин., после чего следовало 25 циклов: 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин. Финальная элонгация проводилась при 72 °С 3 мин.

Полученные ампликоны очищали по рекомендованной фирмой Illumina методике с использованием магнитных частиц AMPureXP (BeckmanCoulter, США). Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование на приборе «Illumina MiSeq» (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) в режиме парноконцевого чтения PE300 проводились в соответствии с рекомендациями производителя [30].

Анализ нуклеотидных последовательностей ампликонных библиотек. Первоначальная обработка полученных данных, а именно, демультимплексирование образцов и удаление адаптеров, проводилась с помощью программного обеспечения компании Illumina (Illumina, США). Определение качественных характеристик полученных данных производили с использованием программного обеспечения FastQC [68]. Фильтрацию коротких прочтений по качеству и их тримминг осуществляли при помощи программы Trimmomatic [39]. Для последующего декойзинга, объединения последовательностей, удаления химерных прочтений, восстановления исходных флотипов (ASV, Amplicon sequence variant) и дальнейшей таксономической классификации полученных ASV, использовали программный пакет DADA2 [41]. Анализ и визуализацию результатов таксономического профилирования осуществляли с помощью пакета программ phyloseq [103]. База данных, содержащая полученные последовательности, была создана и курировалась в программной среде R с использованием пакета

DECIPHER v. 2.0 [140]. Для представления данных таксономического анализа использовали средства программного пакета QIIME [44].

2.3.6 Методы исследований качества хлеба

Физико-химические и органолептические показатели качества готовых изделий определяли через 16 ч после выпечки.

Определение органолептических показателей хлеба проводили по ГОСТ 5667-2022, физико-химические показатели: влажность мякиша - по ГОСТ 21094-2022, кислотность мякиша – по ГОСТ 5670-96, пористость - по ГОСТ 5669-96. Удельный объем изделий определяли в соответствии с ГОСТ 27669 – 88.

Содержание летучих кислот в образцах хлеба определяли полумикрометодом ВНИИХПа, результат выражали в градусах и в процентах к кислотности. Для определения содержания спирта применяли метод Мартена в йодометрической модификации, выражая результат в процентах на сухое вещество [29].

Определение содержания молочной и уксусной кислот проводили методом капиллярного электрофореза (Методика М 04-95-2022 «Хлебобулочные изделия, полуфабрикаты и сырье хлебопекарного производства») с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия).

Метод определения степени черствости мякиша хлебобулочных изделий. Скорость черствения хлеба определяли в соответствии с ГОСТ Р 70085-2022. Метод основан на определении усилия нагружения пробы мякиша цилиндрической формы при ее сжатии, с последующим расчетом индекса твердости мякиша (с учетом плотности и влажности), который используют для оценки степени черствости хлеба в процессе хранения. Скорость изменения показателя твердости мякиша в течение срока хранения принимают за скорость черствения мякиша.

Хлеб разрезали на ломти толщиной 20 мм с помощью ломтерезки, далее из центра каждого ломтя вырезали с помощью цилиндрического пробника по одной цилиндрической пробе. Получали цилиндрические пробы с размерами: диаметр цилиндра $d_{ц} = 36$ мм; высота цилиндра $h_{ц} = 20$ мм, при этом объем цилиндра $V_{ц} = 20,36$ см³. Подготовленную цилиндрическую пробу мякиша взвешивали, регистрируя массу $g_{ц.п}$, устанавливали на столик прибора текстуроанализатора и сжимали ее на 5 мм. Измеренное при этом усилие нагружения F_1 , Н (гс), принимали за показатель твердости мякиша F_h , Н (гс).

Первое испытание проводили через 1 сутки хранения изделий, последующие — через 3 и 7 суток.

Плотность мякиша ρ_m , г/см³, вычисляли по формуле

$$\rho_m = \frac{g_{ц.п}}{V_{ц}}, \quad (1)$$

где $g_{ц.п}$ - масса цилиндрической пробы мякиша, г;

$V_{ц}$ - объем цилиндра, см³

Показатель индекса твердости мякиша I_h , ед. инд. тв., по которому оценивали степень черствости изделия, вычисляли по формуле:

$$I_h = \frac{F_h}{\rho_m(100 - W_m)}, \quad (2)$$

где F_h - показатель твердости мякиша, Н (гс);

ρ_m - плотность мякиша, г/см³;

W_m - влажность мякиша, %.

Показатель скорости черствения мякиша $V_{ч}$, Н/сут, вычисляли по формуле:

$$V_{ч} = \frac{F_h(N_{сут}) - F_h(1 \text{ сут})}{\Delta\tau_{хр}}, \quad (3)$$

где $F_h(N_{сут})$ - показатель твердости мякиша через N суток хранения изделия после выпечки, Н;

$F_h(1 \text{ сут})$ - показатель твердости мякиша через сутки хранения изделия после выпечки, Н;

$\Delta\tau_{хр}$ - общая продолжительность хранения изделия, сутки.

Определение устойчивости хлеба к плесневению. С целью изучения влияния заквасок на устойчивость хлеба к плесневению проводили модельные опыты с заражением его стерильных ломтиков тест - штаммом плесневых грибов *Penicillium chrysogenum F601*. Хлеб на выходе из печи упаковывали в стерильную бумагу и переносили в стерильный микробиологический бокс. После остывания хлеб с соблюдением правил асептики нарезали на ломтики размером 3,5×6,5 см и толщиной 0,3-0,4 см, которые затем помещали в стерильные чашки Петри. Для заражения подготовленных образцов хлеба готовили водную суспензию тест - штамма плесневых грибов *P. chrysogenum F601*. Из пробирки с чистой культурой, выращенной на скошенном сусло-агаре в течение 10-14 суток при температуре 30 °С до появления зрелого спороношения, при помощи микробиологической петли споры переносили в пробирку со стерильной дистиллированной водой и тщательно суспендировали до разделения всех комочков спор. Затем производили фильтрацию через четыре слоя стерильной марли от комочков мицелия, агара и комочков спор. Для определения концентрации спор применяли камеру Горяева. Суспензию спор с концентрацией 10^6 спор/мл использовали для заражения ломтиков хлеба. Ломтики хлеба инокулировали в трех точках суспензией спор *P. chrysogenum F601* с помощью бактериологической иглы. Чашки с ломтиками хлеба инкубировали в термостате при температуре 25 °С и наблюдали за появлением колоний плесневых грибов. Отмечали продолжительность хранения до появления признаков роста колоний *P. chrysogenum* в часах [13].

Определение устойчивости хлеба к меловой болезни. С целью изучения влияния заквасок на устойчивость хлеба к меловой болезни проводили модельные опыты с заражением его стерильных ломтиков тест - культурами дрожжей - возбудителей меловой болезни хлебобулочных изделий. Тест - штаммами являлись *Cyberlindnera fabianii Y527*, *Pichia kudriavzevii Y502*, *Wickerhamomyces anomalus Y506* из коллекции культур микроорганизмов СПбФ ФГАНУ НИИХП. Хлеб на выходе из печи упаковывали в стерильную бумагу и переносили в стерильный микробиологический бокс. После остывания хлеб с соблюдением

правил асептики нарезали на ломтики размером 3,5×6,5 см и толщиной 0,3-0,4 см, которые затем помещали в стерильные чашки Петри. Для заражения подготовленных образцов хлеба готовили суспензии из суточных культур дрожжей, выращенных на скошенном сусло-агаре, с титром клеток 10^6 КОЕ/мл. Определение количества клеток в дрожжевой суспензии проводили подсчетом в камере Горяева. Далее стерильной бактериологической петлей (калиброванной на объем 10 мкл) полученные суспензии наносили штрихами на ломтики хлеба. Чашки с ломтиками хлеба инкубировали в термостате при температуре 25 °С и наблюдали за появлением признаков меловой болезни (белые сухие, порошкообразные пятна и налеты, похожие по внешнему виду на мел). Отмечали продолжительность хранения до появления первых признаков микробной порчи в часах.

2.3.7 Способы приготовления заквасок и хлеба

Режимы приготовления и ведения ржаных заквасок с направленным культивированием микроорганизмов

Густую ржаную закваску и жидкую ржаную закваску без заварки вели в условиях лаборатории СПбФ ФГАНУ НИИХП на протяжении 2-х месяцев. Для ведения густой ржаной закваски применяли муку ржаную обдирную (шифр образца муки - «мука 5», раздел 2.3.4). Для выведения густой ржаной закваски в водно-мучную питательную смесь вносили три штамма лактобацилл *Lactiplantibacillus plantarum* B4 (ранее *L.brevis* 78), *Lacticaseibacillus paracasei/casei* B3 (ранее *L.brevis* 5), *Lacticaseibacillus paracasei/casei* B31 (ранее *L. plantarum* 63), предварительно выращенных на солодовом сусле в течение 2-х суток при температуре 30 °С, и один штамм дрожжей *K. humilis* Y128 (штамм Чернореченский) в виде суспензии. Содержание клеток молочнокислых бактерий в выросшей культуре должно составлять не менее 10^9 КОЕ/мл. Для приготовления суспензии заквасочных дрожжей в пробирку с выросшей культурой вносили 10 см³ воды и смывали дрожжевые клетки с помощью стеклянной палочки с поверхности

скошенного сусло-агара. Содержание клеток дрожжей в полученной суспензии должно быть не менее 10^8 КОЕ/мл. Режим приготовления густой ржаной закваски в разводочном и производственном циклах приведен в таблице 6.

Для ведения жидкой ржаной закваски без заварки применяли муку ржаную обдирную (шифр образца муки – «мука 6», раздел 2.3.4). Для приготовления жидкой ржаной закваски без заварки в водно-мучную питательную смесь вносили четыре штамма МКБ *Lactiplantibacillus plantarum* B5 (ранее *L. brevis* 1), *Limosilactobacillus fermentum* B28 (ранее *L. fermentum* 34), *Lentilactobacillus parabuchneri* B7 (ранее *L. casei* 26), *Lentilactobacillus parabuchneri* B33 (ранее *L. plantarum* 30), предварительно выращенных на солодовом сусле в течение 2-х суток при температуре 37 °С, и два штамма дрожжей - *S.cerevisiae* Y120 (штамм Л-1), *K. humilis* Y128 (штамм Чернореченский) в виде суспензии. Содержание клеток молочнокислых бактерий в выросшей культуре должно составлять не менее 10^9 КОЕ/мл. Содержание клеток дрожжей в приготовленной суспензии должно быть не менее 10^8 КОЕ/мл. Режим приготовления жидкой ржаной закваски без заварки в разводочном и производственном циклах приведен в таблице 7.

С целью исследования влияния разработанного микробного консорциума на биотехнологические свойства густой ржаной закваски выводили по разводочному циклу и вели на протяжении одного месяца в условиях лаборатории СПбФ ФГАНУ НИИХП закваски влажностью 48 %. Для выведения заквасок использовали две партии муки ржаной обдирной (шифр образцов – «мука 6», «мука 7», раздел 2.3.4). Для выведения контрольной закваски применяли чистые культуры МКБ *Lactiplantibacillus plantarum* B4 (ранее *L.brevis* 78), *Lacticaseibacillus paracasei/casei* B3 (ранее *L.brevis* 5), *Lacticaseibacillus paracasei/casei* B31 (ранее *L. plantarum* 63) и дрожжи *K.humilis* Y128 (ранее *C. milleri* Чернореченский), которые в настоящее время используют на отечественных хлебопекарных предприятиях. Режим приготовления густых ржаных заквасок в разводочном цикле приведен в таблице 8.

Таблица 6 - Рецепттура и режимы приготовления густой ржаной закваски в разводочном и производственном циклах

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и параметры процесса					
	Фазы разводочного цикла			Производственный цикл		
	I	II	III			
Соотношение закваски и питательной смеси	-	1:1	1:1,5	1:2	1:3	1:5
Культуры МКБ, см ³						
<i>Lactiplantibacillus plantarum B4</i>	2,0	-	-	-	-	-
<i>Lacticaseibacillus paracasei/casei B3</i>	2,0	-	-	-	-	-
<i>Lacticaseibacillus paracasei/casei B31</i>	2,0	-	-	-	-	-
Суспензия дрожжей, см ³						
<i>K. humilis Y128</i>	2,0	-	-	-	-	-
Закваска предыдущей фазы, г	-	500,0	400,0	333,0	250,0	167,0
Мука ржаная обдирная, г*	451,5	340,0	352,0	391,0	440,0	489,0
Вода, г	540,5	160,0	248,0	276,0	310,0	344,0
Общая масса, г	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
Влажность, %	60			48		
Температура, °С	30			26-28		18-20
Продолжительность брожения, ч	15	5	5	3-5	4-8	14-17
* Влажность муки -11,4 %						

Таблица 7 - Рецепттура и режимы приготовления жидкой ржаной закваски без заварки в разводочном и производственном циклах

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и параметры процесса					
	Фазы разводочного цикла			Производственный цикл		
	I	II	III			
Соотношение закваски и питательной смеси	-	1:1,5	1:1	1:1	1:2	
Культуры МКБ, см ³						
<i>Limosilactobacillus fermentum B28</i>	2,0	-	-	-	-	-
<i>Lentilactobacillus parabuchneri B7</i>	2,0	-	-	-	-	-
<i>Lentilactobacillus parabuchneri B33</i>	2,0	-	-	-	-	-
<i>Lactiplantibacillus plantarum B5</i>	2,0	-	-	-	-	-
Суспензия дрожжей, см ³						
<i>K. humilis Y128</i>	1,0	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae Y120</i>	1,0	-	-	-	-	-
Закваска предыдущей фазы, г	-	400,0	500,0	500,0	333,0	
Мука ржаная обдирная, г*	339,4	204,0	170,0	170,0	226,0	
Вода, г	650,6	396,0	330,0	330,0	441,0	
Общая масса, г	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000	
Влажность, %	70					
Температура, °С	28-30				20-22	
Продолжительность брожения, ч	15	5	5	3-4	15-16	
* Влажность муки -11,6 %						

Таблица 8 - Режим приготовления густых ржаных заквасок в разводочном цикле контрольной и на новом микробном консорциуме (опытной)

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и параметры процесса для закваски					
	контрольной			опытной		
	по фазам разводочного цикла					
	I	II	III	I	II	III
Соотношение закваски и питательной смеси	-	1:1	1:1,5	-	1:1	1:1,5
Культуральная жидкость МКБ, см ³ <i>Lactocaseibacillus paracasei/casei B31</i>	2,0	-	-	-	-	-
<i>Lactocaseibacillus paracasei/casei B3</i>	2,0	-	-	-	-	-
<i>Lactiplantibacillus plantarum B4</i>	2,0	-	-	-	-	-
<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis B131</i>	-	-	-	6,0	-	-
Суспензия дрожжей, см ³ <i>K. humilis Y128</i>	2,0	-	-	2,0		
Закваска предыдущей фазы, г	-	500,0	400,0	-	500,0	400,0
Мука ржаная обдирная, г*	591,0	295,0	355,0	591,0	295,0	355,0
Вода, г	401,0	205,0	245,0	401,0	205,0	245,0
Общая масса, г	1000,0					
Влажность, %	48					
Температура, °С	28-30					
Продолжительность брожения, ч	16	6	5	16	4	4
*Влажность муки - 11,6 %						

Густые ржаные закваски поддерживали в производственном цикле путем освежений с последующим брожением до требуемой кислотности в соответствии с рекомендациями, представленными в «Сборнике современных технологий хлебобулочных изделий» [24].

Приготовление теста и хлеба на заквасках с направленным культивированием микроорганизмов

Густую ржаную и жидкую ржаную закваску без заварки использовали для приготовления хлеба ржаного из обдирной муки формового (ГОСТ 2077-2023).

Тесто готовили из муки ржаной обдирной, закваски, соли пищевой, воды (Таблица 9). С закваской вносили 33 % муки ржаной обдирной от общего количества её в тесте. Тесто замешивали в течение 6 мин, затем направляли на брожение при температуре 29±1 °С. Продолжительность брожения составляла 90 мин. Выброженное тесто делили на куски, формовали и укладывали в формы, затем направляли на расстойку при температуре 36 – 38 °С и относительной влажности

воздуха 75-80 %. Окончание расстойки определяли органолептически. Расстоявшиеся тестовые заготовки выпекали с пароувлажнением при температуре пекарной камеры 190 °С в течение 32 мин.

Таблица 9 - Рецепт и режим приготовления теста на густой ржаной закваске и жидкой ржаной закваске без заварки

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья на 100 кг муки при приготовлении теста на закваске	
	густой ржаной	жидкой ржаной без заварки
Закваска, кг	57	97,2
Количество муки с закваской, кг	33	33
Мука ржаная обдирная, кг	67	67
Соль пищевая, кг	1,5	1,5
Вода, кг	по расчету	
Влажность теста расчетная, %	50	
Продолжительность брожения, мин	90	
Температура начальная, °С	28-30	

Густую ржаную закваску, приготовленную с применением разработанного микробного консорциума, использовали для приготовления хлеба заварного по модельной рецептуре, приготовленного трехфазным способом (заварка-закваска-тесто) при соотношении муки ржаной хлебопекарной обдирной и пшеничной первого сорта 65:35. Заварку готовили традиционным способом путем смешивания 15 % ржаной обдирной муки, 5% солода ржаного ферментированного и воды с температурой 95 ± 2 °С при соотношении 1:2,5 (мука:вода) с последующим внесением в качестве осаживающего агента 5 % ржаной обдирной муки от общей ее массы и осаживали в течение двух часов в термостате при температуре 55 °С. Тесто замешивали на густой закваске, содержащей 25 % ржаной муки, осаживанной заварке, охлажденной до температуры 30-35 °С, с добавлением по рецептуре (Таблица 10) муки ржаной обдирной, муки пшеничной хлебопекарной первого сорта, дрожжей хлебопекарных прессованных, соли пищевой и воды, обеспечивающей влажность 49 %, проводили брожение при температуре 28-30 °С в течение 90 мин. Выброженное тесто разделявали на тестовые заготовки,

расстойку которых проводили в расстойном шкафу при температуре 36–38 °С и относительной влажности воздуха 75–85 %. Выпечку расстойшихся тестовых заготовок осуществляли в увлажнённой пекарной камере при температуре 180 °С в течение 45 мин с подачей пара в течение 5 с.

Таблица 10 – Рецептура на 100 кг муки (в том числе солода) и параметры приготовления теста для хлеба заварного по модельной рецептуре

Наименование сырья и показателей процесса	Расход сырья на 100 кг муки при приготовлении теста на густой ржаной закваске
Закваска, кг	42,3
Мука в закваске, кг	25,0
Влажность закваски, %	48,0
Заварка, кг	70,0
Мука в заварке+солод ржаной ферментированный, кг	15+5
Влажность заварки, %	74,6
Гидромодуль заварки	1:2,5
Мука ржаная обдирная, кг	20,0
Мука пшеничная первого сорта, кг	35,0
Дрожжи прессованные, кг	0,2
Соль пищевая, кг	1,5
Вода, кг	по расчету
Расчетная влажность теста, %	49,0

Режимы приготовления и ведения ржаных заквасок спонтанного брожения

Закваски спонтанного брожения (густую ржаную и жидкую ржаную без заварки) вели в условиях лаборатории СПбФ ФГАНУ НИИХП в течение одного месяца. Для выведения заквасок использовали три партии муки ржаной обдирной («мука 1», «мука 2», «мука 3») и одну партию муки ржаной обойной («мука 4»), выработанных на предприятиях в разных регионах РФ.

Из всех партий муки готовили водно-мучные питательные смеси влажностью 50 % (густые закваски) и 70 % (жидкие закваски), для приготовления которых смешивали муку с водой в соотношении 1:0,76 (0,75) и 1:1,9 соответственно. Итого – восемь заквасок. Масса заквасок составляла 1000 г. Количество воды, идущей на приготовление закваски, определяли в зависимости от влажности используемой муки. Приготовленные водно-мучные питательные смеси влажностью 50 % и 70 %

выбраживали в течение 48 ч при температуре 26 ± 1 °С и 32 ± 1 °С соответственно. Полученные закваски освежали в соотношении закваска: питательная смесь 1:1 и оставляли на 24 ч брожения при той же температуре.

На четвертые сутки закваски освежали в соотношении закваска: питательная смесь 1:1 через 6-7 ч и 15-16 ч и оставляли на брожение. Затем закваски освежали в соотношении закваска: питательная смесь 1:1 и направляли в термостат для брожения в течение 3,5-4 ч. После контроля качества закваски помещали в холодильник (температура 4-6 °С) на 3 суток для консервации при перерывах в работе с целью замедления процесса кислотонакопления и сохранения заквасочной микробиоты в активном состоянии.

Далее на протяжении всего эксперимента густые закваски освежали в соотношении закваска: питательная смесь 1:3 и оставляли на брожение в течение 7 ч при температуре 26 ± 1 °С, затем обновляли в соотношении 1:5 при температуре 20 °С и оставляли на 16 ч брожения при температуре 17-18 °С.

Жидкие ржаные закваски без заварки освежали в соотношении закваска: питательная смесь 1:2, выбраживали в течение 7 ч при температуре 32 ± 1 °С. После чего закваски освежали в соотношении закваска: питание 1:2 и оставляли на брожение в течение 16 ч при температуре 17-18 °С.

В процессе ведения заквасок спонтанного брожения контролировали органолептические, физико-химические, микробиологические показатели, а также изменение состава микробиома с применением метагеномных методов. В шифре заквасок указан тип закваски (Г — густые, Ж — жидкие), партия муки (1, 2, 3, 4) и продолжительность ведения заквасок (сутки).

Приготовление теста и хлеба на заквасках спонтанного брожения

Тесто готовили из муки ржаной обдирной или обойной, закваски, соли пищевой, воды (Таблицы 11, 12). На заквасках из ржаной обойной муки замешивали тесто для хлеба ржаного «Простого» формового, из обдирной муки - для хлеба ржаного из обдирной муки формового (ГОСТ 2077-2023).

Таблица 11 - Рецепттура и режим приготовления теста на густой ржаной и жидкой ржаной закваске на обдирной муке

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья на 100 кг муки при приготовлении теста на закваске					
	густой ржаной			жидкой ржаной без заварки		
	выведенной с применением муки					
	мука 1	мука 2	мука 3	мука 1	мука 2	мука 3
Закваска, кг	78,84	78,75	79,38	102,2	102,08	102,9
Количество муки с закваской, кг	45			35		
Мука ржаная обдирная, кг	55			65		
Соль пищевая, кг	1,5			1,5		
Вода, кг	по расчету					
Влажность теста расчетная, %	49					
Продолжительность брожения, мин	90					
Температура начальная, °С	28-30					

Таблица 12 - Рецепттура и режим приготовления теста на густой ржаной и жидкой ржаной закваске на обойной муке

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья на 100 кг муки при приготовлении теста на закваске	
	густой ржаной	жидкой ржаной без заварки
Закваска, кг	79,38	102,9
Количество муки с закваской, кг	45	35
Мука ржаная обойная, кг	55	65
Соль пищевая, кг	1,5	1,5
Вода, кг	по расчету	
Влажность теста расчетная, %	50	
Продолжительность брожения, мин	90	
Температура начальная, °С	28-30	

С закваской влажностью 50 % (густой) при замесе теста вносили 45 %, с влажностью 70 % (жидкой) - 35 % муки от общего ее количества в тесте. Тесто подвергали брожению в течение 90 мин при температуре 30 °С, разделявали на заготовки массой 630 г, укладывали в формы, проводили расстойку при температуре 36-38 °С и относительной влажности 75-80 % до готовности и выпекали при температуре 190 °С в течение 32 мин.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование микробной обсемененности ржаной муки как фактора, влияющего на микробиом заквасок

Микробная обсемененность муки может оказывать значительное влияние на формирование микробиома заквасок, особенно спонтанного брожения, в которых мука является основным источником микроорганизмов. Микробиота муки отражает загрязнение зерна, на которое влияет большое количество факторов, включая климатические условия в местах его произрастания (температура и количество осадков), контаминацию насекомыми или грибами, применяемые сельскохозяйственные методы (обработка инсектицидами или фунгицидами) [50].

Мука является основным фактором, определяющим стабильность микробиома заквасок, поскольку содержит «загрязняющие» бактериальные штаммы и обеспечивает заквасочные микроорганизмы питательными веществами (углеводы, аминокислоты), концентрация которых меняется в течение времени и зависит от активности эндогенных амилаз и протеаз.

Содержание мезофильных аэробных микроорганизмов в муке, по данным зарубежных исследователей, варьирует в широких пределах от <10 до 10^7 КОЕ/г. Содержание плесневых грибов в муке составляет от <10 до 10^5 КОЕ/г, дрожжей – от <10 до 10^4 КОЕ/г [46].

Бактерии *Pantoea agglomerans* (синоним *Erwinia herbicola*) являются типичными представителями эпифитной микробиоты зерна злаков. Высокое содержание бактерий этого вида на зерне является показателем его качества. В доброкачественном зерне и муке содержание указанных бактерий составляет не менее 90 % [15]. Бактерии рода *Pantoea* – грамотрицательные прямые палочки размерами $0,5\text{--}1,0 \times 1\text{--}3$ мкм, подвижные. Представители рода *Pantoea* ранее образовывали группу «herbicola» среди бактерий рода *Erwinia*. Они формируют на плотных питательных средах золотисто-желтые колонии [6]. Следует отметить, что последовательности генов 16S рРНК демонстрируют низкое разрешение на

внутриродовом уровне, что делает невозможной надежную идентификацию бактерий рода *Pantoea* до видов и подвидов [25].

На первом этапе исследований были определены микробиологические показатели муки ржаной обдирной и обойной, применяемой для ведения заквасок. Результаты исследований представлены в таблице 13. Следует принимать во внимание, что в настоящее время на микробиологические показатели муки нормативные требования отсутствуют.

Таблица 13 - Микробиологические показатели муки ржаной обдирной и обойной

Наименование показателей	Значения показателей муки ржаной						
	обдирной, пробы муки						обойной
	мука 1	мука 2	мука 3	мука 5	мука 6	мука 7	мука 4
КМАФАнМ, lg КОЕ/г	5,0±0,1	5,1±0,1	5,3±0,1	5,3±0,1	5,7±0,1	4,1±0,1	4,7±0,1
Спорообразующие бактерии, lg КОЕ/г	<2	<2	2,3±0,5	1,5±0,2	2,7±0,1	1,5±0,3	<2
Плесневые грибы, lg КОЕ/г	2,7±0,3	2,9±0,7	3,5±0,2	3,0±0,4	2,0±0,4	2,3±0,3	2,7±0,4
Дрожжи, lg КОЕ/г	3,0±0,4	3,0±0,1	4,0±0,2	4,1±0,1	4,2±0,2	2,3±0,1	3,0±0,5

Как видно из данных, представленных в таблице 13, показатель КМАФАнМ, характеризующий общее содержание микроорганизмов в продукте, составлял от 4,1 до 5,7 lg КОЕ/г. Споробразующие бактерии были обнаружены в четырех образцах муки ржаной обдирной. Плесневые грибы выявлены во всех исследуемых образцах. Содержание дрожжей варьировало от 2,3 до 4,2 lg КОЕ/г.

Для изучения таксономического состава образцов муки ржаной обдирной и обойной проведено секвенирование фрагментов гена 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina). Установлено (Таблица А.1, приложение А), что в образцах муки доминировали представители филогенетических групп *Proteobacteria* (29,6-85,9 % от метагенома) и *Firmicutes* (1,2-64,8 %), далее следовали *Actinobacteriota* (1,2-12,4 %) и *Bacteroidota* (до 4,3 %). Представители филумов *Cyanobacteria*, *Acidobacteriota*, *Verrucomicrobiota* составляли не более 0,5 %. В филуме *Proteobacteria* на уровне семейств доминировали *Erwiniaceae* (16,3–65,7 %) и *Pseudomonadaceae* (5,3–15,8 %). Филум *Firmicutes* был преимущественно

сформирован молочнокислыми бактериями семейства *Lactobacillaceae*, доля которых значительно варьировала между образцами муки (0,4-64,8 %). Среди молочнокислых бактерий преобладали *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (до 24,2 %) и *Limosilactobacillus pontis* (до 57,5 %), также были выявлены с низкой относительной численностью роды *Companilactobacillus* (до 3,7%), *Weissella* (до 2,1%), *Lactiplantibacillus* (до 1,8%), *Levilactobacillus* (до 1,1%), *Lactobacillus* (до 0,4%).

Таким образом, установлено, что ржаная мука, выработанная разными изготовителями, различается по микробиологическим показателям и таксономическому составу микробиома. Учитывая, что для заквасок спонтанного брожения мука является основным источником МКБ, представляет интерес исследование влияния обсемененности муки на микробиом заквасок.

3.2 Исследование влияния таксономического состава микробиома ржаных заквасок с направленным культивированием микроорганизмов в процессе их ведения на свойства полуфабрикатов и показатели качества хлеба

Исследовали изменение таксономического состава бактериального микробиома ржаных заквасок (густой и жидкой без заварки) с направленным культивированием микроорганизмов в процессе их ведения с помощью высокопроизводительного секвенирования. Определяли влияние изменения состава микробиома заквасок на биотехнологические свойства полуфабрикатов и показатели качества хлеба.

3.2.1 Реидентификация промышленноценных штаммов лактобацилл, входящих в состав стартовых микробных композиций для заквасок, применяемых в технологии хлебобулочных изделий

Промышенноценные штаммы молочнокислых бактерий из коллекции культур микроорганизмов «Молчнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности» СПбФ ФГАНУ НИИХП были

Таблица 14 - Биохимические свойства промышленноценных штаммов лактобацилл

Наименование субстрата	Наименование штамма/Биохимическая реакция						
	<i>L.brevis</i> 5	<i>L.brevis</i> 78	<i>L.plantarum</i> 63	<i>L.plantarum</i> 30	<i>L.fermentum</i> 34	<i>L.brevis</i> 1	<i>L.casei</i> 26
L-арабиноза	-	+	-	+	-	+	+
D-рибоза	+	+	+	+	+	+	+
D-ксилоза	-	-	-	-	+	-	-
D-галактоза	+	+	+	+	+	+	+
D-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
D-фруктоза	+	+	+	+	+	+	+
D-манноза	+	+	+	-	+	+	-
L-сорбоза	+	-	-	-	-	-	-
D-маннит	+	+	+	-	-	+	-
D-сорбит	+	+	-	-	-	+	-
Метил- α ,D-маннопиранозид	-	+	-	-	-	+	-
N-ацетилглюкозамин	+	+	+	-	-	+	-
Амигдалин	-	+	+	-	-	+	-
Арбутин	+	+	+	-	-	+	-
Эскулин /железа цитрат	+	+	+	-	-	+	-
Салицин	+	+	+	-	-	+	-
D-целлобиоза	+	+	-	-	-	+	-
D-мальтоза	+	+	+	+	+	+	+
D-лактоза	+	+	+	-	+	+	-
D-мелибиоза	-	+	-	+	+	+	+
D-сахароза	+	+	+	+	+	+	+
D-трегалоза	+	+	+	-	-	+	-
Инулин	+	-	-	-	-	-	-
D-мелецитоза	+	-	+	+	-	-	+
D-раффиноза	-	-	-	+	+	+	+
Гентиобиоза	-	+	-	-	-	+	-
D-тураноза	+	+	+	-	-	+	-
D-тагатоза	+	-	+	-	-	-	-
D-арабит	-	+	-	-	-	+	-
L-арабит	+	-	-	-	-	-	-
Калия глюконат	-	+	+	-	+	+	-

Примечание: «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат

Результаты биохимической идентификации представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Результаты биохимического метода идентификации на основе изучения сахаролитической активности штаммов

Штамм в коллекции (по паспорту)	Результат идентификации		
	Род, вид	%id	T*
<i>L.fermentum 34</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99,9	1,0
<i>L.brevis 78</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99,9	0,83
<i>L. plantarum 63</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	99,9	0,75
<i>L. plantarum 30</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	93,6	0,89
<i>L.brevis 5</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	99,9	0,72
<i>L.brevis 1</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99,9	0,87
<i>L. casei 26</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	93,6	0,89

Примечание: *Величина T статистически показывает близость профиля изучаемой культуры к типовому представителю вида, достоверный уровень идентификации до вида соответствует значению T>0,75-0,80.

В результате биохимической идентификации лактобацилл с помощью тест-системы API 50 CHL установлено, что штаммы *L. brevis 5* и *L. plantarum 63* могут быть отнесены к виду *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, однако имеют некоторые отличия в отношении к субстрату. Так, штамм *L. brevis 5* сбраживает L-сорбозу, D-целлобиозу, D-сорбит, инулин, L-арабит и не сбраживает калия глюконат и амигдалин. В результате изучения сахаролитической активности штаммы *L. brevis 78* и *L. brevis 1* отнесены к виду *Lactiplantibacillus plantarum*. Штамм *L. brevis 78*, в отличие от *L. brevis 1*, не сбраживает D-раффинозу. Биохимические профили штаммов *L. plantarum 30* и *L. casei 26* идентичны и соответствуют профилю вида *Lentilactobacillus buchneri*. В результате исследования углеводного метаболизма штамма *L. fermentum 34* выявлена его принадлежность к виду *Limosilactobacillus fermentum*.

Точность результатов идентификации с помощью биохимических тест-систем существенно зависит от надежности базы данных. Для точной видовой идентификации лактобацилл, наряду с фенотипическими тестами, которые не

всегда позволяют различать близкородственные виды, необходимо применять методы с более высоким таксономическим разрешением (например, секвенирование фрагментов гена 16S рРНК, MALDI-TOF MS).

Результаты генетической идентификации представлены в таблице 16. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК представлены в Приложении Б.

Таблица 16 - Результаты идентификации штаммов лактобацилл молекулярно-генетическим методом

Штамм в коллекции (по паспорту)	Ближайший гомолог по данным BLASTN		
	Род/вид/штамм	Идентификатор в GenBank	% идентичных нуклеотидов
<i>L. brevis</i> 5	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> Lp02	CP039707.1	1446/1449 (99 %)
	<i>Lacticaseibacillus casei</i> RV-M191	MK966340.1	1446/1449 (99 %)
<i>L. casei</i> 26	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i> FAM21731	CP018796.1	1489/1490 (99 %)
<i>L. brevis</i> 1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> IMAUJBP3	CP143879.1	1477/1481 (99 %)
<i>L. plantarum</i> 30	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i> FAM21731	CP018796.1	1489/1491 (99 %)
<i>L. fermentum</i> 34	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> HFD1	CP050919.1	499/499 (100 %)
<i>L. plantarum</i> 63	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> TMPC 46J16	OM758235.1	490/490 (100 %)
	<i>Lacticaseibacillus casei</i> SWU92194	KF673503.1	490/490 (100 %)
<i>L. brevis</i> 78	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Heal19	CP055123.1	1482/1482 (100 %)

Сравнительная оценка результатов идентификации лактобацилл двумя методами представлена в таблице 17.

В результате проведенных исследований показано, что установленная видовая принадлежность для всех штаммов, за исключением *L. fermentum* 34, не соответствовала исходным паспортным данным, составленным на основе классических микробиологических методов исследования и метода люминесцирующих антител.

Таблица 17 - Результаты параллельной идентификации промышленноценных штаммов лактобацилл

Штамм в коллекции (по паспорту)	Результат идентификации с помощью	
	секвенирования 16S рРНК	тест-системы API 50 CHL
<i>L.brevis</i> 78	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>L.fermentum</i> 34	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>L. plantarum</i> 63	<i>Lacticaseibacillus paracasei/</i> <i>casei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
<i>L. plantarum</i> 30	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>
<i>L.brevis</i> 5	<i>Lacticaseibacillus paracasei/</i> <i>casei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
<i>L.brevis</i> 1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>L. casei</i> 26	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>

Проведенными исследованиями не удалось однозначно идентифицировать штаммы, принадлежащие к видам *Lacticaseibacillus paracasei/casei*, т.к. нуклеотидные последовательности исследуемого фрагмента 16S рРНК имели 99-100 % идентичности. В связи с этим для двух штаммов *L. plantarum* 63 и *L. brevis* 5 точная видовая принадлежность не была установлена.

Согласно полученным результатам, коллекционные штаммы *L.plantarum* 30 и *L.casei* 26 отнесены к виду *Lentilactobacillus parabuchneri*; *L.brevis* 5 и *L.plantarum* 63 - *Lacticaseibacillus paracasei/casei*; *L.brevis* 78 и *L.brevis* 1 - *Lactiplantibacillus plantarum*.

3.2.2 Исследование таксономического состава микробиома густой ржаной закваски в процессе ее ведения

Для исследования изменения таксономического состава микробиома густой ржаной закваски в процессе ее ведения проведено секвенирование фрагментов гена 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina). Густую ржаную закваску вели на протяжении двух месяцев в условиях лаборатории СПбФ ФГАНУ НИИХП. Для выведения закваски по разводочному циклу применяли МКБ *Lactiplantibacillus plantarum* B4 (ранее *L. brevis* 78), *Lacticaseibacillus paracasei/casei* B3 (ранее

L. brevis 5), *Lacticaseibacillus paracasei/casei* B31 (ранее *L. plantarum* 63) и дрожжи *K. humilis* Y128 (ранее *C. milleri* Чернореченский). Для приготовления заквасок использовали муку ржаную обдирную (шифр образца «мука 5», раздел 2.3.4). Результаты исследований представлены на рисунке 8.

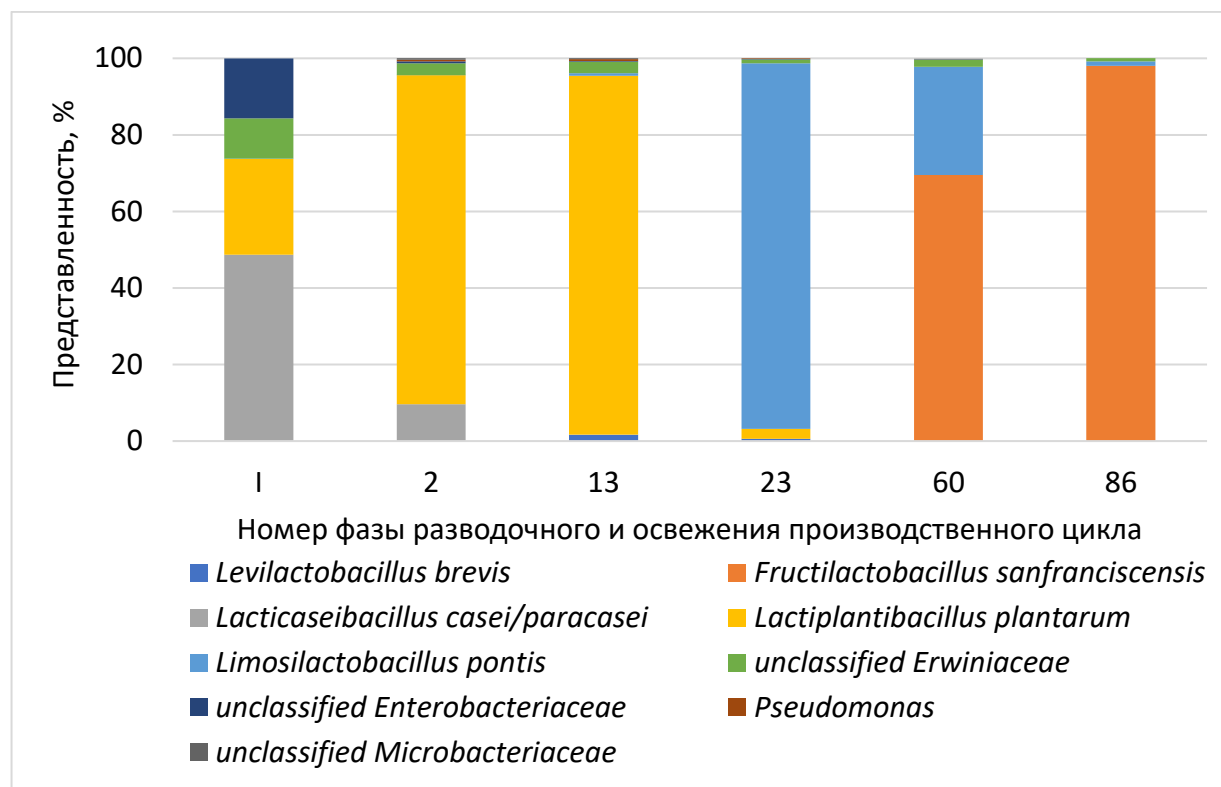


Рисунок 8 - Изменение таксономического состава микробиома густой ржаной закваски при длительном ее ведении

Установлено, что в закваске I фазы разводочного цикла преобладали лактобациллы видов *Lactiplantibacillus plantarum* (24,7 %) и *Lacticaseibacillus paracasei/casei* (48,2 %), т.е. стартовые культуры. Используемый в работе метатаксономический метод не позволяет идентифицировать конкретный штамм микроорганизма, поэтому не следует с абсолютной уверенностью утверждать об устойчивости стартовых штаммов лактобацилл при длительном ведении закваски. Однако можно обоснованно предположить, что доминировали именно стартовые культуры по следующей причине: количество клеток МКБ, внесенных в I фазу разводочного цикла, было достаточно высоким (10^6 КОЕ/г закваски), в то время как вместе с мукой ржаной обдирной, которая является главным источником

загрязнения, было внесено бактерий 10^4 КОЕ/г закваски, при этом доля семейства *Lactobacillaceae* в используемой партии муки была низкой и составляла 1 % в структуре бактериального сообщества. Однако в закваске I фазы разводочного цикла также были выявлены представители филума *Proteobacteria* семейства *Enterobacteriaceae* (15,6 %) и *Erwiniaceae* (10,5 %), источником которых являлась мука. Ко 2-му освежению производственного цикла доля *Erwiniaceae* снизилась до 2,9 %, а бактерий семейства *Enterobacteriaceae* до 0,5 %, также произошли изменения в соотношении стартовых культур - значительно увеличилась доля *Lactiplantibacillus plantarum* (85,5 %), а доля *Lacticaseibacillus paracasei/casei* снизилась (9,6 %). Установлено, что к 23-му освежению производственного цикла наблюдалось резкое изменение состава заквасочного микробиома. Стартовые культуры лактобацилл, внесенные в водно-мучную питательную смесь, не были обнаружены. Доминирующее положение занимал вид *Limosilactobacillus pontis* (95,0 %), однако уже к 60-му освежению стал преобладать вид *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (69,1 %), в то время как доля *Limosilactobacillus pontis* значительно снизилась (28,1 %). В закваске 86-го освежения производственного цикла доминирующее положение занимал вид *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (97,6 %). Проведенные исследования не выявили лактобациллы видов *Limosilactobacillus pontis* и *Fructilactobacillus sanfranciscensis* в используемой партии муки, предположительно их содержание было крайне низким.

3.2.3 Исследование биотехнологических свойств густой ржаной закваски в процессе ее ведения

Исследовано влияние изменения таксономического состава микробиома густой ржаной закваски, поддерживаемой в условиях лаборатории в течение двух месяцев, на ее физико-химические и микробиологические показатели свойств. Результаты исследований представлены на рисунке 9.

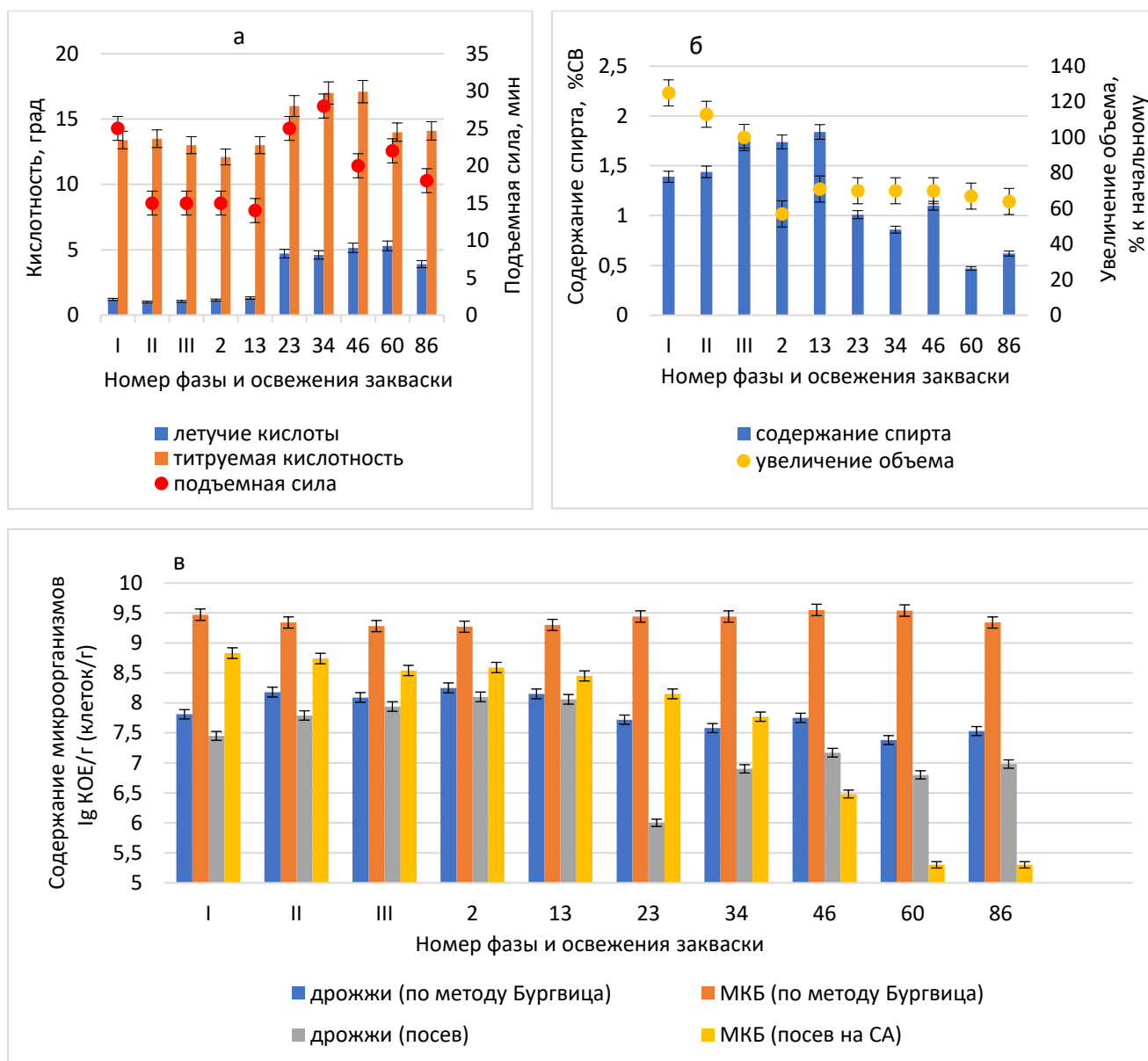


Рисунок 9 - Изменение физико-химических и микробиологических показателей свойств густой ржаной закваски в процессе ее ведения: а) кислотности, содержания летучих кислот, подъемной силы; б) содержания спирта и увеличения закваски в объеме; в) содержания МКБ и дрожжей

Установлено, что выброженная закваска в разводочном цикле имела биотехнологические свойства, характерные для данного вида заквасок. Титруемая кислотность варьировала от 13,0 до 13,5 град, подъемная сила - от 15 до 25 мин. В период до 23-го освежения производственного цикла закваска имела спиртовой запах, обусловленный смещением соотношения дрожжи: МКБ в сторону дрожжевого брожения (1:11-1:15), в то время как для густой ржаной закваски хорошего качества рекомендуемым соотношением дрожжей и лактобацилл

является 1:60-1:80 [4]. Количество клеток дрожжей в этот период составляло от 7,5 до 8,1 lg КОЕ/г, молочнокислых бактерий - от 8,5 до 8,8 lg КОЕ/г. Содержание летучих кислот было достаточно низким - от 7,4 до 10 % к титруемой кислотности, что связано с развитием гомоферментативных видов МКБ (*Lactiplantibacillus plantarum* и *Lacticaseibacillus paracasei/casei*). Существенные изменения таксономического состава заквасочного микробиома привели к увеличению содержания летучих кислот в закваске, что было связано с развитием гетероферментативных видов МКБ (*Limosilactobacillus pontis* и *Fructilactobacillus sanfranciscensis*).

В ходе исследований было проведено определение содержания органических кислот в заквасках. Установлено, что в процессе ведения закваски происходило увеличение содержания уксусной кислоты. Так, в заквасках в период до 23-го освежения производственного цикла количество уксусной кислоты составляло менее 0,025 г/100 г, а в заквасках 23-го и 86-го освежения содержание уксусной кислоты было 0,21 и 0,26 г/100 г соответственно. Содержание молочной кислоты в закваске производственного цикла составляло от 0,67 до 0,88 г/100 г. Увеличение содержания уксусной кислоты в процессе ведения закваски коррелировало с увеличением содержания летучих кислот. Следовательно, по значительному изменению содержания летучих кислот в процессе ведения заквасок можно предположить изменение видового состава лактобацилл.

В период с 23-го по 86-ое освежения производственного цикла закваска медленнее увеличивалась в объеме, количество спирта снижалось, подъемная сила ухудшалась, при этом титруемая кислотность увеличивалась, что в итоге привело к изменению органолептических свойств закваски. Запах приобрел более выраженный заквасочный оттенок. Указанные изменения были обусловлены снижением содержания дрожжей, количество которых в этот период составляло от 6,0 до 7,0 lg КОЕ/г, и смещением соотношения дрожжи: МКБ в сторону молочнокислого брожения (1:52-1:132). Установлено, в густой ржаной закваске на протяжении всего периода ведения доминировали дрожжи вида *K. humilis*.

На рисунке 10 представлены колонии МКБ и дрожжей, выросшие при посеве закваски на сусло-агар.

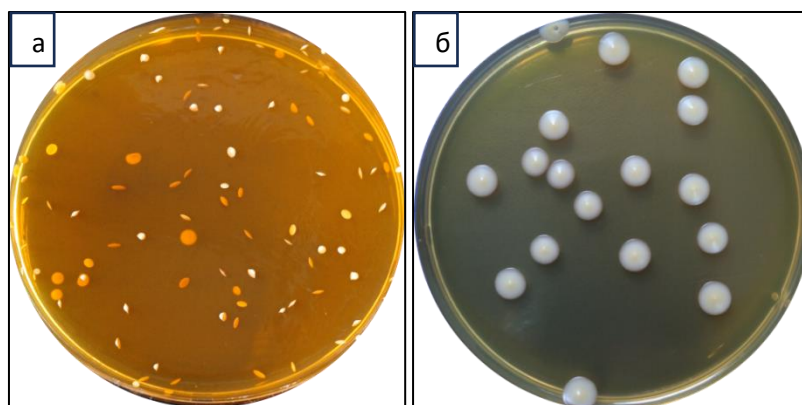


Рисунок 10 - Колонии заквасочных микроорганизмов на чашках Петри с сусло-агаром а) МКБ; б) дрожжи вида *K. humilis*

При количественном учете содержания лактобацилл двумя методами (метод постоянных окрашенных препаратов и культуральный метод) наблюдалась существенная разница в результатах. Так, количество клеток МКБ в процессе ведения закваски составляло от 9,3 до 9,5 lg клеток/г при подсчете на фиксированных окрашенных препаратах. В то время как при определении культуральным методом количество клеток уменьшалось от 8,8 lg КОЕ/г (I фаза разводочного цикла) до 8,2 lg КОЕ/г (23-е освежение), а затем до 5,3 lg КОЕ/г (86-ое освежение). Уменьшенное количество клеток, определяемое при посеве, по-видимому, обусловлено тем, что для количественного определения лактобацилл применяли сусло-агар (12 % сухих веществ) с мелом, на котором могут не расти некоторые виды заквасочных лактобацилл, в частности вид *Fructilactobacillus sanfranciscensis*.

Полученные результаты показывают необходимость подбора питательных сред для учета лактобацилл в зрелых заквасках взамен сусло-агара. В настоящее время для определения содержания молочнокислых бактерий в пищевых продуктах применяется питательная среда MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) в соответствии с ГОСТ 10444.11-2013. Однако в ряде исследований показано, что для учета заквасочных лактобацилл вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis*

целесообразно применять другие питательные среды. Так, С. Picozzi и соавт. [116], было определено содержание молочнокислых бактерий в 57 образцах пшеничных заквасок с использованием следующих питательных сред:

- 1) SDB агар (SourDough Bacteria medium) в прописи Kline и Sugihara [90]. Состав среды (г/л): казеиновый пептон - 6,0; дрожжевой экстракт - 3,0; мальтоза - 20,0; твин 80 - 0,3; свежеприготовленный дрожжевой экстракт - 15 мл;
- 2) SFM агар (SanFrancisco medium) в прописи Vogel et al. [136] с заменой ржаных или пшеничных отрубей, хлебопекарных дрожжей на свежеприготовленный дрожжевой экстракт. Состав среды приведен в разделе 2.3.5;
- 3) MRS агар (de Man, Rogosa and Sharpe) [59] с добавлением циклогексимида (100 мг/л) для ингибирования заквасочных дрожжей.

Авторами установлено, что наибольшее количество лактобацилл было выявлено при применении питательных сред SFM (среднее значение Ig КОЕ/г составило 8,4) и SDB (среднее значение Ig КОЕ/г составило 7,1). Показано, что в 16 образцах заквасок содержание лактобацилл было ниже предела обнаружения ($<10^3$ КОЕ/г) при использовании питательной среды MRS, а для 41 образца среднее значение Ig КОЕ/г составило 5,4, что было значительно ниже по сравнению с результатами, полученными при использовании питательных сред SDB и SFM. Выделенные изоляты лактобацилл со среды MRS были отнесены к видам *Levilactobacillus brevis* и *Limosilactobacillus panis*, в то время как изоляты, выросшие на питательных средах SFM и SDB, были определены как *Fructilactobacillus sanfranciscensis*. Таким образом, при применении питательной среды MRS доминантный вид *Fructilactobacillus sanfranciscensis* не был обнаружен, а были выявлены субдоминантные виды.

Поэтому в дальнейших исследованиях для определения содержания *Fructilactobacillus sanfranciscensis* в заквасках длительного ведения применяли питательную среду SFM в модификации Picozzi. Такой выбор обоснован составом питательной среды, включающим дополнительные источники углерода (мальтоза,

фруктоза, глюконат), свежеприготовленный дрожжевой экстракт, обеспечивающим более высокую скорость роста культур.

3.2.4 Исследование влияния густой ржаной закваски на показатели качества ржаного хлеба

Исследовано влияние изменения таксономического состава микробиома и биотехнологических свойств густой ржаной закваски на физико-химические свойства теста и показатели качества хлеба ржаного из обдирной муки формового (Таблица 18).

Установлено, что образцы теста, приготовленные на заквасках 23-86-го освежений, имели более высокую кислотность, что связано с более высокой кислотностью заквасок, обусловленной изменением видового состава лактобацилл. Это оказало положительное влияние на значение показателя кислотности хлеба и его вкус и запах. Также отмечалось увеличение продолжительности расстойки, обусловленное снижением содержания дрожжей в закваске.

В образцах хлеба, приготовленных на заквасках 2-го и 13-го освежений производственного цикла, отмечалась достаточно низкая кислотность (от 5,4 до 5,6 град) и невысокое содержание летучих кислот (от 13,0 до 16,1 % к титруемой кислотности), обусловленные более низкой кислотностью и микробным составом закваски, вследствие чего хлеб имел невыраженные вкус и запах. Физико-химические показатели качества хлеба, выработанного с применением заквасок с 23-го по 86-ое освежения, значительно отличались от образцов хлеба на заквасках 2-го и 13-го освежений производственного цикла. Так, кислотность хлеба и содержание летучих кислот (в основном уксусной) значительно увеличились, а количество спирта снизилось, что оказало положительное влияние на вкус и запах хлеба ржаного формового из обдирной муки. Диаграмма органолептической оценки образцов хлеба представлена на рисунке 11.

Таблица 18 - Влияние продолжительности ведения закваски в производственном цикле на свойства теста и показатели качества хлеба ржаного из обдирной муки формового

Наименование показателей	Значения показателей свойств теста и качества хлеба, приготовленных с использованием густой ржаной закваски производственного цикла						
	2	13	23	34	46	60	86
Номер освежения закваски в производственном цикле							
Тесто							
Кислотность, град							
- начальная	6,4	6,4	6,3	7,8	6,7	7,4	6,0
- конечная	7,8	8,0	10,6	9,8	11,0	10,6	10,8
Подъемная сила, мин	11	11	12	11	10	14	11
Увеличение объема, % к начальному	75	78	83	83	83	76	75
Продолжительность брожения, мин	90						
Продолжительность расстойки, мин	43	43	53	57	49	44	47
Хлеб							
Влажность мякиша, %	49,0	49,0	48,8	48,9	49,0	49,0	48,8
Кислотность мякиша, град	5,4	5,6	9,0	10,2	9,0	8,2	9,4
Пористость, %	62	65	63	61	65	65	62
Удельный объем, см ³ /г	1,56	1,64	1,62	1,60	1,63	1,64	1,60
Содержание:							
- летучих кислот, % к титруемой кислотности	13,0	16,1	40,0	42,2	42,2	45,7	35,1
- молочной кислоты, г/100 г	-	1,53	0,82	-	-	-	1,04
- уксусной кислоты, г/100 г	-	менее 0,025	0,21	-	-	-	0,19
- спирта, % СВ	0,55	0,42	0,21	0,26	0,18	0,11	0,12
Продолжительность хранения до появления признаков микробной порчи при заражении тест-штаммом <i>P. chrysogenum F601</i> , ч	45	40	Рост плесневых грибов не обнаружен в течение всего срока хранения (7 суток)				
Внешний вид:	соответствующая хлебной форме, в которой производилась выпечка						
- форма							
- поверхность	гладкая, без трещин и подрывов						
- цвет корки	темно-коричневый						

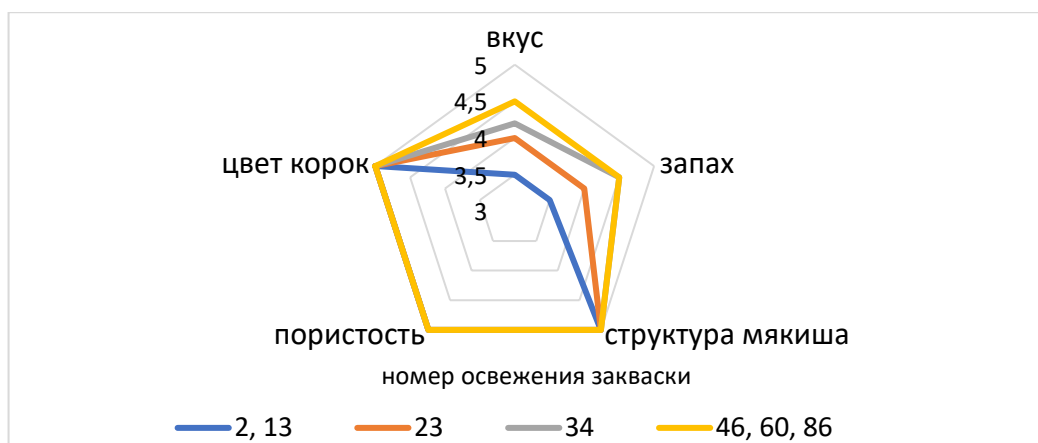


Рисунок 11 - Профилограмма органолептической оценки образцов хлеба ржаного из обдирной муки формового

Полученные результаты показывают, что изменение видового состава лактобацилл в ржаных густых заквасках влияет на показатели качества готовых изделий. При этом необходимо подчеркнуть, что все образцы хлеба соответствовали требованиям ГОСТ 2077-2023. Значительных изменений в показателях удельного объема и пористости не обнаружено. Увеличение кислотности и содержания летучих кислот (в основном уксусной) в хлебе привело к повышению его устойчивости к плесневению. Так, образцы готовых изделий, приготовленных на заквасках с 23-го по 86-ое освежение, не заболели при принудительном заражении ломтиков хлеба тест - штаммом плесневых грибов *P. chrysogenum* F601. На образцах готовых изделий, выработанных на заквасках 2-го и 13-го освежений, колонии плесневых грибов при принудительном заражении появлялись через 40-45 ч (Рисунок 12).

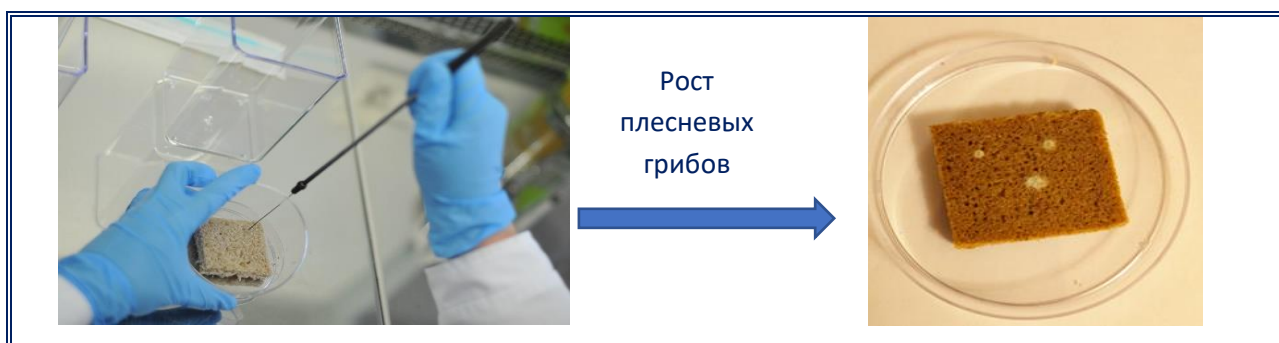


Рисунок 12 - Рост плесневых грибов *P. chrysogenum* на ломтике хлеба при принудительном заражении

Исследованиями установлено, что инокуляция водно-мучной питательной смеси стартовыми культурами заквасочных микроорганизмов обеспечивает превалирование заквасочных лактобацилл, начиная с I фазы разводочного цикла, и ингибирует развитие посторонней микробиоты, источником которой является мука, а также позволяет получить закваску с требуемыми биотехнологическими свойствами. Установлено, что в процессе ведения закваски происходит вытеснение стартовых культур лактобацилл через 2 недели ведения (23-е освежение производственного цикла) с существенным изменением биотехнологических свойств закваски. В данном эксперименте показано и многолетним опытом работы ФГАНУ НИИХП подтверждено, что при выведении заквасок на чистых культурах происходит замена стартовых культур лактобацилл на другие виды с сохранением в доминирующем количестве заквасочной бродильной микробиоты и отсутствием посторонних гнилостных микроорганизмов, что подтверждает положительное влияние чистых культур на инициацию и продолжение процесса брожения.

3.2.5 Исследование таксономического состава микробиома жидкой ржаной закваски без заварки в процессе длительного ее ведения

Исследовано изменение таксономического состава микробиома жидкой ржаной закваски без заварки в процессе ее ведения в течение двух месяцев в условиях лаборатории СПбФ ФГАНУ НИИХП с помощью метагеномных методов. Для выведения закваски по разводочному циклу применяли чистые культуры МКБ *Lactiplantibacillus plantarum* B5 (ранее *L.brevis* 1), *Limosilactobacillus fermentum* B28 (ранее *L. fermentum* 34), *Lentilactobacillus parabuchneri* B7 (ранее *L.casei* 26), *Lentilactobacillus parabuchneri* B33 (ранее *L.plantarum* 30) и дрожжей - *S.cerevisiae* Y120 (штамм Л-1), *K.humilis* Y128 (ранее *C. milleri* Чернореченский). Для приготовления закваски использовали муку ржаную обдирную (шифр образца «мука б», раздел 2.3.4). Результаты исследований представлены на рисунке 13.

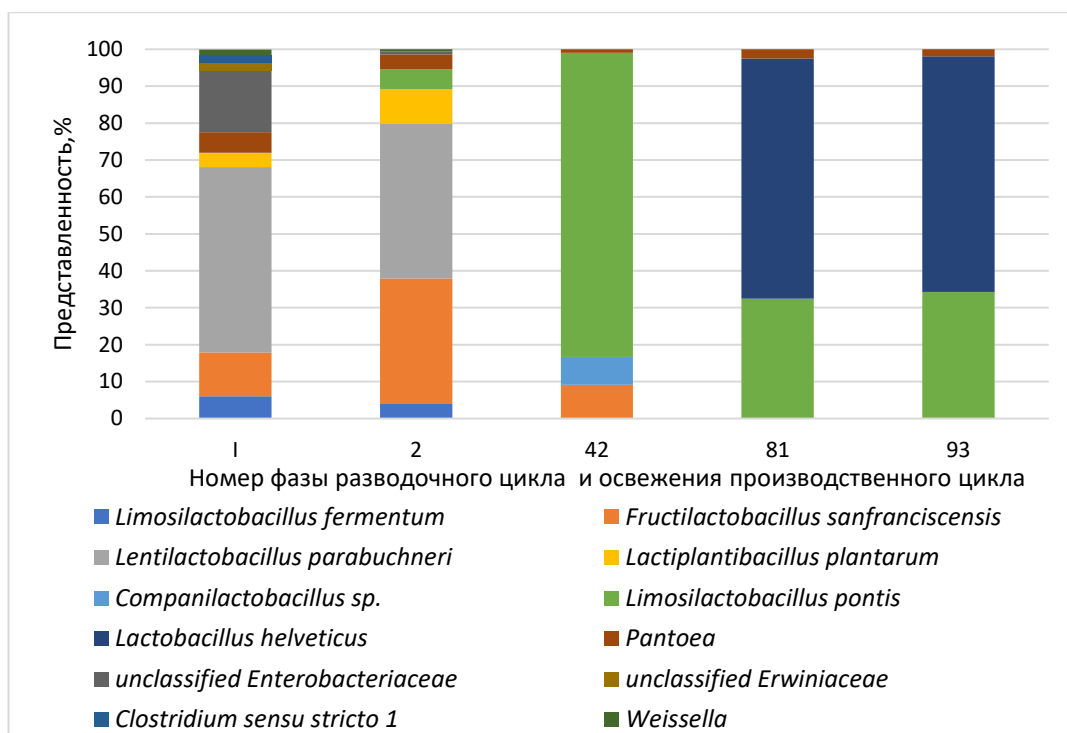


Рисунок 13 - Изменение таксономического состава микробиома жидкой ржаной закваски в течение 2-х месячного ведения в лабораторных условиях

В жидкой ржаной закваске без заварки в конце I фазы разводочного цикла преобладали лактобациллы видов *Lentilactobacillus parabuchneri* (50,2 %), *Limosilactobacillus fermentum* (5,6 %), *Lactiplantibacillus plantarum* (3,9 %), т.е. стартовые культуры, а также вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (11,9 %). Молочнокислые бактерии вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis* не были обнаружены в используемой партии муки, вероятно, их содержание было чрезмерно низким. Возможно, источником контаминации закваски являлись поверхности технологического оборудования или инвентаря. Помимо лактобацилл были обнаружены представители филума *Proteobacteria* бактерии семейств *Enterobacteriaceae* (16,7 %) и *Erwiniaceae* (6,6 %), содержание которых снизилось к производственному циклу. В процессе дальнейших последовательных освежений закваски были обнаружены значительные изменения таксономического состава микробиома на уровне семейства *Lactobacillaceae*. Во 2-ом освежении производственного цикла доля *Fructilactobacillus sanfranciscensis* существенно увеличилась до 34 %, при этом по-прежнему преобладали лактобациллы вида

Lentilactobacillus parabuchneri (42,0 %). Однако к 42-му освежению доминирующее положение заняли лактобациллы вида *Limosilactobacillus pontis* (82,4 %), а к 81-му освежению – лактобациллы вида *Lactobacillus helveticus* (65,0 %), обнаруженные в применяемой для ведения заквасок партии муки.

3.2.6 Исследование биотехнологических свойств жидкой ржаной закваски без заварки в процессе ее ведения

Исследовано влияние изменения таксономического состава микробиома жидкой ржаной закваски без заварки, поддерживаемой в условиях лаборатории в течение двух месяцев, на ее физико-химические и микробиологические показатели. Результаты исследований представлены на рисунке 14.

Проведенные исследования показали, что в разводочном цикле закваска имела биотехнологические свойства характерные для жидкой ржаной закваски без заварки. Так, титруемая кислотность варьировала от 10,2 до 12,2 град, подъемная сила - от 13 до 19 мин. Соотношение дрожжи: МКБ, определяемое методом Бургвица, находилось в пределах от 1:21 до 1:34 (Рисунок 14).

В производственном цикле в закваске с 68-го по 81-е освежение содержание летучих кислот снизилось, что было обусловлено преобладанием вида *Lactobacillus helveticus*, который относится к группе гомоферментативных МКБ. Содержание спирта в процессе ведения снижалось, закваски медленнее увеличивались в объеме, что возможно связано с изменением в составе дрожжевой микробиоты. Так, начиная с 28-го освежения производственного цикла, в закваске обнаруживались дрожжи только вида *K. humilis*. Однако в проведенных ранее Афанасьевой О.В. исследованиях [4] показано, что в жидкой ржаной закваске без заварки виды дрожжей *K. humilis* (ранее *S. minor*) и *S. cerevisiae* развиваются совместно. Вытеснение дрожжей вида *S. cerevisiae* в представленных исследованиях возможно связано с тем, что в процессе ведения закваски, в силу технологических причин, произошло превышение титруемой кислотности в некоторых фазах (до 15,4 град), а вид дрожжей *S. cerevisiae* не является кислотоустойчивым (переносит

кислотность до 12 град). Соотношение дрожжи: МКБ, определяемое методом Бургвица, в производственном цикле варьировало от 1:21 до 1:55. Известно, что для жидкой ржаной закваски без заварки хорошего качества соотношение дрожжи: МКБ составляет 1:37-1:57 [4]. Таким образом, в представленных исследованиях соотношение дрожжи: МКБ в некоторых освежениях производственного цикла было смещено в сторону дрожжевого брожения. На протяжении всего эксперимента закваска имела характерный заквасочный запах.

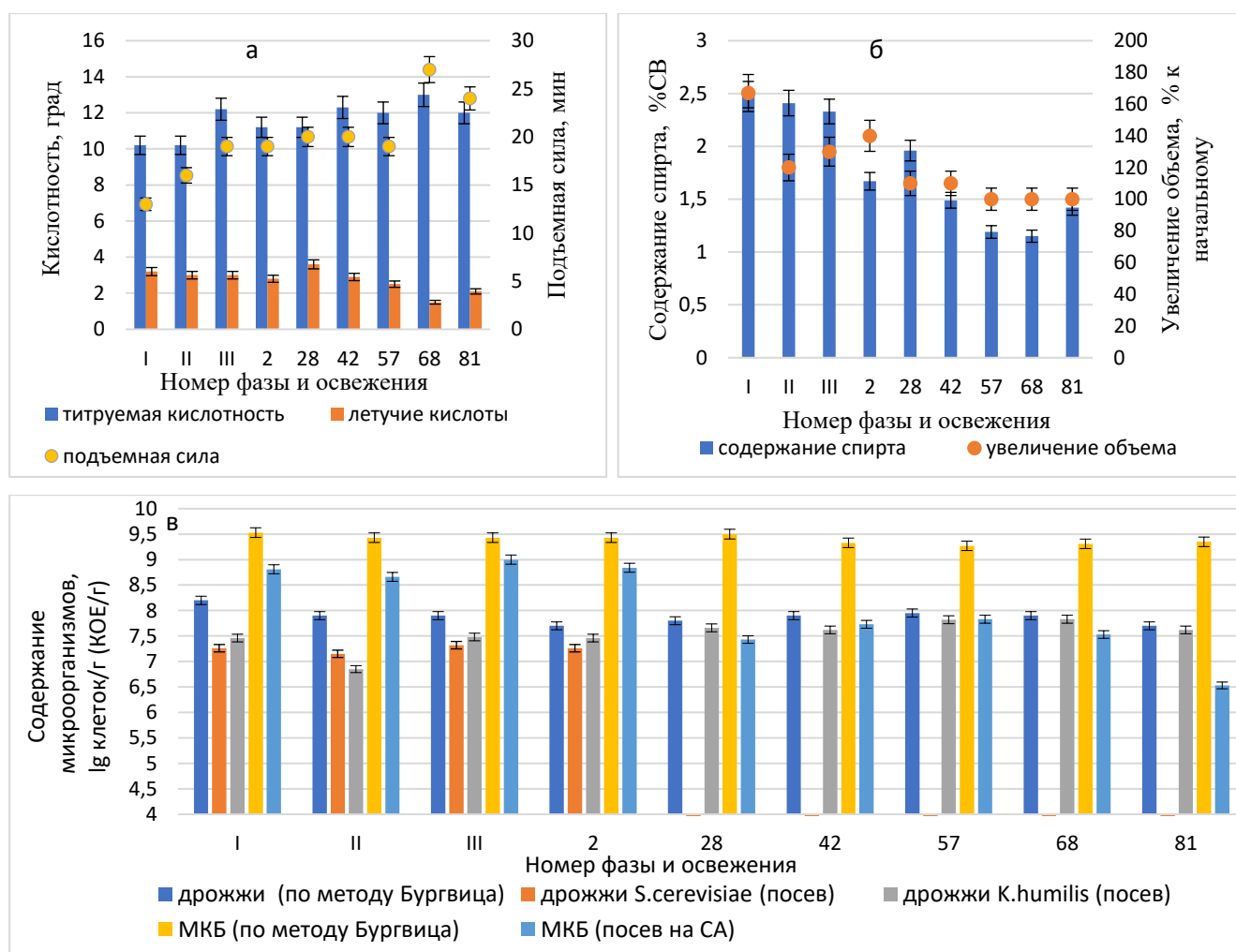


Рисунок 14 - Изменение физико-химических и микробиологических показателей свойств жидкой ржаной закваски без заварки в процессе ее ведения: а) кислотности, содержания летучих кислот и подъемной силы; б) содержания спирта и увеличения закваски в объеме; в) содержания МКБ и дрожжей

При количественном учете содержания лактобацилл двумя методами (метод постоянных окрашенных препаратов и культуральный метод) наблюдалась

существенная разница в результатах, как и в опытах с густой ржаной закваской. Так, количество клеток МКБ в процессе ведения закваски варьировало от 9,3 до 9,5 lg клеток/г при подсчете на фиксированных окрашенных препаратах. Тогда как при определении культуральным методом количество клеток в процессе ведения закваски уменьшалось от 8,8 lg КОЕ/г (I фаза разводочного цикла) до 6,5 lg КОЕ/г (81-е освежение). Снижение количества клеток, определяемое при посеве на сусло - агар (12 % сухих веществ) с мелом, по-видимому, связано с тем, что на указанной питательной среде могут не расти некоторые виды заквасочных лактобацилл, в частности *Limosilactobacillus pontis* и *Lactobacillus helveticus*.

3.2.7 Исследование влияния жидкой ржаной закваски без заварки на показатели качества ржаного хлеба

Исследовали влияние изменения микробиома жидкой ржаной закваски без заварки на физико-химические свойства теста и показатели качества хлеба ржаного из обдирной муки формового. Результаты исследований представлены в таблице 19.

В тесте, приготовленном на закваске 2-го освежения производственного цикла, наблюдалась наименьшая продолжительность расстойки (29 мин) и наилучшая подъемная сила (5 мин), что может быть связано с сохранением в закваске двух видов дрожжей – *S. cerevisiae* (7,3 lg КОЕ/г) и *K. humilis* (7,5 lg КОЕ/г) (Рисунок 14). В тесте, приготовленном на образцах закваски 28-го, 42-го, 57-го, 68-го и 81-го освежений, отмечается увеличение продолжительности расстойки до 36-47 мин и ухудшение подъемной сил до 6-9 мин, что может быть связано с изменением видового состава дрожжей в закваске при сопоставимом их количественном содержании. Так, в заквасках данных освежений установлено присутствие только одного вида дрожжей *K. humilis* (7,6-7,8 lg КОЕ/г), отличающегося более низкой бродильной активностью по сравнению с видом дрожжей *S. cerevisiae* [4].

Таблица 19 - Влияние продолжительности ведения жидкой ржаной закваски без заварки в производственном цикле на свойства теста и показатели качества хлеба ржаного из обдирной муки формового

Наименование показателей	Значения показателей свойств теста и качества хлеба, приготовленных на жидкой ржаной закваске без заварки					
Номер освежения закваски в производственном цикле	2	28	42	57	68	81
Тесто						
Титруемая кислотность, град						
начальная	7,0	7,0	7,6	7,2	7,6	8,0
конечная	9,4	9,6	10,1	10,2	10,5	11,2
Подъемная сила, мин	5	7	7	6	9	9
Увеличение объема, %	83	83	83	83	75	75
Продолжительность расстойки, мин	29	43	43	36	47	43
Хлеб						
Влажность мякиша, %	49,0	48,9	49,0	49,0	48,8	48,6
Кислотность мякиша, град	7,8	8,2	9,0	8,0	8,6	8,0
Пористость, %	62	63	61	60	61	63
Удельный объем, см ³ /г	1,74	1,72	1,81	1,72	1,63	1,62
Содержание: летучих кислот, % к титруемой кислотности	36,8	30,4	33,3	25,0	24,4	25,6
- молочной кислоты, г/100 г	0,81	-	0,62	-	-	0,79
- уксусной кислоты, г/100 г	0,16	-	0,20	-	-	0,13
- спирта, % СВ	0,55	0,38	0,28	0,28	0,32	0,35
Продолжительность хранения до появления признаков микробной порчи при заражении тест-штаммом <i>P. chrysogenum F601</i> , ч	рост плесневых грибов не обнаружен в течение всего срока хранения (7 суток)					
Внешний вид:						
- форма	соответствующая хлебной форме, в которой производилась выпечка					
- поверхность	гладкая, без трещин и подрывов					
- цвет корки	коричневый					
Состояние мякиша:						
-пористость	развитая, без пустот и уплотнений, мелкая,					
- промес	без следов непромеса					
- промеченность	пропеченный, не липкий, не влажный на ощупь					
Вкус	соответствует данному виду изделий, без постороннего привкуса					
Запах	соответствует данному виду изделий, без постороннего запаха					

Все образцы хлеба, выработанные с применением жидкой ржаной закваски разной продолжительности ведения, по показателям кислотности, пористости и влажности соответствовали требованиям ГОСТ 2077-2023 (таблица 19). Так, кислотность всех образцов хлеба колебалась в диапазоне 7,8-9,0 град при требованиях нормативной документации – не более 11,0 град. Все образцы хлеба имели сопоставимые показатели удельного объема.

Содержание спирта снижалось в образцах хлеба, приготовленных на заквасках 28-81-го освежений, что коррелирует с изменением видового состава дрожжей и доминированием вида *K. humilis*. В образцах хлеба, приготовленных на заквасках 57-81-го освежений, отмечается снижение содержания летучих кислот по сравнению с хлебом, приготовленным на закваске 2-го освежения, что может быть обусловлено изменением видового состава лактобацилл. Установлено, что продолжительность ведения закваски не оказывала влияния на органолептические показатели качества хлеба, несмотря на изменение микробиоты. По показателям внешнего вида, состояния мякиша все готовые изделия соответствовали требованиям ГОСТ 2077-2023.

Таким образом, проведенные исследования показали, что изменение микробиома жидкой ржаной закваски без заварки не оказывало существенного влияния на физико-химические и органолептические показатели качества хлеба в отличие от густой ржаной закваски (раздел 3.2.4), в которой появление и доминирование вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis* привело к улучшению физико-химических (увеличению кислотности и содержания летучих кислот, снижению содержания спирта) и органолептических показателей качества хлеба. Показано, что применение закваски производственного цикла повышает устойчивость готовых изделий к плесневению. Так, при принудительной контаминации ломтиков хлеба тест-штаммом *Penicillium chrysogenum* F601, колонии плесневых грибов не наблюдались.

3.3 Исследование влияния таксономического состава микробиома ржаных заквасок спонтанного брожения в процессе их ведения на свойства полуфабрикатов и показатели качества хлеба

Исследовали изменение таксономического состава микробиома ржаных заквасок (густой и жидкой без заварки) спонтанного брожения в процессе их ведения с помощью высокопроизводительного секвенирования. Определяли влияние изменения микробиома заквасок на биотехнологические свойства полуфабрикатов и показатели качества ржаного хлеба.

3.3.1 Исследование динамики микробиома заквасок спонтанного брожения в процессе их ведения

Исследовали состав микробных сообществ восьми заквасок спонтанного брожения - четыре густые ржаные и четыре жидкие ржаные закваски без заварки. Для выведения каждого из двух видов заквасок применяли четыре образца муки: три партии муки ржаной обдирной разных производителей («мука 1», «мука 2», «мука 3») и одну партию муки ржаной обойной («мука 4»). Закваски готовили и поддерживали в активном состоянии путем регулярных освежений водно-мучной питательной смесью в лаборатории СПбФ ФГАНУ НИИХП в течение одного месяца. Состав микробных сообществ определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК.

В результате проведенных исследований установлено, что в процессе ведения заквасок спонтанного брожения происходит уменьшение доли последовательностей, принадлежащих к филуму *Proteobacteria*, с одновременным увеличением доли *Firmicutes* (Рисунок 15). На 10-е сутки ведения во всех исследуемых образцах заквасок доминировали представители филума *Firmicutes* (>97,2 %), в котором основную долю составляли молочнокислые бактерии семейства *Lactobacillaceae*. Представители филумов *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*,

Cyanobacteria, *Acidobacteriota*, *Verrucomicrobiota*, выявленные в муке, не были обнаружены в заквасках через сутки брожения.

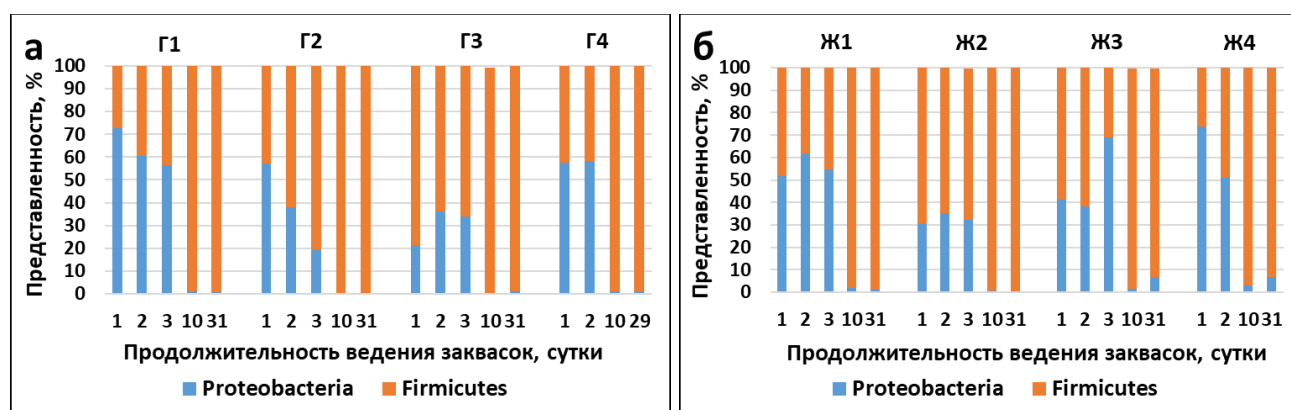


Рисунок 15 -Таксономический состав микробиома заквасок спонтанного брожения (на уровне филумов): а) густые закваски; б) жидкие ржаные закваски без заварки. В шифре заквасок указан тип закваски (Г — густые, Ж — жидкие) и партия муки (1, 2, 3, 4)

Филум *Proteobacteria* был представлен семействами *Enterobacteriaceae* и *Erwiniaceae*, которые полностью вытеснялись через 10 суток ведения заквасок (Рисунок 16, 17), что по времени совпадало с получением зрелой закваски. Семейство *Enterobacteriaceae* является достаточно обширным и объединяющим грамотрицательные бактерии, различающиеся по своим свойствам. Для *Enterobacteriaceae* характерен смешанный тип брожения (муравьинокислое и бутандиоловое), продуктами которого являются органические кислоты (уксусная, муравьиная, янтарная, молочная), этанол, глицерол, ацетоин, 2,3-бутандиол, диоксид углерода и молекулярный водород, поэтому присутствие этих бактерий в значительном количестве может оказывать существенное влияние на биотехнологические и органолептические свойства заквасок [10]. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* могут сохраняться в заквасках до 5 суток ведения благодаря способности к синтезу органических кислот и определенной устойчивости к кислотному стрессу [67]. Зарубежными исследованиями показано, что *Cronobacter sakazakii* и *Klebsiella pneumoniae*, внесенные совместно с лактобациллами в водно-мучную питательную смесь, были вытеснены через

несколько освежений пшеничных заквасок. Так, к концу первого цикла ферментации содержание *C. sakazakii* и *K. pneumoniae* составило 7 и 8 log КОЕ/г соответственно, при дальнейшем ведении их количество уменьшилось и к 5-6-му циклу было ниже предела обнаружения, предусмотренного применяемым методом, при этом значение рН снизилось до 4,5 [66].

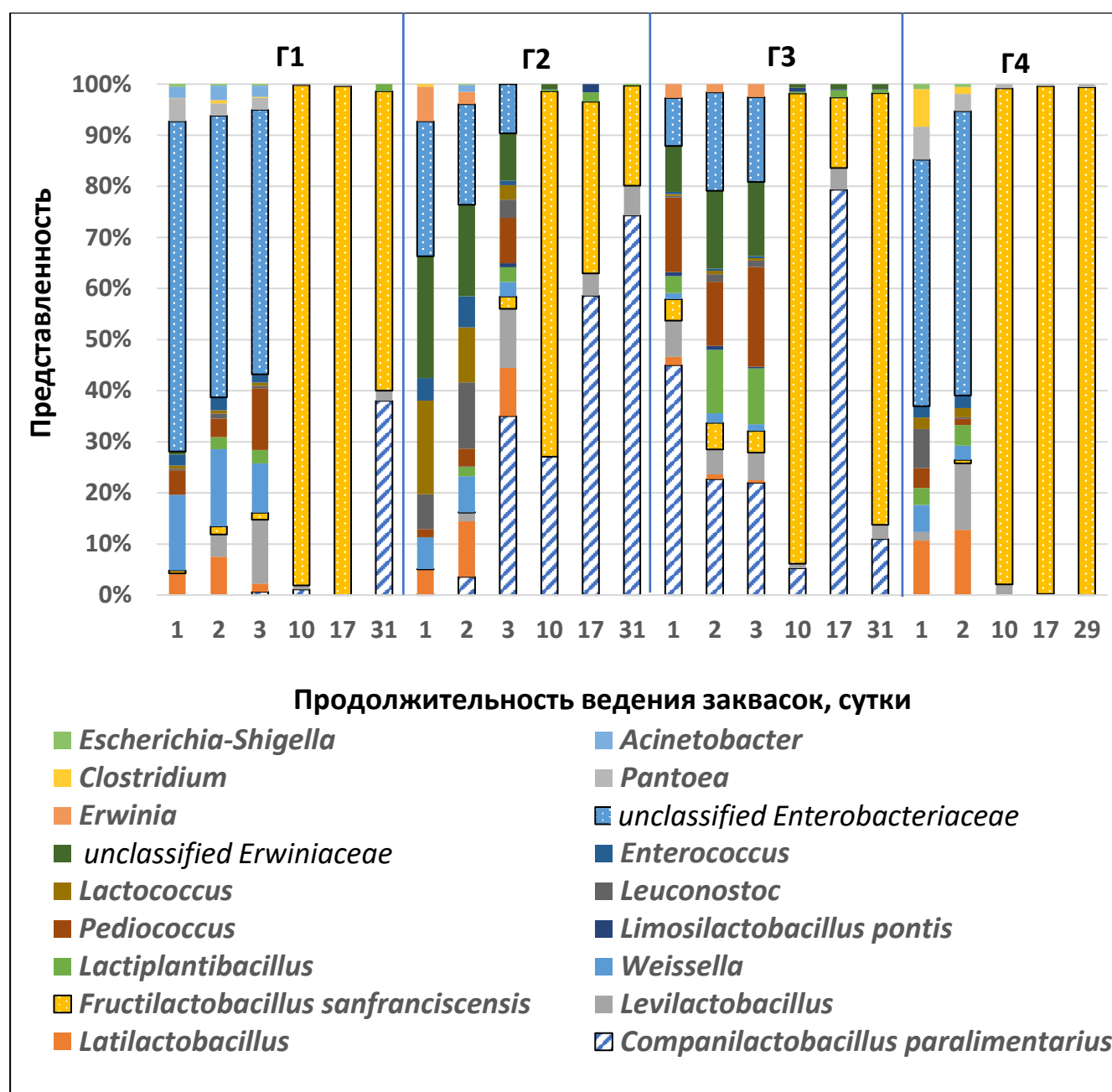


Рисунок 16 - Таксономический состав микробиома густых ржаных заквасок по данным анализа метагенома 16S рРНК. В шифре заквасок указан тип закваски (Г — густые) и партия муки (1, 2, 3, 4)

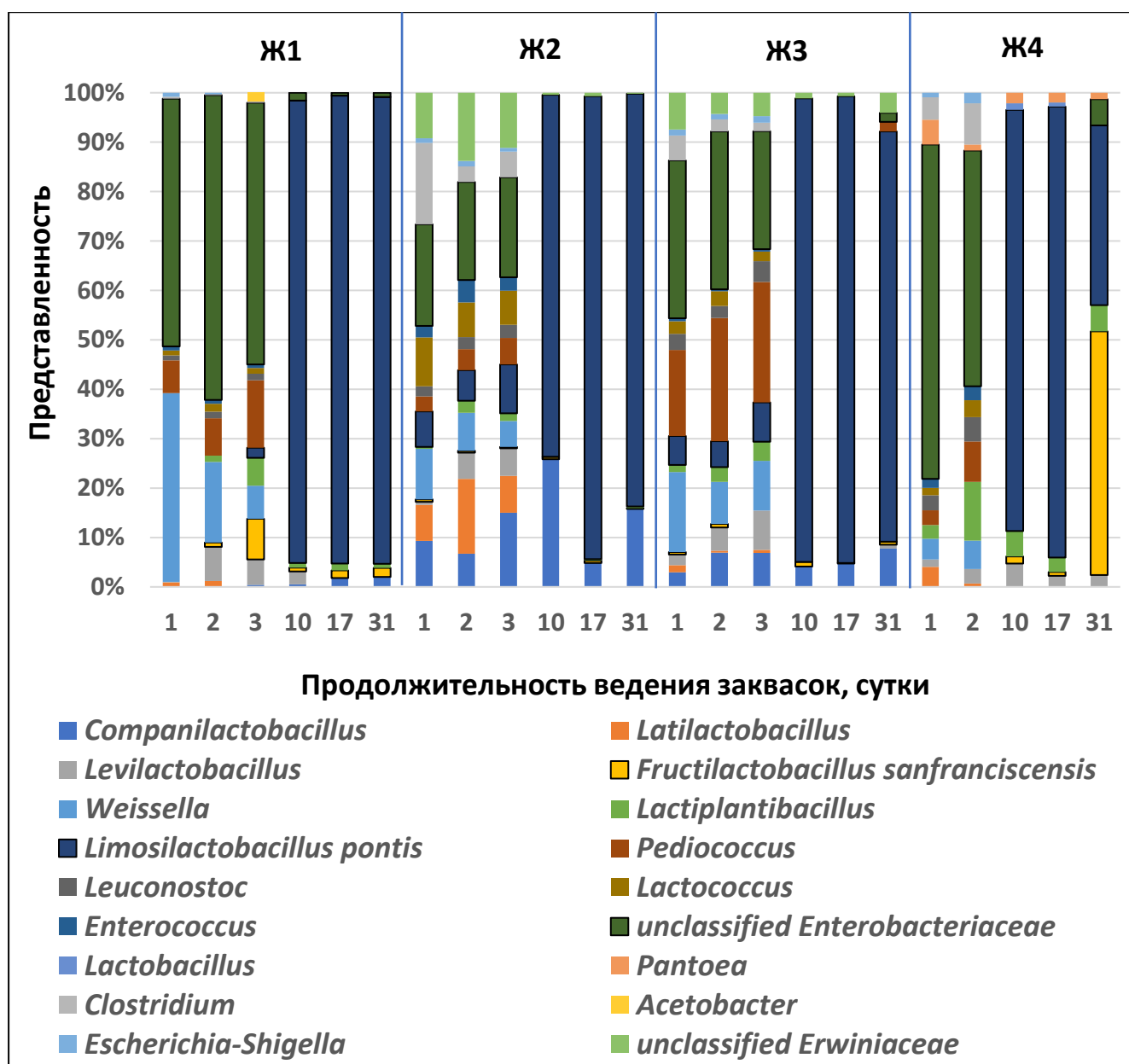


Рисунок 17 - Таксономический состав микробиома жидких ржаных заквасок без заварки по данным анализа метагенома 16S рРНК. В шифре заквасок указан тип закваски (Ж — жидкие) и партия муки (1, 2, 3, 4)

Филум *Firmicutes* был преимущественно сформирован молочнокислыми бактериями семейства *Lactobacillaceae* (Рисунок 16, 17). В молодых заквасках (1–3-и сутки ведения) были выявлены представители семейства *Clostridiaceae*: *C. baratii*, *C. butyricum*, *C. perfringens* (до 16,3 % от метагенома). Бактерии рода *Clostridium* являются грамположительными, облигатно анаэробными, палочковидными, спорообразующими, в основном, каталазоотрицательными. Микробная порча пищевых продуктов бактериями рода *Clostridium* вызвана их

сахаролитической или протеолитической активностью и проявляется в изменении рН продукта (в результате продуцирования органических кислот), газообразовании и появлении неприятного запаха. Вид *Clostridium perfringes*, являющийся распространенным бактериальным патогеном, способен вызывать порчу пищевых продуктов вследствие газообразующей и протеолитической активности [5]. Многие штаммы могут расти в пределах рН от 5,5 до 8,0, как правило, не ниже 5,0. Размножение клостридий ингибируется при значении рН ниже 3,5-4,0 [11], поэтому в зрелых заквасках они ингибируются. Ранее клостридии были выявлены в заквасках спонтанного брожения из муки тритикале [80] продолжительностью ведения 1-2 суток. Также бактерии рода *Clostridium* были обнаружены в китайских пшеничных заквасках [98].

В молодых заквасках спонтанного брожения (1–3-и сутки ведения) было обнаружено 11 родов молочнокислых бактерий: *Companilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Fructilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* (Рисунок 16, 17). Установлено, что в заквасках через 24 ч брожения доминирующее положение, среди молочнокислых бактерий, занимали роды *Weissella*, *Lactococcus*, *Companilactobacillus* и *Latilactobacillus*. В процессе дальнейшего ведения происходило значительное изменение микробиома заквасок на уровне семейства *Lactobacillaceae*: снижение представленности родов *Latilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* и увеличение доли родов *Fructilactobacillus* и *Companilactobacillus* в густых заквасках, *Limosilactobacillus* и *Fructilactobacillus* в жидких заквасках. Установлено, что во всех исследуемых густых ржаных заквасках продолжительностью ведения более 10 суток доминирующее положение занимали только два вида лактобацилл *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (от 13,8 до 99,4 %) и *Companilactobacillus paralimentarius* (от 1,1 до 79,1 %), которые характерны для зрелых заквасок. Гомоферментативный вид лактобацилл *Companilactobacillus paralimentarius*, не ферментирующий мальтозу, часто выявляется в заквасках

совместно с гетероферментативным видом *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, сбраживающим мальтозу, из-за отсутствия конкуренции между ними [96, 133].

В жидких ржаных заквасках, выведенных на обдирной муке, преобладали лактобациллы вида *Limosilactobacillus pontis* (72,8-94,2%), в то время как в закваске на обойной муке - *Limosilactobacillus pontis* (36,2-90,9%) и *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (0,8-49,1%). Превалирование лактобацилл связано с их устойчивостью к снижению рН, что обеспечивает им конкурентоспособность в условиях закваски. Эти бактерии играют решающую роль в формировании микробиома заквасок, т.к. продуцируют органические кислоты (молочную, уксусную), что приводит к снижению рН и подавлению гнилостной микробиоты. Кислотообразование является видовым и штаммовым признаком. Однако продуцирование органических кислот не является единственным механизмом антагонизма. Значительное влияние оказывают антимикробные и антибиотикоподобные соединения: лизоцим, пероксид водорода, диацетил, реутерин, бактериоцины [33, 55, 125].

Полученные и представленные в работе результаты совпадают с данными зарубежных исследователей и подтверждают теорию «трехстадийной эволюции» [46, 52, 61, 67, 85, 87, 93, 106, 113, 114]. Согласно этой теории в заквасках спонтанного брожения в период с первых по вторые сутки ведения преобладают молочнокислые бактерии родов *Enterococcus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*. В представленных в данной работе исследованиях этот этап, вероятно, был завершён в срок до 24 ч брожения. Вторая фаза, характеризующаяся увеличением обилия представителей родов *Lactobacillus*, *Pediococcus* и *Weissella*, обычно наступает на 3-5-ые сутки ведения, а в исследуемых заквасках проявилась уже через 24 ч брожения. Третья фаза (6-10 сутки ведения), характеризующаяся доминированием хорошо адаптированных штаммов лактобацилл, в данном эксперименте наступила на 10 сутки.

Проведенные исследования показали, что густые и жидкие ржаные закваски без заварки спонтанного брожения являются зрелыми и стабильными (т.е.

пригодны для приготовления теста и выработки хлебобулочных изделий) через десять суток ведения независимо от микробной обсемененности муки, что полностью согласуется с данными зарубежных исследований [102, 132, 138]. Быстрое развитие лактобацилл в водно-мучной питательной смеси приводит к подавлению развития бактерий, содержащихся в муке, включая представителей семейств *Erwiniaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Microbacteriaceae*, не позволяя этим микроорганизмам влиять на процесс ферментации и органолептические свойства заквасок.

Установлено, что микробная обсемененность ржаной муки не оказывает влияния на таксономический состав микробиома заквасок спонтанного брожения. Параметры ведения отечественных заквасок (влажность, температура), которые отличаются от принятых зарубежом, оказывают решающее влияние на формирование микробиома заквасок спонтанного брожения на уровне видов лактобацилл. Различия в доминирующих видах лактобацилл в густых и жидких ржаных заквасках обусловлены разницей в технологических параметрах ведения. Так, жидкие ржаные закваски без заварки имеют более высокую влажность (70 %) и температуру ведения (32 °С) по сравнению с густыми заквасками (влажность 50 %, температура 26 °С). Доминирующий во всех исследуемых густых ржаных заквасках продолжительностью ведения более 10 суток вид *Fructilactobacillus sanfranciscensis* был выявлен и в трех используемых для выведения заквасок партиях муки («мука 1», «мука 2», «мука 4»), за исключением одного образца муки («мука 3»). Вид *Companilactobacillus paralimentarius*, обнаруженный в трех густых заквасках, также был выявлен в двух партиях ржаной обдирной муки («мука 2», «мука 3»), за исключением образца «мука 1». Возможно, содержание указанных видов лактобацилл было ниже предела обнаружения применяемого метода, либо их источником являлась среда пекарни (поверхности оборудования, инвентаря). Преобладающий в жидких ржаных заквасках без заварки вид *Limosilactobacillus pontis* был детектирован во всех партиях исследуемой муки ржаной обдирной и обойной.

3.3.2 Исследование биотехнологических свойств ржанных заквасок спонтанного брожения в процессе их ведения

Исследовано изменение биотехнологических свойств ржанных заквасок спонтанного брожения, поддерживаемых в активном состоянии путем регулярных освежений водно-мучной питательной смесью в течение одного месяца. Установлено, что в заквасках в результате процесса брожения в течение 48 ч происходило значительное снижение показателя активной кислотности (рН). Так, показатель рН водно-мучных питательных смесей до брожения составлял в среднем 6,39 (от 6,26 до 6,6), в то время как в заквасках этот показатель существенно снизился и через 24 ч брожения достиг значения 5,74 (от 4,76 до 6,15) для густых заквасок и 4,11 (от 3,81 до 4,23) для жидких заквасок; через 48 ч брожения - 4,19 (от 3,76 до 4,52) для густых заквасок и 3,70 (от 3,55 до 3,95) для жидких заквасок. Наиболее резкое снижение показателя рН наблюдалось в густой и жидкой заквасках (образцы ГЗ и ЖЗ), выведенных с применением «муки 3». В этих же образцах заквасок содержание МКБ через 24 ч брожения было наибольшим. В зрелых заквасках (>10 суток ведения) значение рН находилось в диапазоне от 4,07 до 4,43 для густых заквасок; от 3,72 до 3,84 для жидких заквасок (Рисунок 18).

В жидких ржанных заквасках процесс кислотонакопления происходил более интенсивно. Это связано с более высокой температурой ведения заквасок, что оказывает положительное влияние на развитие МКБ. Так, через 24 ч брожения содержание МКБ в жидких заквасках составляло 8,9 lg КОЕ/г (от 8,6 до 9,1), в то время как в густых заквасках 8,2 lg КОЕ/г (от 7,3 до 9,2). В зрелых заквасках (более 10 суток) содержание молочнокислых бактерий было достаточно высоким и варьировало от 8,5 до 9,6 lg КОЕ/г (Рисунок 18). Применение питательной среды San Francisco Medium Modified позволило выявить лактобациллы видов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* и *Limosilactobacillus pontis* в зрелых заквасках (Рисунок 19).

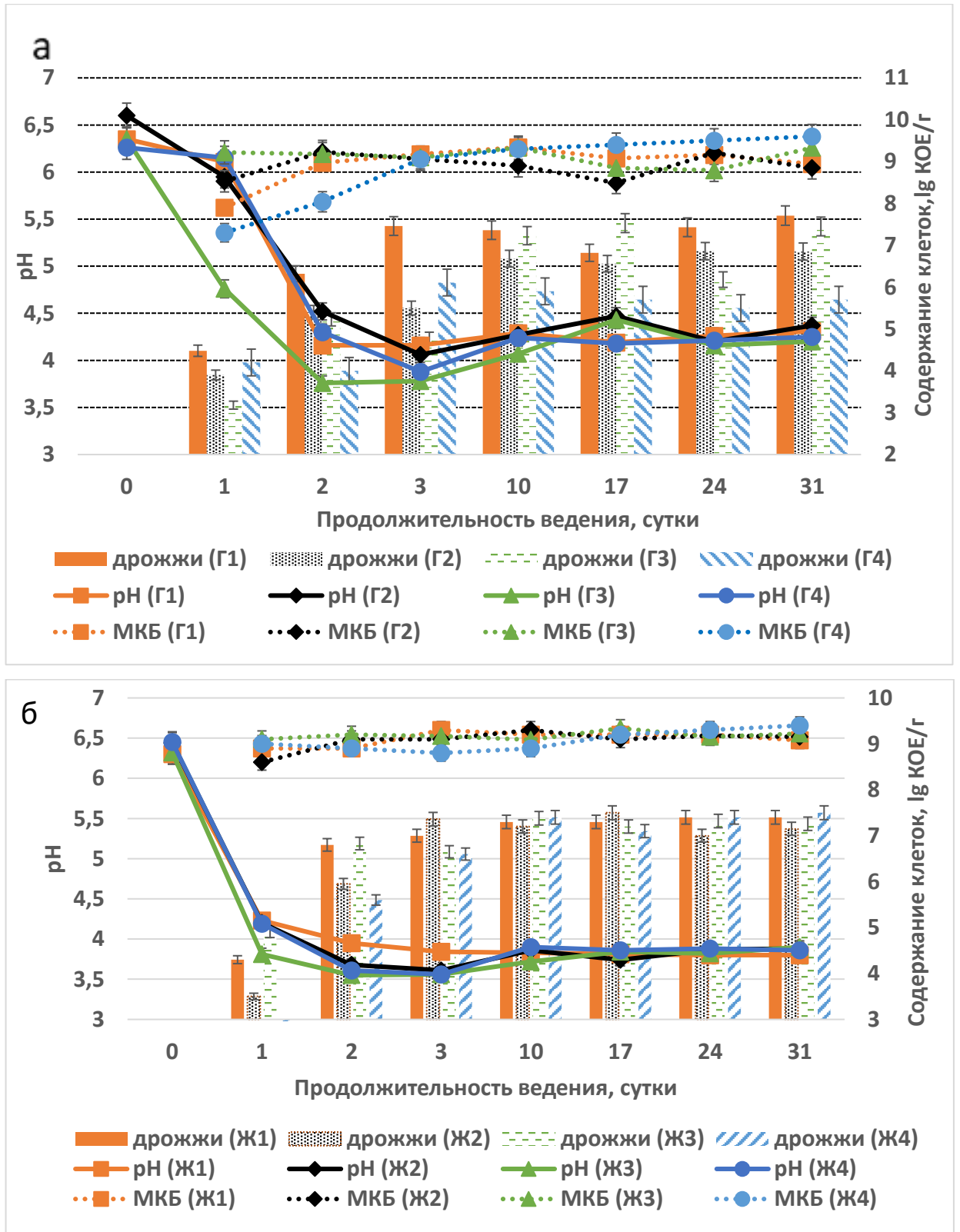


Рисунок 18 - Изменение биотехнологических свойств: а) густых ржаных заквасок; б) жидких ржаных заквасок без заварки в процессе ведения в течение одного месяца. В шифре заквасок указан тип закваски (Г — густые, Ж — жидкие) и партия муки (1, 2, 3, 4)

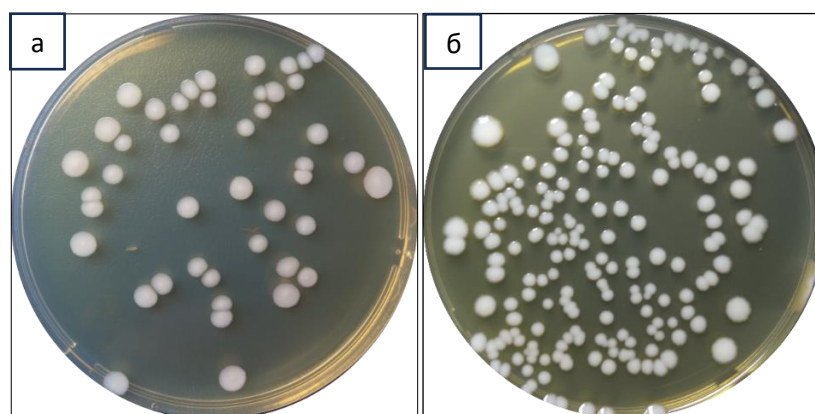


Рисунок 19 – Колонии *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (а) и *Limosilactobacillus pontis* (б) на питательной среде San Francisco Medium Modified, выросшие при посеве зрелых заквасок спонтанного брожения

Существенным показателем хода процесса брожения и активности МКБ является содержание летучих кислот. В случае заквасок спонтанного брожения этот показатель целесообразно определять только в зрелых заквасках, когда начинают превалировать представители семейства *Lactobacillaceae*.

Содержание дрожжей в заквасках спонтанного брожения через 24 ч брожения варьировало в широких пределах (от < 2 до $4,5 \text{ lg КОЕ/г}$) и зависело от применяемой партии муки. В зрелых заквасках содержание дрожжей находилось в пределах от $5,5$ до $7,7 \text{ lg КОЕ/г}$ (Рисунок 18).

При посеве молодых заквасок спонтанного брожения (1-3-и сутки ведения) на агар с бенгальским розовым, дихлораном и хлорамфениколом (DRBC- агар) были выявлены плесневые грибы ($< 3,0 \text{ lg КОЕ/г}$), которые при дальнейшем ведении заквасок были подавлены благодаря высокой кислотности.

В молодых заквасках спонтанного брожения показатель «подъемная сила» не может служить показателем активности дрожжевой микробиоты до тех пор, пока не будут ингибированы посторонние бактерии, не принадлежащие к семейству *Lactobacillaceae*, т.к. метод всплывающего шарика определяет количество диоксида углерода, не только выделенного дрожжами, а и энтеробактериями, которые в результате брожения продуцируют диоксид углерода. Поэтому подъемную силу определяли только в зрелых заквасках спонтанного брожения (более 10 суток ведения).

При микроскопии препаратов, приготовленных из молодых заквасок по методу Бургвица, были выявлены молочнокислые бактерии в форме кокков и палочек, дрожжевые клетки, а также посторонняя микрофлора. На рисунке 20 наглядно показано изменение в составе заквасочной микрофлоры в процессе ведения заквасок спонтанного брожения.

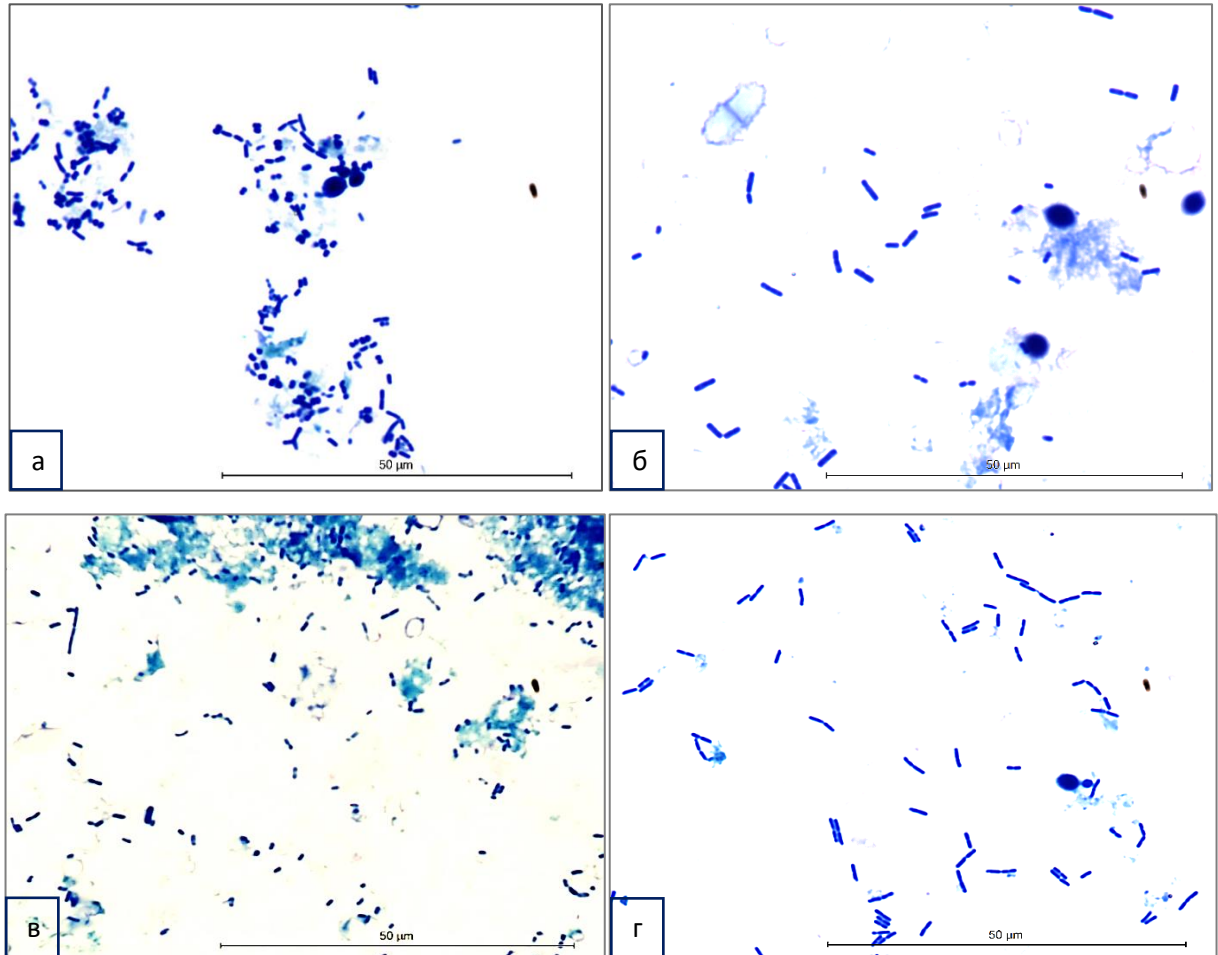


Рисунок 20 – Изменение микрофлоры заквасок спонтанного брожения (препарат по методу Бургвица, х 1500) в процессе их ведения: а) жидкая закваска ЖЗ-2, б) жидкая закваска ЖЗ-10, в) густая закваска Г4-2, г) густая закваска Г4 – 10

В препаратах, приготовленных из заквасок после 24 ч брожения, видны МКБ в форме кокков, которые достаточно сложно дифференцировать по морфологическим признакам, и палочек, а в заквасках продолжительностью ведения 10-31 сутки были обнаружены только молочнокислые бактерии в форме палочек (лактобациллы), т.е. происходит сдвиг в профиле микрофлоры заквасок на уровне семейства *Lactobacillaceae*. Таким образом, широко применяемый в

хлебопекарной промышленности метод Бургвица позволяет выявить изменение в составе микробиоты заквасок спонтанного брожения, однако не приемлем для количественного учета и идентификации молочнокислых бактерий, а также посторонних не заквасочных микроорганизмов. Поэтому метод Бургвица может быть применим только к закваскам с направленным культивированием микроорганизмов, либо к зрелым закваскам спонтанного брожения, в которых доминируют МКБ и дрожжи, а посторонние не заквасочные бактерии отсутствуют.

При органолептической оценке заквасок отмечено, что молодые закваски спонтанного брожения (1-7-е сутки ведения) имели выраженный неприятный гнилостный запах, обусловленный развитием не заквасочных микроорганизмов (*Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*). Изменения в структуре бактериальных сообществ заквасок, совпадающие по времени со снижением активной кислотности заквасок (рН), привели к изменению запаха заквасок на выраженный заквасочный, без гнилостных оттенков.

Зрелые густые закваски спонтанного брожения (более 10 суток ведения) имели биотехнологические свойства, рекомендуемые для данного вида заквасок. Титруемая кислотность составляла от 10,7 до 14,7 град, подъемная сила - от 13 до 31 мин, содержание спирта - от 0,76 до 2,23 % СВ. Содержание летучих кислот было достаточно высоким (от 22,0 до 43,1 % к титруемой кислотности), что способствовало появлению выраженного заквасочного запаха во всех образцах (Приложение В, Таблицы В.1, В.3).

Все образцы жидких ржаных заквасок без заварки продолжительностью ведения более 10 суток также имели биотехнологические свойства, рекомендуемые для указанного вида заквасок. Титруемая кислотность варьировала от 11,2 до 13,6 град, подъемная сила - от 16 до 32 мин, содержание спирта - от 2,09 до 3,71 % СВ. Количество летучих кислот было достаточно высоким (от 20,0 до 42,4 % к титруемой кислотности), что возможно объяснить доминированием гетероферментативных видов лактобацилл (Приложение В, Таблицы В.2, В.3).

3.3.3 Исследование влияния заквасок спонтанного брожения на показатели качества ржаного хлеба

Молодые закваски спонтанного брожения (<10 суток) для выпечки хлеба не применяли из-за наличия посторонней бактериальной и грибной микробиоты, а также неудовлетворительных биотехнологических свойств. Установлено, что все образцы хлеба ржаного из обдирной муки формового и хлеба ржаного «Простого» формового, приготовленные на зрелых заквасках спонтанного брожения (более 10 суток), соответствовали требованиям ГОСТ 2077-2023 по показателям влажности, кислотности, пористости (приложение В).

Варианты хлеба на густых заквасках Г2-17, Г2-31, Г3-17 имели пониженную кислотность, что объясняется более низким показателем титруемой кислотности указанных заквасок, которая обусловлена доминированием гомоферментативного вида *Companilactobacillus paralimentarius*. По органолептическим показателям образцы хлеба были сопоставимы между собой и соответствовали требованиям ГОСТ 2077-2023.

3.4 Разработка нового микробного консорциума с улучшенными биотехнологическими свойствами для повышения качества и безопасности хлебобулочных изделий

Установлено (разделы 3.2.2; 3.2.3; 3.2.4), что в процессе ведения густых ржаных заквасок с направленным культивированием микроорганизмов происходит изменение заквасочного микробиома вследствие вытеснения стартовых культур, приводящее к улучшению биотехнологических свойств закваски и показателей качества хлеба. В связи с вышесказанным задачей данного этапа исследований являлась разработка нового микробного консорциума для густых ржаных заквасок на основе штаммов МКБ с высокими биотехнологическими свойствами. Для решения поставленной задачи из зрелых заквасок хорошего качества выделены активные штаммы молочнокислых бактерий, исследованы их биотехнологические свойства.

3.4.1 Выделение изолятов молочнокислых бактерий из зрелых густых ржанных заквасок

Для разработки нового микробного консорциума были выделены шесть изолятов МКБ (№1-№6) из зрелых густых ржанных заквасок (раздел 3.3.1) с применением методов классической микробиологии (Таблица 20).

Таблица 20 - Морфология клеток и колоний выделенных изолятов лактобацилл

Номер изолята	Морфология клеток (2-х суточные культуры)	Культуральные свойства			
		Характер роста на SFM агаре при поверхностном посеве (в анаэробных условиях)	Характер роста на SFM бульоне		
№1	тонкие палочки 0,3-0,4x1,5-3,5 мкм, некоторые слегка изогнутые, одиночные, парами и в коротких цепочках	колонии округлой формы 5-8 мм в диаметре, серовато-белые, блестящие, непрозрачные, слегка выпуклые, с гладкой поверхностью и ровным краем	обильное равномерное помутнение среды, плотный осадок белого цвета		
№2	толстые палочки от коротких до средней длины 0,4-0,7x1,4-5,0 мкм, одиночные, парами и в коротких цепочках				
№3	палочки от коротких до средней длины 0,3-0,5x2,4-4,8 мкм, некоторые слегка изогнутые, одиночные, парами и в коротких цепочках				
№4	короткие толстые палочки 0,4-0,6x1,3-3,7 мкм, одиночные, парами и в коротких цепочках по 3-5 клеток				
№5	толстые палочки с грануляцией размером 0,6-0,8x1,1-5,8 мкм, парами и в коротких цепочках			колонии белого цвета, диаметром 2-3 мм, блестящие, слегка	пристеночный рост, плотный обильный осадок белого цвета
№6	толстые палочки с грануляцией размером 0,8-0,9x1,0-3,5 мкм, одиночные, парами и в коротких цепочках			выпуклые, непрозрачные, с гладкой поверхностью и ровным краем	

В результате изучения фенотипических признаков выделенных изолятов установлено, что клетки имели форму палочек, расположенных одиночно, парами или в цепочках, являлись грамположительными, каталазоотрицательными,

неподвижными и не образовывали спор. По перечисленным признакам выделенные изоляты являлись представителями рода *Lactobacillus*.

3.4.2 Исследование биотехнологических свойств выделенных изолятов молочнокислых бактерий

Исследованы биотехнологические свойства выделенных изолятов лактобацилл. Результаты скрининга биотехнологических свойств выделенных культур представлены в таблице 21.

Одним из основных биотехнологических свойств МКБ, которое служит критерием отбора штаммов для применения в приготовлении заквасок, является кислотообразующая активность. В результате изучения биотехнологических свойств мучных болтушек, ферментируемых молочнокислыми бактериями, установлено, что все изоляты лактобацилл имели высокую кислотообразующую активность. Титруемая кислотность через 24 ч брожения варьировала от 22,2 до 25,1 град (Таблица 21). Через 24 ч брожения наблюдалось активное развитие внесенных культур МКБ в водно-мучной питательной среде. При брожении образцы заквасок имели разную консистенцию. Так, закваски, приготовленные с применением изолятов №1, №2, №3 и №4, значительно увеличились в объеме.

Значимой характеристикой культур МКБ, позволяющей оценить физиологическую активность штамма, является динамика накопления биомассы. Установлено, что через 24 ч брожения количество клеток МКБ во всех заквасках было достаточно высоким и составляло от 9,0 до 9,5 lg клеток/г (Таблица 21). В препаратах, приготовленных из выброженных заквасок, наблюдались микроорганизмы схожие по морфологическим признакам с внесенными культурами. Посторонняя микробиота (кокки, дикие дрожжи, спорообразующие бактерии) обнаруживалась в низком количестве, что объясняется кислой средой заквасок, подавляющей развитие посторонних нежелательных микроорганизмов, содержащихся в муке. Закваски различались по запаху, наиболее интенсивный

заквасочный запах присутствовал в образцах №1, №2, №3 и №4. Закваски, приготовленные с применением изолятов №5 и №6, имели слабовыраженный запах, обусловленный более низким содержанием уксусной кислоты.

Таблица 21 - Биотехнологические свойства ржаных заквасок, выведенных с применением изолятов лактобацилл

Наименование показателей	Значения показателей свойств ржаных заквасок, выведенных с применением изолятов лактобацилл					
	№1	№2	№3	№4	№5	№6
Титруемая кислотность, град	25,1±0,3	24,1±0,2	22,2±0,4	24,2±0,2	22,8±0,4	23,1±0,2
pH, ед. прибора	3,55±0,04	3,64±0,06	3,79±0,12	3,59±0,07	3,57±0,10	3,59±0,04
Увеличение объема, % к начальному объему	111±5	100±5	100±5	89±6	11±5	22±6
Содержание органических кислот, г/100 г						
-молочной	1,36±0,05	1,22±0,04	1,27±0,05	1,16±0,05	1,36±0,06	1,42±0,04
-уксусной	0,23±0,02	0,19±0,02	0,19±0,03	0,23±0,02	0,06±0,02	0,04±0,03
Содержание клеток МКБ по методу Бургвица, lg клеток/г	9,51±0,05	9,02±0,06	9,42±0,04	9,43±0,04	9,32±0,05	9,30±0,04

В результате проведенного скрининга биотехнологических свойств изолятов МКБ, выделенных из густых ржаных заквасок, были выбраны культуры №1, №3, №4.

3.4.3 Разработка микробного консорциума на основе штамма *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 и исследование его влияния на биотехнологические свойства густой ржаной закваски

Для разработки нового микробного консорциума исследовали влияние отобранных изолятов лактобацилл (№1, №3, №4) на биотехнологические свойства густой ржаной закваски. В густых ржаных заквасках ведущую роль играют дрожжи вида *K. humilis*, которые специфичны для указанного вида заквасок. Дрожжи вида *K. humilis* отличаются кислотоустойчивостью, хорошо развиваются в водно-

мучной питательной среде при кислотности 14 - 16 град и рН 3,0 - 3,5 [4]. Для разработки нового микробного консорциума был выбран штамм дрожжей *K. humilis Y128* (ранее *C. milleri Чернореченский*), который в настоящее время применяется на отечественных хлебопекарных предприятиях для приготовления густых ржаных заквасок. Исследовали влияние выделенных изолятов лактобацилл совместно с культурой дрожжей *K. humilis Y128* на биотехнологические свойства густой ржаной закваски. Режим приготовления заквасок приведен в разделе 2.3.7. Результаты исследований представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Биотехнологические свойства густых ржаных заквасок, выведенных с применением изолятов лактобацилл и культуры дрожжей *K. humilis Y128*, в конце I фазы разводочного цикла

Наименование показателей	Значения показателей свойств ржаных заквасок, выведенных с применением изолятов лактобацилл		
	№1	№3	№4
	и культуры дрожжей <i>K. humilis Y128</i>		
Титруемая кислотность, град	15,5±0,3	13,4±0,4	13,8±0,3
Подъемная сила, мин	25±1	18±1	20±1
Увеличение объема, % к начальному объему	67±5	67±5	47±6
Содержание органических кислот, г/100 г			
-молочной	0,72±0,05	0,53±0,04	0,62±0,05
-уксусной	0,26±0,02	0,21±0,03	0,19±0,03
Содержание микроорганизмов по методу Бургвица, lg клеток/г			
-дрожжи	7,77±0,07	7,84±0,08	7,90±0,10
-МКБ	9,67±0,03	9,00±0,02	9,39±0,07
Соотношение дрожжи:МКБ	1:80	1:14	1:31

Показано, что применение изолята №1 привело к повышению титруемой кислотности закваски на 12-16 %. Установлено, что соотношение дрожжи:МКБ, определяемое методом Бургвица, в закваске, выведенной с применением изолята №1, в конце I фазы разводочного цикла составляло 1:80 и соответствовало рекомендуемому значению для густой ржаной закваски производственного цикла

1:60-1:80 [4]. При применении изолятов №3 и №4 соотношение дрожжи: МКБ было смещено в сторону дрожжевого брожения, что способствовало появлению в заквасках спиртового запаха. Закваска на изоляте №1 имела выраженный заквасочный запах с фруктовыми нотами.

На основе проведенного скрининга был отобран изолят №1, обладающий наилучшими биотехнологическими свойствами. Проведена идентификация с помощью анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК на базе ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» в ФГБНУ ВНИИСХМ. Изолят №1 был идентифицирован как *Fructilactobacillus sanfranciscensis*. Результаты секвенирования фрагментов гена 16S рРНК представлены в приложении Г.

Выделенный штамм был внесен в коллекцию культур микроорганизмов «Молочнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности» СПбФ ФГАНУ НИИХП под номером *Fructilactobacillus sanfranciscensis B131*. Паспорт штамма представлен в приложении Д. Штамм депонирован в Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства ФГБНУ ВНИИСХМ под номером РСАМ 06919. Справка о депонировании представлена в приложении Е.

На следующем этапе исследований определяли влияние разработанного микробного консорциума на основе штаммов *Fructilactobacillus sanfranciscensis B131* и *K. humilis Y128* на биотехнологические свойства густой ржаной закваски (опытной), поддерживаемой в условиях лаборатории СПбФ ФГАНУ НИИХП в течение одного месяца. Для выведения контрольной закваски применяли чистые культуры МКБ *Lactiplantibacillus plantarum B4* (ранее *L. brevis* 78), *Lacticaseibacillus paracasei/casei B3* (ранее *L. brevis* 5), *Lacticaseibacillus paracasei/casei B31* (ранее *L. plantarum* 63) и дрожжи *K. humilis Y128* (ранее *C. milleri* Чернореченский), которые в настоящее время используют для выведения заквасок по разводочному циклу. Режим приготовления густых ржаных заквасок в разводочном цикле приведен в разделе 2.3.7.

В результате проведенных исследований установлено, что на протяжении разводочного цикла в опытной закваске процесс кислотонакопления проходил наиболее интенсивно (Рисунок 21), поэтому закваску освежали чаще, т.е. продолжительность брожения закваски сокращали. Применение гетероферментативного штамма *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 привело к увеличению содержания летучих кислот в закваске в 3,7-4,4 раза. Показатель подъемной силы «по шарик» в опытной закваске в разводочном цикле был несколько хуже и варьировал от 30 до 40 мин, в то время как в контрольной составлял от 19 до 28 мин. Содержание спирта в опытной закваске было ниже по сравнению с контрольной пробой в 1,4-1,9 раза. Перечисленные изменения биотехнологических свойств были обусловлены более высоким содержанием МКБ (9,3-9,7 lg КОЕ/г) и низким содержанием дрожжей (6,3-6,7 lg КОЕ/г) в опытной закваске по сравнению с контролем (содержание МКБ – 9,0-9,1 lg КОЕ/г, дрожжей – 7,1-7,8 lg КОЕ/г). Органолептическая оценка показала, что контрольная закваска в конце I фазы разводочного цикла имела спиртовой запах, в то время как опытная закваска отличалась выраженным заквасочным запахом. Соотношение дрожжи: МКБ, определяемое методом Бургвица, в опытной закваске в конце I фазы разводочного цикла составляло 1:80 и соответствовало рекомендуемому значению для густой ржаной закваски производственного цикла 1:60-1:80 [4]. Полученные данные показывают возможность сокращения разводочного цикла и применения опытной закваски уже в конце I фазы разводочного цикла.

Биотехнологические свойства заквасок производственного цикла представлены в таблице 23. Физико-химические и микробиологические показатели свойств контрольной и опытной заквасок в начале производственного цикла (2-е освежение) также различались. Так, в опытной закваске титруемая кислотность и содержание летучих кислот были выше, в то время как показатель подъемной силы и содержания спирта были понижены, что в итоге обуславливало появление выраженного традиционного заквасочного запаха без признаков спиртового. Таким образом, показано, что применение нового микробного консорциума на основе

штамма *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 положительно влияет на биотехнологические свойства густой ржаной закваски. К 27-32-му и 40-44-му освежениям производственного цикла контрольная и опытные закваски были сопоставимы по физико-химическим и микробиологическим показателям (Таблица 23).

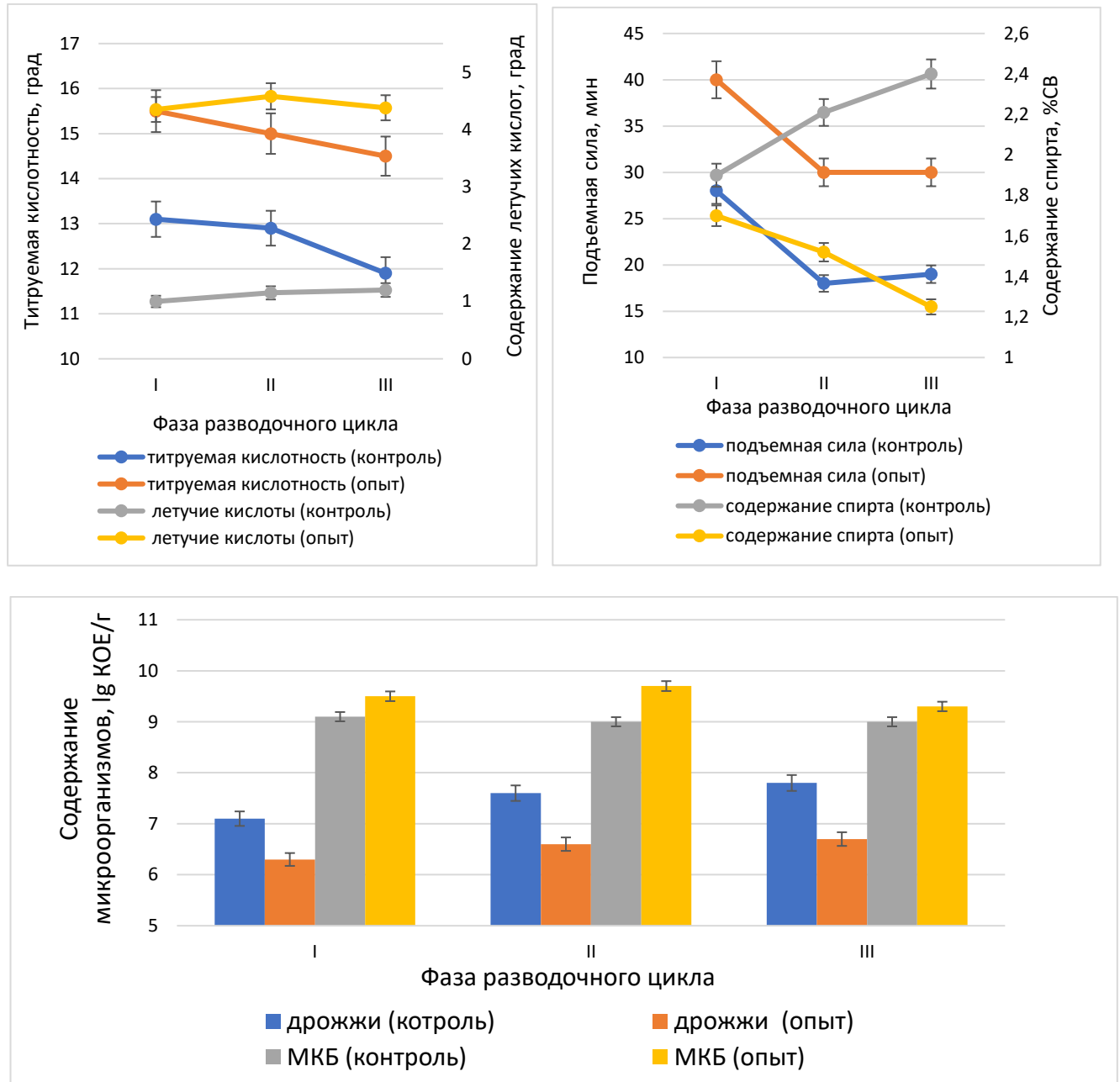


Рисунок 21 - Влияние нового микробного консорциума на биотехнологические свойства густой ржаной закваски в разводочном цикле: а) титруемую кислотность и содержание летучих кислот, б) подъемную силу и содержание спирта, в) содержание МКБ и дрожжей

Таблица 23 - Биотехнологические свойства густых ржанных заквасок в производственном цикле

Наименование показателей	Значения показателей биотехнологических свойств заквасок							
	контрольной				опытной			
Номер освежения	2	14	27	40	2	19	32	44
Титруемая кислотность, град	12,1± 0,3	12,7± 0,2	13,0± 0,4	12,9± 0,2	13,4± 0,3	13,2± 0,4	13,5± 0,2	13,6± 0,3
Подъемная сила, мин	12±1	20±2	28±2	26±1	30±2	24±2	27±2	24±2
Содержание: - спирта, % на СВ	2,39± 0,20	1,95± 0,09	0,95± 0,07	0,90± 0,04	1,00± 0,08	1,10± 0,08	1,18± 0,06	0,95± 0,09
- летучих кислот, % к титруемой кислотности	8,4± 1,2	25,0± 1,6	32,2± 1,5	30,4± 1,4	35,8± 1,6	34,2± 1,4	32,6± 1,6	34,2± 1,5
- молочной кислоты, г/100 г	0,72± 0,05	0,66± 0,04	0,72± 0,05	0,70± 0,06	0,53± 0,04	0,61± 0,04	0,68± 0,05	0,70± 0,05
- уксусной кислоты, г/100 г	0,05± 0,00	0,18± 0,02	0,24± 0,03	0,22± 0,02	0,26± 0,03	0,23± 0,02	0,25± 0,02	0,25± 0,02
Содержание микроорганизмов, lg КОЕ/г -дрожжи	8,0± 0,2	6,8± 0,2	6,2± 0,1	6,2± 0,2	7,0± 0,2	6,9± 0,1	6,6± 0,1	6,2± 0,2
-молочнокислые бактерии	8,8± 0,1	8,7± 0,1	9,4± 0,1	9,3± 0,2	9,0± 0,1	9,2± 0,1	9,4± 0,1	9,4± 0,2

Исследовано изменение таксономического состава микробиома контрольной и опытных заквасок в процессе ведения с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК. Установлено, что в контрольной закваске I фазы разводочного цикла доминируют лактобациллы *Lactiplantibacillus plantarum* (64,2 %) и *Lacticaseibacillus paracasei/casei* (35,4 %), т.е. стартовые культуры, которые подавляют развитие посторонней микробиоты, содержащейся в муке (Рисунок 22). Анализ таксономического состава показал, что в закваске 14-го освежения производственного цикла только 12,2 % выявленных последовательностей принадлежали виду *Lactiplantibacillus plantarum*, т.е. стартовой культуре. Таким образом, в процессе последовательных освежений закваски происходит снижение представленности стартовых культур с одновременным увеличением доли *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, что оказывает влияние на изменение биотехнологических свойств закваски.

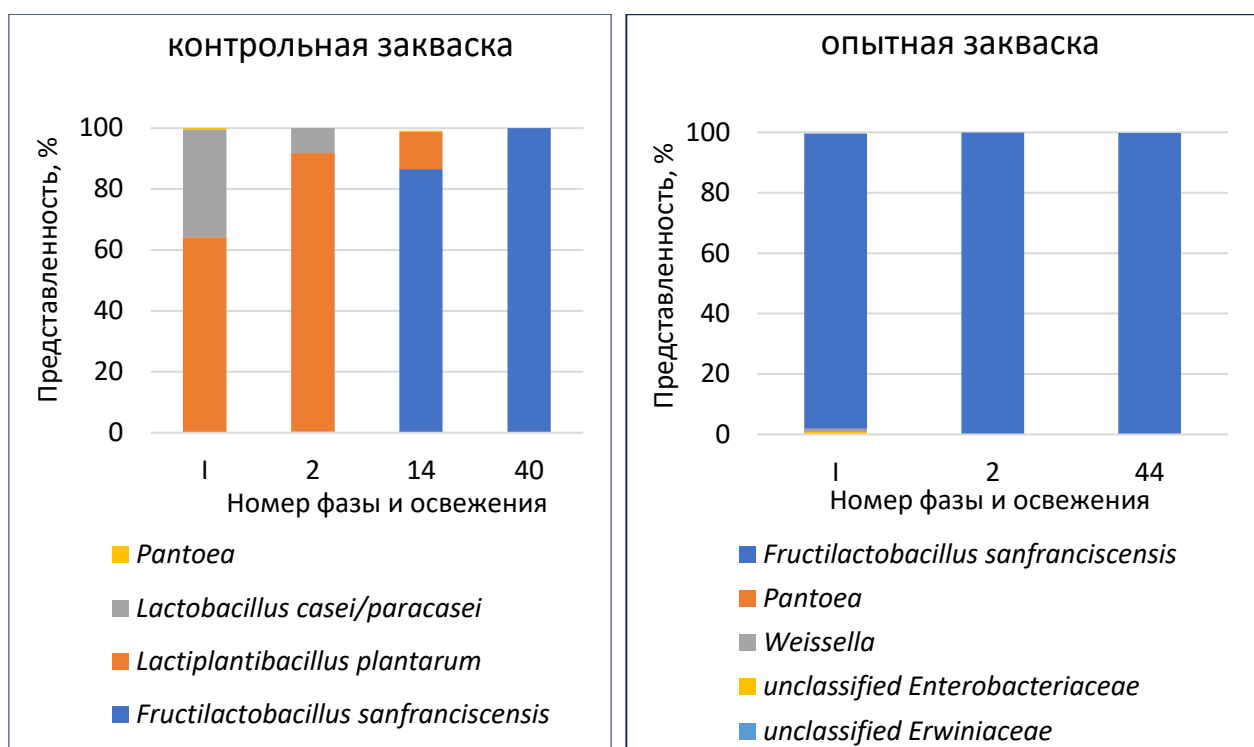


Рисунок 22- Таксономический состав микробиома густых ржаных заквасок (на уровне видов) по данным анализа метагенома 16S рРНК

В результате исследования микробиома опытной закваски показано, что на протяжении всего эксперимента доминировали лактобациллы вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, поэтому биотехнологические свойства закваски не изменялись в процессе ее ведения. В контрольной закваске по мере вытеснения стартовых культур наблюдалось значительное увеличение содержания летучих кислот (в основном уксусной), что оказывало положительное влияние на органолептические свойства закваски.

Таким образом, внесение заквасочных культур в водно-мучную питательную смесь приводит к ингибированию развития бактерий, содержащихся в муке, не позволяя этим микроорганизмам оказывать влияние на процесс брожения и сенсорный профиль закваски. Однако не все стартовые культуры молочнокислых бактерий способны сохраняться в заквасках в процессе последовательных освежений водно-мучной питательной смесью, что в итоге может приводить к значительному изменению биотехнологических свойств закваски.

3.5 Исследование влияния на показатели качества и сроки годности хлебобулочных изделий густой ржаной закваски на основе разработанного микробного консорциума

Задачей данного этапа исследований являлось определение влияния густой ржаной закваски на основе нового микробного консорциума на физико-химические, органолептические показатели качества и сроки годности хлеба ржаного из обдирной муки и ржано-пшеничного заварного. Основными видами микробной порчи хлебобулочных изделий с применением ржаной муки являются плесневение и меловая болезнь [5, 20]. Для исследования влияния густой ржаной закваски на основе нового микробного консорциума на устойчивость хлеба к микробной порче применяли модельные опыты с принудительной контаминацией его ломтиков тест-штаммами плесневых грибов и дрожжей - возбудителей меловой болезни хлеба.

3.5.1 Исследование влияния на органолептические, физико-химические показатели качества ржаного хлеба и его устойчивость к микробной порче густой ржаной закваски на основе нового микробного консорциума

Исследовано влияние контрольной и опытной заквасок производственного цикла на физико-химические свойства теста и показатели качества хлеба ржаного из обдирной муки формового (ГОСТ 2077-2023). Установлено, что образцы теста, приготовленные на заквасках, в которых доминировал вид *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, имели более высокую кислотность, что оказало положительное влияние на значение показателя кислотности хлеба, его вкус и запах (Таблица 24). В тесте, приготовленном на контрольной закваске 2-го освежения производственного цикла, отмечались наименьшая продолжительность расстойки (37 мин) и наилучшая подъемная сила (12 мин), что может быть связано с более высоким содержанием дрожжей в закваске. В образцах теста, приготовленных на контрольной закваске 14-40-го освежений и опытной закваске 2-44-го освежений, отмечается увеличение продолжительности расстойки теста до 50-68 мин и

ухудшение подъемной силы до 17-31 мин, что обусловлено более низким содержанием дрожжевых клеток в заквасках.

Таблица 24 - Влияние густых ржаных заквасок на свойства теста и показатели качества хлеба ржаного из обдирной муки формового

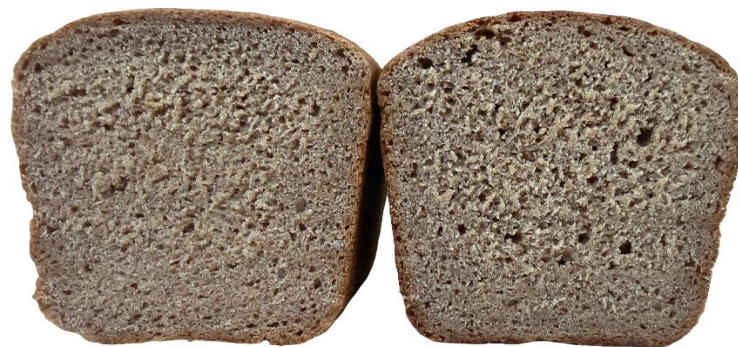
Наименование показателей	Значения показателей свойств теста и качества ржаного хлеба на заквасках							
	контрольной				опытной			
Номер освежения закваски	2	14	27	40	2	19	32	44
Тесто								
Кислотность, град								
-начальная	6,4± 0,2	5,7± 0,3	5,5± 0,2	6,1± 0,3	8,0± 0,2	6,5± 0,2	6,7± 0,2	6,6± 0,3
-конечная	8,2± 0,3	8,0± 0,3	9,2± 0,3	8,9± 0,2	10,0± 0,3	9,2± 0,3	10,2± 0,2	9,4± 0,2
Увеличение объема, %	68± 5	69± 5	54± 5	54± 5	60± 5	50± 5	50± 5	50± 5
Подъемная сила, мин	12± 2	17± 2	29± 1	25± 2	21± 1	31± 2	22± 2	24± 1
Продолжительность брожения, мин	90							
Продолжительность расстойки, мин	37±4	59±4	63±3	63±2	50±4	63±2	68±3	65±4
Хлеб								
Влажность мякиша, %	49,7± 0,3	50,2± 0,4	49,8± 0,3	49,9± 0,5	49,8± 0,3	49,9± 0,3	49,4± 0,3	49,3± 0,4
Кислотность мякиша, град	6,2± 0,2	6,9± 0,2	8,6± 0,2	8,5± 0,2	9,2± 0,3	8,7± 0,2	8,6± 0,2	8,2± 0,2
Пористость, %	57±1	56±1	55±1	55±1	54±1	54±1	53±1	53±1
Удельный объем, см ³ /г	1,58± 0,03	1,49± 0,04	1,47± 0,02	1,42± 0,02	1,52± 0,05	1,49± 0,04	1,49± 0,03	1,40± 0,04
Содержание -спирта, % на СВ	1,62± 0,05	1,20± 0,03	0,69± 0,04	0,50± 0,04	0,63± 0,05	0,72± 0,05	0,65± 0,05	0,53± 0,04
-молочной кислоты, г/100 г	0,65± 0,05	0,62± 0,04	0,59± 0,04	0,64± 0,05	0,65± 0,04	0,58± 0,04	0,60± 0,06	0,64± 0,05
-уксусной кислоты, г/100г	0,05± 0,00	0,15± 0,01	0,22± 0,03	0,24± 0,02	0,22± 0,02	0,25± 0,03	0,22± 0,02	0,26± 0,02
Продолжительность хранения до появления микробной порчи при заражении тест-штаммом <i>P. chrysogenum F601</i> , ч	35±2	74±3	признаки микробной порчи не обнаружены при хранении в течение 7 суток					

В результате проведенных исследований установлено, что все образцы хлеба ржаного из обдирной муки формового соответствовали требованиям ГОСТ

2077-2023 (Таблица 24). Однако органолептические показатели контрольного и опытного хлеба на закваске 2-го освежения имели различия. Так, в опытном образце кислотность и содержание уксусной кислоты были больше в 1,5 и 4,4 раза соответственно, в то время как содержание спирта было ниже в 2,6 раза по сравнению с контролем, что в итоге привело к изменению органолептических показателей готовых изделий. Образец хлеба, приготовленный с использованием контрольной закваски 2-го освежения производственного цикла, имел пресный вкус и спиртовой запах, в то время как хлеб на опытной закваске отличался кислым вкусом и выраженным заквасочным запахом. Диаграмма органолептической оценки образцов хлеба представлена на рисунке 23. Образцы готовых изделий, выработанные на заквасках 27-32-го и 40-44-го освежений производственного цикла, имели сопоставимые показатели качества. Внешний вид образцов хлеба представлен на рисунке 24.



Рисунок 23- Профилограмма органолептической оценки образцов хлеба ржаного из обдирной муки формового (к - контроль, о - опыт)



контроль

опыт

Рисунок 24 – Внешний вид (в разрезе) хлеба ржаного из обдирной муки формового

Установлено, что образцы хлеба, приготовленные на опытных заквасках 2-44-го освежений производственного цикла, не заболели при принудительном заражении ломтиков тест - штаммом плесневых грибов, что объясняется более высокими значениями содержания уксусной кислоты (0,22-0,26 г/100 г) в указанных образцах хлеба (Таблица 24). На ломтиках готовых изделий, приготовленных на контрольных заквасках 2-го и 14-го освежений производственного цикла, рост плесневых грибов наблюдался через 35 и 74 ч соответственно. Более низкая устойчивость хлеба к плесневению обусловлена более низким содержанием уксусной кислоты (0,05 и 0,15 г/100 г соответственно). Таким образом, применение нового микробного консорциума на основе штамма *Fructilactobacillus sanfranciscensis B131* позволяет повысить устойчивость хлеба к плесневению.

3.5.2 Исследование влияния на черствение и срок годности ржаного хлеба густой ржаной закваски на основе нового микробного консорциума

Исследовали влияние густой ржаной закваски, выведенной по разводочному циклу с применением нового микробного консорциума, на черствение и срок годности хлеба ржаного из обдирной муки формового. Изменение свойств мякиша хлебобулочных изделий в процессе хранения является результатом физико-химических, коллоидных и биохимических процессов. Физико-химические изменения, происходящие в хлебе, являются следствием старения высокополимеров - крахмала и белка. Ведущая роль в черствении хлеба принадлежит изменениям крахмала. В процессе хранения хлеба происходит старение крахмального геля. В процессе выпечки хлеба крахмал частично клейстеризуется, поглощая влагу, освобождаемую коагулированными белками, переходит из кристаллического состояния в аморфное. При хранении хлеба наблюдается обратный переход крахмала в кристаллическое состояние. Этот процесс называется ретроградацией крахмала. При этом структура крахмала

уплотняется, уменьшается его растворимость и происходит частичное выделение влаги, поглощенной при клейстеризации [20].

Для исследования влияния густой ржаной закваски на сохранение свежести хлеба ржаного из обдирной муки формового в процессе хранения провели определение скорости его черствения на приборе структурометр «СТ-2». Скорость черствения - среднее изменение показателя твердости мякиша в течение продолжительности хранения после выпечки хлебобулочного изделия. На рисунке 25 приведено изменение показателей твердости (F_h) и индекса твердости (I_h) мякиша для контрольного и опытного хлеба при их хранении после выпечки в течение 7 суток. Установлено, что через 7 суток хранения индекс твердости мякиша хлеба на контрольной закваске увеличился в 1,7 раза, на опытной закваске – в 1,5 раза. Анализ данных показал, что скорость черствения мякиша для контрольной пробы составила 199 (гс/сут), а для опытной – 154 (гс/сут). Полученные результаты демонстрируют сокращение скорости черствения мякиша у опытного образца хлеба, что может быть обусловлено влиянием кислотности на биополимеры муки, в частности с кислотнo-индуцированным усилением перекрестных белковых связей и замедлением ретроградации крахмала [134].

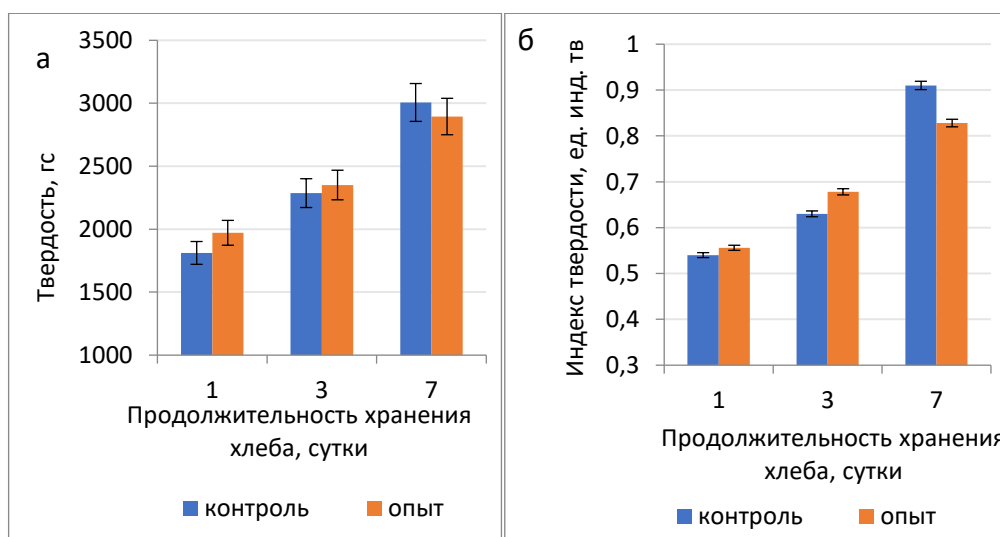


Рисунок 25 - Влияние продолжительности хранения на изменение показателей твердости (а) и индекса твердости (б) мякиша в контрольных и опытных пробах хлеба в течение 7 суток хранения

Исследовано влияние закваски, выведенной с применением нового микробного консорциума, на устойчивость хлеба ржаного из обдирной муки формового к микробной порче. Результаты исследований представлены в таблице 25. Установлено, что закваска на новом микробном консорциуме повышает устойчивость хлеба к плесневению и меловой болезни, вызванной дрожжами видов *C. fabianii*, *W. anomalus*. При заражении ломтиков контрольного и опытного образцов хлеба тест - культурой *P. kudriavzevii* Y502 признаки меловой болезни появились через 24 ч. Быстрый рост колоний *P. kudriavzevii* (ранее *Issatchenkia orientalis*) на ломтиках хлеба может быть связан с их высокой кислотоустойчивостью и способностью развиваться в кислых средах с уровнем pH ниже 2 [101].

Таблица 25 – Влияние микробного состава закваски на устойчивость хлеба к плесневению и меловой болезни

Наименование показателя	Значение показателя для хлеба, приготовленного на закваске	
	контрольной	опытной
Продолжительность хранения до появления признаков микробной порчи при заражении тест-штаммом <i>P. chrysogenum</i> F601, ч	35±3	признаки микробной порчи не обнаружены при хранении в течение 7 суток
Продолжительность хранения до начала развития меловой болезни при заражении тест - штаммом: <i>C. fabianii</i> Y527	40±3	
<i>P. kudriavzevii</i> Y502	24±2	24±2
<i>W. anomalus</i> Y506	28±2	36±2

На рисунке 26 представлены ломтики контрольного образца хлеба с признаками микробной порчи.

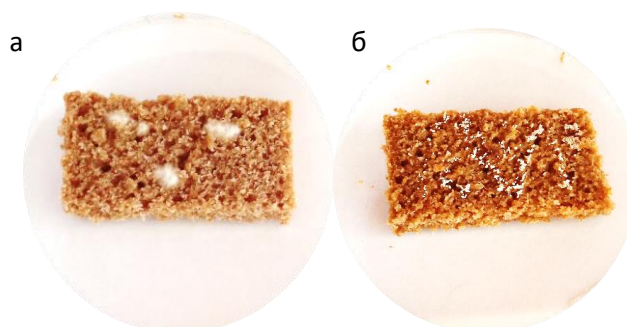


Рисунок 26 - Рост колоний *P. chrysogenum* (а) и *W. anomalus* (б) на ломтиках контрольного образца хлеба при принудительном заражении

Таким образом, показано, что применение густой ржаной закваски на новом микробном консорциуме позволяет увеличить сроки годности хлеба ржаного из обдирной муки формового за счет замедления черствения и повышения устойчивости к микробной порче.

3.5.3 Исследование влияния на органолептические, физико-химические показатели заварных хлебобулочных изделий и их устойчивость к микробной порче густой ржаной закваски на основе нового микробного консорциума

Исследовано влияние контрольной и опытной заквасок производственного цикла на физико-химические свойства теста и показатели качества хлеба ржано-пшеничного заварного формового. Установлено, что образцы теста, приготовленные на опытных заквасках, в которых доминировал вид *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, имели более высокую начальную и конечную кислотность. Показатель подъемной силы и продолжительность расстойки для контрольных образцов были несколько меньше, чем для опытного образца, что связано с более высокой кислотностью опытного теста (Таблица 26).

Исследование физико-химических показателей качества хлеба показало (Таблица 26), что все образцы имели сопоставимые показатели удельного объема и пористости. Опытные образцы имели более высокую кислотность, при этом содержание летучих кислот было близким к рекомендуемому для данного вида хлеба и составляло 34,1-34,5%. В контрольных образцах отмечалось более низкое содержание летучих кислот (в основном уксусной) и более высокое содержание спирта, что в совокупности привело к появлению негармоничного запаха с выраженными спиртовыми нотами. В опытных образцах содержалось меньше спирта, что в сумме с более высоким содержанием летучих кислот (в основном уксусной) оказало положительное влияние на формирование вкуса и запаха опытных образцов хлеба – они имели более гармоничный характерный кисло-сладкий вкус без резких оттенков и традиционный запах заварного хлеба.

Таблица 26 - Влияние контрольной и опытной ржаной густой закваски на свойства полуфабрикатов и качество хлеба заварного формового

Наименование полуфабрикатов и показателей процесса	Значения показателей свойств теста и качества хлеба заварного формового на закваске			
	контрольной		опытной	
Номер освежения закваски	2	14	2	19
Тесто				
Кислотность, град				
- начальная	5,7±0,2	5,9±0,3	7,2±0,2	7,3±0,3
- конечная	7,2±0,3	7,8±0,2	10,6±0,3	10,8±0,3
Увеличение объема к начальному, %	60±5	60±5	57±5	57±5
Подъемная сила, мин	12±2	16±2	29±1	31±2
Продолжительность, мин:	90			
- брожения				
- расстойки	66±3	72±2	80±3	84±2
Хлеб				
Влажность мякиша, %	49,1±0,3	49,0±0,4	49,1±0,3	49,1±0,4
Кислотность мякиша, град	6,8±0,2	7,0±0,2	8,2±0,3	8,4±0,3
Пористость, %	61±1	60±1	59±1	59±1
Удельный объем, см ³ /г	1,65±0,04	1,64±0,05	1,62±0,05	1,61±0,04
Содержание				
-спирта, % на СВ	1,11±0,03	1,00±0,04	0,60±0,03	0,56±0,03
-летучих кислот, % к титруемой кислотности	14,7±1,4	24,2±1,2	34,1±1,6	34,5±1,3
-молочной кислоты, г/100 г	0,46±0,04	0,45±0,05	0,42±0,04	0,45±0,04
-уксусной кислоты, г/100 г	0,04±0,00	0,10±0,01	0,16±0,01	0,18±0,02
Продолжительность хранения до появления признаков микробной порчи при заражении тест-штаммом <i>P. chrysogenum F601</i> , ч	24±2	40±3	Признаки микробной порчи не обнаружены при хранении в течение 7 сут	

На рисунке 27 представлена профилограмма органолептической оценки образцов хлеба заварного.

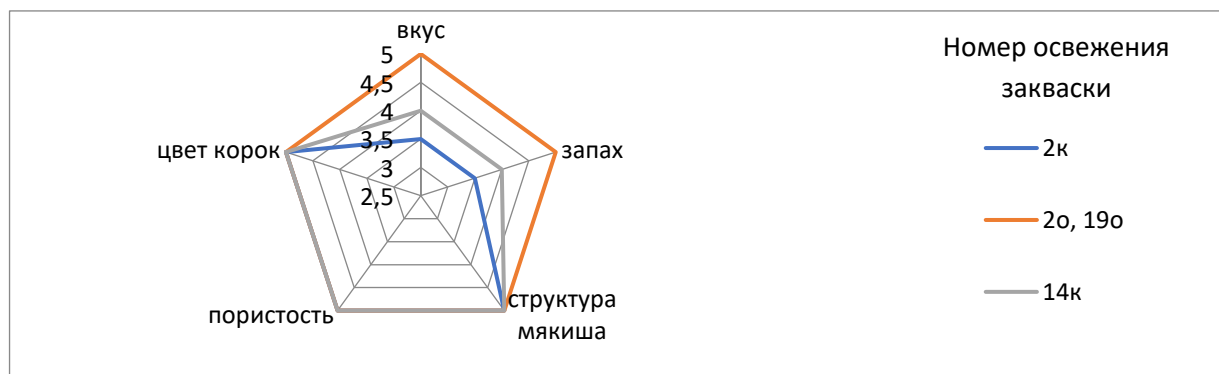
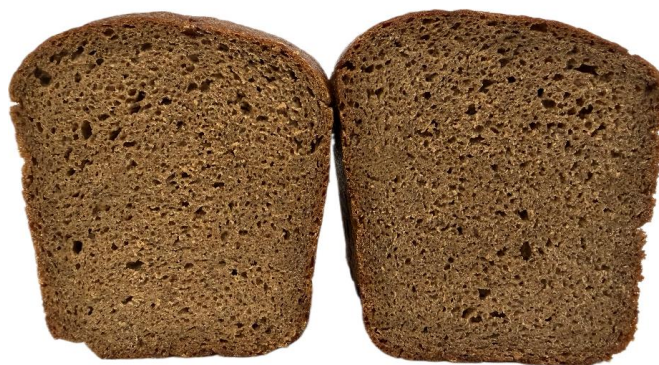


Рисунок 27- Профилограмма органолептической оценки образцов хлеба заварного (к - контроль, о - опыт)

На рисунке 28 представлен внешний вид хлеба ржано-пшеничного заварного.



контроль

опыт

Рисунок 28 – Внешний вид (в разрезе) хлеба ржано-пшеничного заварного

Установлено, что образцы хлеба, приготовленные на опытных заквасках 2-го и 19-го освежений производственного цикла, не заболели при принудительном заражении тест - штаммом плесневых грибов. Это может быть связано с ингибирующим влиянием более высокого содержания уксусной кислоты (0,16 и 0,18 г/100 г) в указанных образцах хлеба (Таблица 26). На ломтиках готовых изделий, приготовленных на контрольных заквасках 2-го и 14-го освежений производственного цикла, рост плесневых грибов наблюдался через 24 и 40 ч соответственно.

3.5.4 Исследование влияния на черствение и срок годности заварных хлебобулочных изделий густой ржаной закваски на основе нового микробного консорциума

Для исследования влияния густой ржаной закваски на сохранение свежести хлеба ржано-пшеничного заварного провели определение скорости его черствения на приборе структурометр «СТ-2». На рисунке 29 приведено изменение показателей твердости (F_h) и индекса твердости (I_h) мякиша для контрольного и опытного хлеба при их хранении после выпечки в течение 7 суток. Установлено, что через 7 суток хранения индекс твердости мякиша хлеба на контрольной закваске увеличился в 1,9 раза, на опытной закваске – в 1,8 раза. Анализ данных

показал, что скорость черствения мякиша для контрольной пробы составила 255 (гс/сут), а для опытной – 288 (гс/сут). Полученные результаты демонстрируют, что опытная закваска не позволила сократить скорость черствения мякиша у опытного образца хлеба.

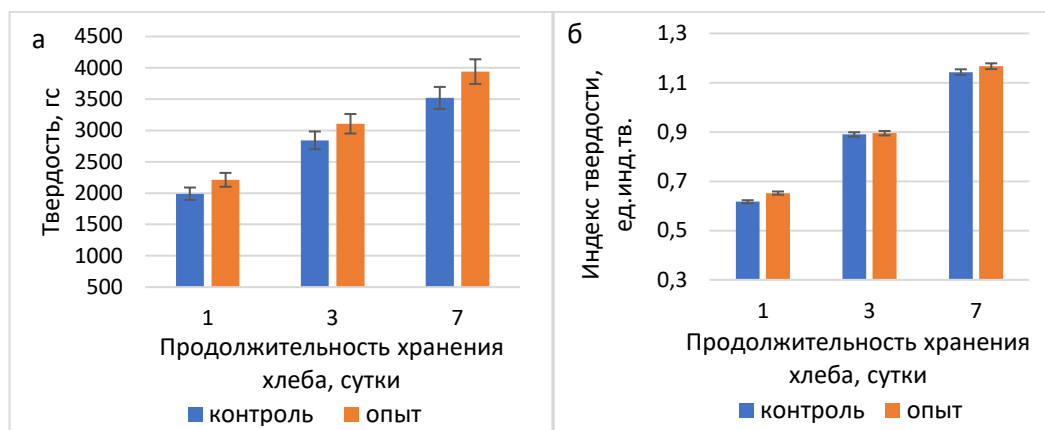


Рисунок 29 - Влияние продолжительности хранения на изменение показателей твердости (а) и индекса твердости (б) мякиша в контрольных и опытных пробах хлеба в течение 7 суток хранения

Исследовано влияние закваски, выведенной с применением нового микробного консорциума, на устойчивость хлеба заварного к микробной порче. Результаты исследований представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Влияние микробного состава закваски на устойчивость хлеба заварного к плесневению и меловой болезни

Наименование показателя	Значение показателя для хлеба, приготовленного на закваске	
	контрольной	опытной
Продолжительность хранения до появления признаков микробной порчи при заражении плесневыми грибами <i>P. chrysogenum F601</i> , ч	24±2	признаки микробной порчи не обнаружены при хранении в течение 7 суток
Продолжительность хранения до начала развития меловой болезни при заражении тест - штаммом: <i>C. fabianii Y527</i>	60±3	
<i>P. kudriavzevii Y502</i>	24±3	26±3
<i>W. anomalus Y506</i>	24±2	35±3

Установлено, что закваска на новом микробном консорциуме повышает устойчивость заварных хлебобулочных изделий к плесневению и меловой болезни,

вызванной дрожжами видов *C. fabianii* и *W. anomalus*. При заражении ломтиков контрольного и опытного образцов хлеба тест - культурой *P. kudriavzevii* Y502 признаки меловой болезни появились через 24-26 ч, что было сопоставимым с результатами, полученными для хлеба ржаного из обдирной муки.

Таким образом, показано, что применение закваски на новом микробном консорциуме позволяет увеличить сроки годности заварных хлебобулочных изделий за счет повышения устойчивости к микробной порче.

3.6 Совершенствование технологии хлебобулочных изделий с применением нового микробного консорциума, расчет экономического эффекта от его внедрения и проведение опытно-промышленной апробации

На данном этапе исследований необходимо разработать технологические решения применения микробного консорциума для приготовления и ведения закваски в разводочном и производственных циклах и выработки хлебобулочных изделий. На основании обобщения результатов исследований установлено, что стабилизация биотехнологических свойств и микробиома ржаной густой закваски на новом микробном консорциуме происходит уже после I фазы разводочного цикла, поэтому предложено исключить II и III фазы и переводить закваску сразу в производственный цикл. Таким образом, в результате проведенных исследований разработана технологическая схема приготовления и ведения густой ржаной закваски «Деревенская» на новом микробном консорциуме (Рисунок 30).

Установлено, что новый микробный консорциум позволяет не только получить закваску с улучшенными биотехнологическими свойствами, но и сократить процесс ее выведения по разводочному циклу по сравнению с традиционной ржаной густой закваской, приготовляемой с использованием трех штаммов молочнокислых бактерий (Рисунок 31).

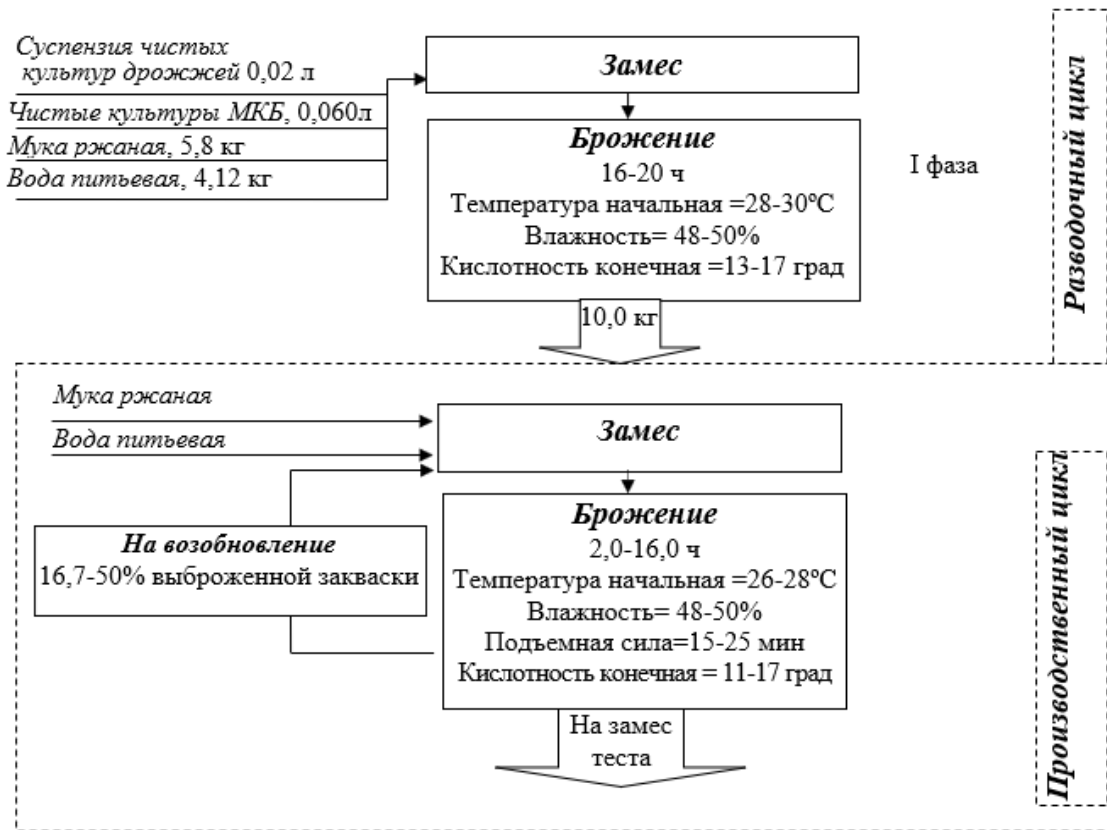


Рисунок 30 – Технологическая схема приготовления и ведения ржаной закваски «Деревенская» на новом микробном консорциуме

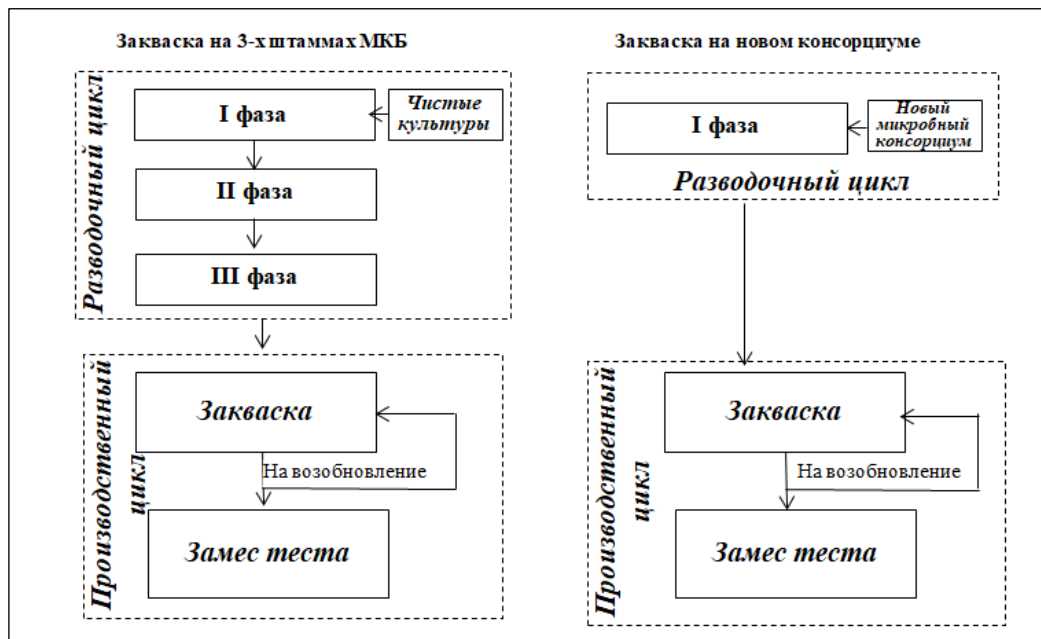


Рисунок 31 – Сравнение технологических схем приготовления и ведения традиционной ржаной густой закваски на 3-х штаммах молочнокислых бактерий и закваски на новом микробном консорциуме

Технологическая схема производства хлеба из ржаной обдирной муки на закваске «Деревенская» представлена на рисунке 32.

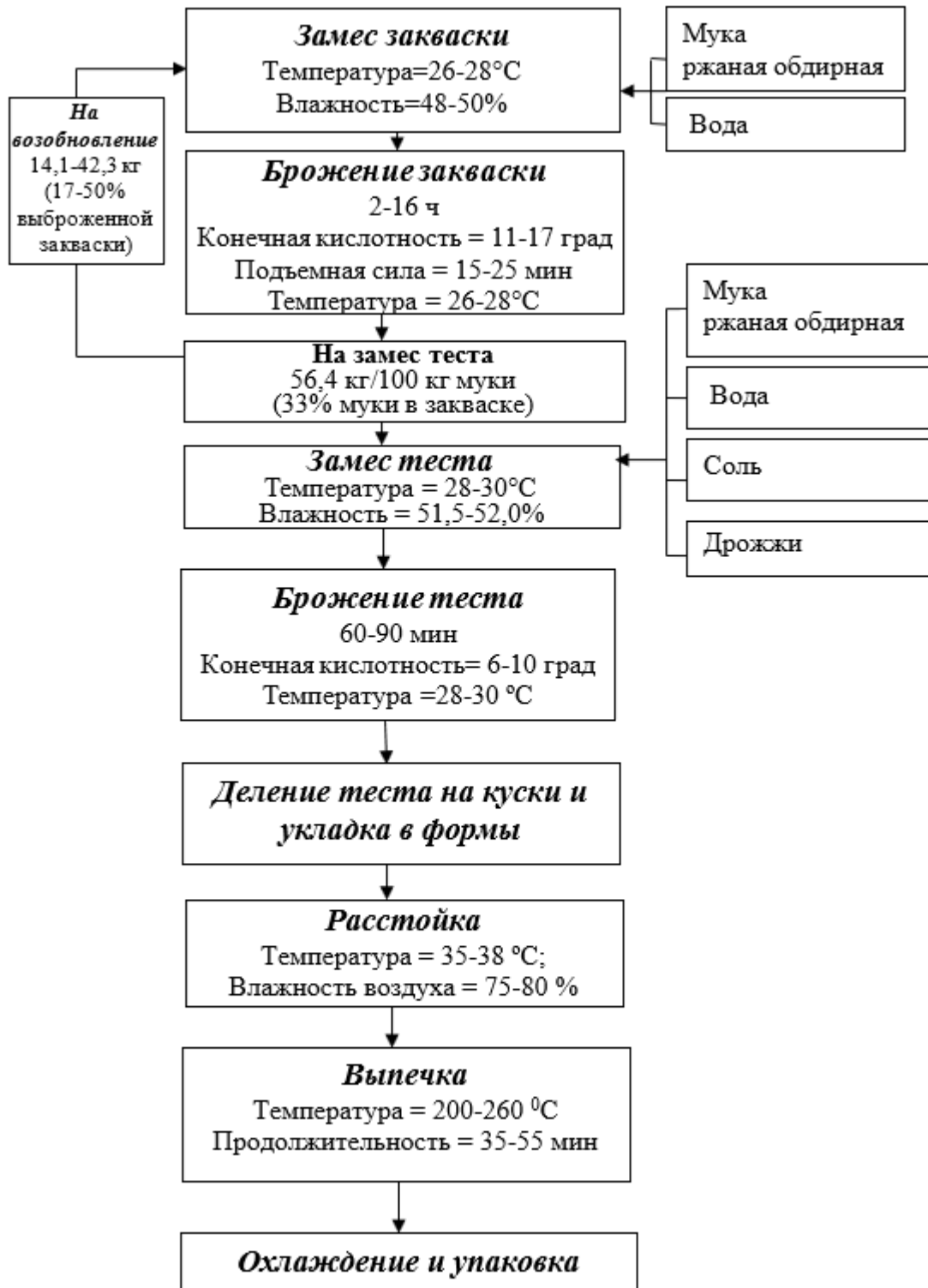


Рисунок 32 - Технологическая схема производства хлеба из ржаной обдирной муки на закваске «Деревенская»

Разработана технологическая инструкция по производству микробного консорциума на основе штаммов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 и *K. humilis* Y128 (Приложение И).

Разработана технологическая инструкция по приготовлению ржаной закваски «Деревенская» с использованием микробного консорциума на основе штаммов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 и *K. humilis* Y128 (Приложение И).

Проведена опытно-промышленная апробация выработки хлеба на густой ржаной закваске «Деревенская», выведенной с применением нового микробного консорциума на основе молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* B131 и дрожжей *K. humilis* Y128, на предприятиях ООО «Опытный хлебозавод» (г. Москва), ООО «Здоровый хлеб» (г. Санкт-Петербург). Акты опытно-промышленной апробации представлены в приложении К.

Проведенные исследования показали высокие технологические и потребительские свойства стартового микробного консорциума по сравнению с имеющимися на рынке отечественными и зарубежными аналогами, в частности, сокращение разводочного цикла, улучшение вкуса, запаха и срока годности готовых хлебобулочных изделий, что обеспечивает его привлекательность для хлебопекарных предприятий.

Для расчета экономической эффективности были использованы Методические рекомендации по оценке эффективности инвестиционных проектов (вторая редакция, исправленная и дополненная).

Далее приведен расчет расходов на 1 ед. микробного консорциума (комплект чистых культур, состоящий из пяти пробирок МКБ и дрожжей).

Микробные консорциумы производятся партиями, включающими пробирки с чистыми культурами молочнокислых бактерий (150 пробирок за одну партию) и пробирки с чистыми культурами дрожжей (100 пробирок за одну партию):

Стоимость израсходованных основных и вспомогательных материалов рассчитывается исходя из их фактического расхода и цен (Таблица 28).

Таблица 28 - Расчет затрат на сырье и материалы

Наименование	Единицы измерения	Цена, руб./ед.	Количество израсходованного материала	Сумма, руб.
Стеклянные пробирки ПБ 2-21x200	шт	21,0	250	5250,0
Пробки ватно-марлевые	шт	23,0	250	5750,0
Пробирка лабораторная, п/п, стерильная, 20 мл	шт	25,7	150	3855,0
Солод ячменный пивоваренный	кг	127,8	3	383,4
Бактериологический агар	кг	10395,0	0,02	207,9
Итого:				15446,3

В составе энергетических затрат определяются затраты на электроэнергию и воду, израсходованные при производстве микробных консорциумов на технологические нужды. Затраты на электроэнергию определяются исходя из мощности оборудования, продолжительности его работы и цены 1 кВт·ч (Таблица 29).

Таблица 29 - Затраты на электроэнергию

Наименование оборудования	Паспортная мощность, кВт	Продолжительность работы, ч	Затраты, руб
Термостат воздушный ТС-1/80	0,3	72	240,6
Термостат воздушный ТС-1/80	0,3	72	240,6
Стерилизатор паровой ВК-75	8	4	356,5
Плита электрическая	1,5	6	100,3
Ламинарный бокс микробиологической безопасности	0,18	3	6,02
Итого			944,0
Примечание: цена за 1 кВт·ч электроэнергии составляет 11,14 руб			

Таблица 30 - Расчет затрат на воду

Наименование	Единицы измерения	Количество	Цена, руб.	Сумма, руб.
Вода водопроводная холодная	м ³	0,121	134,55	16,28
Итого				16,28

Основная заработная плата включает зарплату и отчисления на социальное страхование микробиолога, принимающего непосредственное участие в производстве микробных консорциумов.

Заработная плата микробиолога: 60 000 руб./мес., рабочих дней в месяц - 4.

Таким образом, заработная плата равна: $ЗП = (60000/21) \cdot 4 = 11428,6$ руб.

Общая смета затрат на производство микробного консорциума приведена в таблице 31.

Таблица 31– Смета затрат на производство микробного консорциума

№ п/п	Статьи затрат	Итого затрат, руб.
1.	Стоимость сырья и материалов (на 250 пробирок)	15446,3
2.	Энергетические затраты	960,3
3.	Основная и дополнительная зарплата	11428,6
4.	Отчисления на социальное страхование (34%)	3885,7
5.	Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования (15%)	1714,3
6.	Расходы на поддержание коллекции культур микроорганизмов	2895,4
7.	Производственная себестоимость	36330,6
8.	Накладные расходы (75%, амортизация, логистика, управление)	27248,0
9.	Полная себестоимость производства чистых культур МКБ и дрожжей (250 пробирок)	63578,6
10.	Себестоимость микробного консорциума (1 ед.), включающего 5 пробирок	1271,6

Реализация проекта не предусматривала капитальных вложений на здания и оборудование, так как выпуск микробного консорциума осуществляется на действующих мощностях.

Предполагается, что для выведения закваски заново по разводочному циклу приобретение продукта будет осуществляться ежемесячно.

Таким образом, одному производителю в год необходимо приобретать 12 ед. микробных консорциумов (комплектов чистых культур). При наличии примерно

500 потребителей, что составляет примерно 10% от общего их количества, объем годового производства составит 6000 ед. микробных консорциумов.

Затраты на производство 6000 ед. микробных консорциумов составят $1271,6 \cdot 6000 = 7629600,0$ руб.

При определении стоимости был проведен анализ рынка и установлено, что конкурентная цена с учетом потребительского качества за 6000 ед. импортных стартеров (стоимость 1 стартера 5000,0 руб.) составит 30000000,0 руб. в год.

Таким образом, прибыль составит $30000000 - 7629600 = 22370400,0$ руб. (22,4 млн. руб/год). С учетом действующей ставки налога (25%) чистая прибыль составит 16777,8 тыс. руб в год (16,8 млн. руб/год).

Вместе с тем реализация проекта предполагает социальную эффективность (экстерналии), которая возникает вследствие продления срока годности хлебобулочного изделия при сохранении его качественных характеристик, что не только повышает его привлекательность для торговых организаций, но и обеспечивает существенную экономию продовольственного сырья за счет снижения количества продукции с истекшим сроком годности в торговле и у конечного потребителя.

Кроме того, использование в маркетинге продукции с использованием натуральной закваски, снижающей продовольственные потери без роста цены, повысит привлекательность продукта у потребителей, проявляющих заботу об экологии, которые по данным ВЦИОМ составляют до 30% всех потребителей.

Результаты исследований использованы при формировании основополагающих терминов при создании отраслевого документа ГОСТ 32677-2025 «Хлебопекарное производство. Термины и определения»:

Чистая культура микроорганизмов для хлебопекарного производства: Культура непатогенных и нетоксикогенных бактерий и дрожжей, состоящая из одного штамма микроорганизмов и содержащая жизнеспособные клетки в количестве не менее 10^7 КОЕ/г, предназначенная для выведения заквасок.

Закваска (для хлебопекарного производства): Полуфабрикат хлебопекарного производства, полученный сбраживанием питательной смеси чистыми культурами молочнокислых бактерий или молочнокислых бактерий и дрожжей, или других микроорганизмов, применяемых в хлебопекарном производстве.

Результаты исследований, научные рекомендации и выводы применяются при реализации курсов повышения квалификации для научных сотрудников и специалистов хлебопекарной отрасли в НТЦ «Академия хлебопечения НИИХП» (Приложение Л).

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в образцах ржаной муки доминируют представители филогенетических групп *Proteobacteria* (29,6-85,9 % от метагенома) и *Firmicutes* (1,2-64,8 %), далее следуют *Actinobacteriota* (до 1,2-12,4 %) и *Bacteroidota* (до 4,3 %). В филуме *Proteobacteria* на уровне семейств доминируют *Erwiniaceae* (16,3–65,7 %) и *Pseudomonadaceae* (5,3–15,8 %). Филум *Firmicutes* преимущественно сформирован МКБ семейства *Lactobacillaceae*, доля которых значительно варьирует в разных образцах муки (0,4-64,8 %).

2. С применением метода высокопроизводительного секвенирования показано, что внесение стартовых культур лактобацилл ингибирует развитие гнилостной микробиоты муки. Установлено, что изменение таксономического состава микробиома на уровне *Lactobacillaceae* в густой ржаной закваске с направленным культивированием микроорганизмов приводит к значительному увеличению содержания летучих кислот в закваске (в 3,0-5,3 раза) и хлебе (в 4,0-6,1 раза), улучшению вкуса и запаха хлеба и подавлению развития плесневых грибов в течение всего периода хранения (7 суток).

3. Установлено, что таксономический состав микробиома молодых заквасок спонтанного брожения определяется таксонами, обнаруженными в используемой муке: доминируют представители филумов *Proteobacteria* (семейства *Enterobacteriaceae* и *Erwiniaceae*) и *Firmicutes* (МКБ родов *Companilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Fructilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*). В процессе ведения заквасок происходит значительное снижение доли *Proteobacteria* с одновременным увеличением доли *Firmicutes*. В зрелых густых заквасках доминируют лактобациллы видов *Fructilactobacillus sanfranciscensis* и *Companilactobacillus paralimentarius*, в жидких заквасках без заварки - *Limosilactobacillus pontis* и *Fructilactobacillus sanfranciscensis*. Показано, что состав микробных сообществ ржаной муки не оказывает влияния на микробиом

заквасок спонтанного брожения, превалирующую роль в его формировании играют влажность заквасок и температура их ведения. Установлено, что молодые закваски спонтанного брожения имеют выраженный неприятный гнилостный запах, обусловленный развитием не заквасочных микроорганизмов (*Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*).

4. Выделены шесть автохтонных штаммов лактобацилл из густых ржаных заквасок, выбран и охарактеризован штамм *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131, на его основе разработан микробный консорциум, обеспечивающий высокие биотехнологические свойства закваски: повышение в разводочном цикле титруемой кислотности в 1,2 раза, содержания летучих кислот в 3,7- 4,4 раза, молочнокислых бактерий – в 2,0 - 4,8 раза.

5. Установлено увеличение содержания уксусной кислоты в хлебе ржаном из обдирной муки (в 4,4-5,2 раза), ржано-пшеничном заварном (в 4,0-4,5 раза), улучшение их вкуса и запаха, а также подавление развития плесневых грибов в течение 7 суток, что обусловлено использованием закваски на новом микробном консорциуме.

6. Разработаны технологические решения по улучшению качества хлебобулочных изделий (ТИ по производству нового микробного консорциума и его применению для приготовления густой ржаной закваски «Деревенская»), рассчитан экономический эффект, проведена опытно-промышленная апробация выработки хлеба на густой ржаной закваске «Деревенская».

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Брожение полуфабриката (хлебопекарного производства): процесс, в течение которого происходит изменение пищевых веществ опары, закваски, жидких дрожжей, заварки, теста и накопление диоксида углерода, вкусовых, ароматообразующих веществ под действием компонентов брожения и другого сырья.

Ведение закваски: технологический процесс, предусматривающий регулярное освежение закваски водно-мучной питательной смесью с последующим выбраживанием до готовности. После брожения часть закваски применяется на замес теста, а часть расходуется для последующего освежения.

Выпечка: стадия технологического процесса, заключающаяся в прогреве тестовой заготовки, в результате которого происходит превращение тестовой заготовки в хлебобулочное изделие.

Заварка (для хлебопекарного производства): полуфабрикат хлебопекарного производства, приготовленный из муки и/или продуктов переработки зерна и воды и/или заменяющих ее жидкостей, или из муки и/или продуктов переработки зерна, воды и/или заменяющих ее жидкостей и дополнительного сырья для хлебобулочного изделия и доведенный до стадии клейстеризации крахмала.

Закваска (для хлебопекарного производства): полуфабрикат хлебопекарного производства, полученный сбраживанием питательной смеси чистыми культурами молочнокислых бактерий или молочнокислых бактерий и дрожжей, или других микроорганизмов, применяемых в хлебопекарном производстве.

Закваска спонтанного брожения: полуфабрикат хлебопекарного производства, полученный за счет самопроизвольного брожения водно-мучной питательной смеси под действием микроорганизмов, присутствующих в сырье, воздушной среде, на поверхностях оборудования, инвентаря или рук пекаря (без добавления чистых культур микроорганизмов).

Зрелая закваска спонтанного брожения: закваска спонтанного брожения, в которой стабилизировались физико-химические и микробиологические показатели. Закваски спонтанного брожения становятся зрелыми через 7-10 суток ведения.

Молодая закваска спонтанного брожения: закваска спонтанного брожения, содержащая постороннюю бактериальную и грибную микробиоту, характеризующаяся неудовлетворительными биотехнологическими свойствами (1-7-е сутки ведения).

Осахаренная заварка (для хлебопекарного производства): заварка, осахаренная под воздействием амилолитических ферментов муки и солода или ферментных препаратов.

Освежение закваски: внесение в закваску питательной смеси.

Производственный цикл приготовления закваски: приготовление закваски путем периодического освежения закваски питательной смесью взамен израсходованного их количества и доведение до количества, необходимого производству.

Разводочный цикл приготовления закваски: выведение закваски путем внесения и последовательного размножения чистых культур микроорганизмов в питательной смеси. Разводочный цикл обычно состоит из I-III фаз, после чего закваска передается в производственный цикл.

Расстойка (тестовой заготовки): операция разделки теста, заключающаяся в выдерживании тестовой заготовки при определенных температуре и относительной влажности воздуха.

Тесто: полуфабрикат хлебопекарного производства, полученный путем замеса основного сырья или основного и дополнительного сырья, с использованием или без использования компонента брожения.

Чистая культура микроорганизмов для хлебопекарного производства: культура непатогенных и нетоксикогенных бактерий и дрожжей, состоящая из

одного штамма микроорганизмов и содержащая жизнеспособные клетки в количестве не менее 10^7 КОЕ/г, предназначенная для выведения заквасок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьева О.В. Исследование микроорганизмов ржанных заквасок и их идентификация методом люминесцирующих антител: автореф. дис.... канд. биол. наук: 096/О.В. Афанасьева.-Ленинград, 1969.-24 с.
2. Афанасьева О.В. 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, 2009. – 98 с.
3. Афанасьева, О. В. Микробиологический контроль хлебопекарного производства / О.В. Афанасьева. - Москва: Пищевая пром-сть, 1976. - 143 с
4. Афанасьева, О.В. Микробиология хлебопекарного производства/ О.В. Афанасьева. – СПб.: Береста, 2003. – 220 с.
5. Блекберн К. де В. Микробиологическая порча пищевых продуктов: пер. с англ / К. де В. Блекберн. - СПб.: Профессия, 2008.-784 с.
6. Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы: учеб.-метод. комплекс для студентов биол. фак. спец. Г - 31 01 01 «Биология» / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин. – Мн.: БГУ, 2006 – 116 с.
7. Зверева, Л. Ф. Технология и технохимический контроль хлебопекарного производства / Л. Ф. Зверева, З. С. Немцова, Н. П. Волкова. - 3-е изд.-М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983.- 416 с.
8. Кириллов С.В. Ржаной хлеб. Азбука пекаря / С.В. Кириллов – М.: АСТ, 2021. – 192 с.
9. Контроль качества сырья, полуфабрикатов и хлебобулочных изделий: учебное пособие для вузов / С. Я. Корячкина, Н. В. Лабутина, Н. А. Березина, Е. В. Хмелева. - М.: ДеЛи плюс, 2012.- 496 с.
10. Концевая, И. И. Микробиология: метаболизм бактерий. Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов / И. И. Концевая; М-во образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Чернигов: Десна Полиграф, 2017. – 52 с.

11. Красникова, Л. В. Общая и пищевая микробиология: Учеб. пособие. Часть I / Л. В. Красникова, П. И. Гунькова. – СПб.: Университет ИТМО, 2016. - 134 с.
12. Кузнецова, Л. И. Стартовые композиции микроорганизмов для хлебных заквасок // Л. И. Кузнецова, О. И. Парахина, О. А. Савкина [и др.] // Хлебопекарный и кондитерский форум. - 2021. - №49. - С. 54–57.
13. Кузнецова, Л. И. О плесневении хлеба / Л. И. Кузнецова, О. А. Савкина, Л. В. Усова [и др.] // Хлебопечение России. - 2014. - №5. - С.24-26.
14. Литусов, Н.В. Методы исследования в медицинской бактериологии: учебное пособие / Н. В. Литусов. – Екатеринбург: УГМУ. - 2021. – 232 с.
15. Мишустин, Е. Н. Микробиология зерна и муки / Е. Н. Мишустин, Л. А.Трисвятский. - М.: Хлебоиздат, 1960. - 406 с.
16. Муштоватова, Л. С. Практикум по частной микробиологии: учебное пособие / Л. С. Муштоватова [и др.]; ред. М. Р. Карпова. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2020. – 200 с.
17. Нетрусов, А. И. Микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. - 3-е изд., испр. - М.: Издательский центр «Академия», 2009. - 352 с.
18. Пащенко, Л. П. Технология хлебопекарного производства: Учебник / Л.П.Пащенко, И. М. Жаркова. — СПб.: Издательство «Лань», 2014. — 672 с.
19. Петрова, М.Н. Современные стартовые заквасочные композиции для хлебопечения / М.Н. Петрова, О.А. Савкина, М.Н. Локачук [и др.] //Хлебопродукты. - 2023.- №5.- С.50-54.
20. Пучкова, Л. И. Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий. Часть I. Технология хлеба / Л. И. Пучкова, Р.Д. Поландова, И.В. Матвеева. - 2-е изд., испр. - СПб.: ГИОРД, 2005. - 559 с.
21. Ройтер, И. М. Современная технология теста на хлебозаводах/ И.М. Ройтер.-М.: «Техніка», 1971. -360 с.

22. Романов, А. С. Современные технологии приготовления теста на хлебопекарных предприятиях: учебное пособие / А. С. Романов, Л. И. Кузнецова, О. А. Савкина, Г. В. Терновской; Е. С. Иванова - Кемерово: КемГУ, 2015. - 270 с.
23. Савкина, О. А. Стартовые композиции для приготовления разных видов заквасок / О. А. Савкина, Л. И. Кузнецова, Е. Н. Павловская [и др.] // Хлебопечение России. – 2021.-№6.- С.41-44.
24. Сборник современных технологий хлебобулочных изделий / под общ. ред. А.П. Косована. - М.: Московская типография №2, 2008.-268 с.
25. Сулейманова, А. Д. Идентификация фитат-гидролизующих ризобактерий рода *Rhizobium* на основе фенотипических признаков и мультилокусного анализа / А. Д. Сулейманова, Д. Л. Иткина, Д. С. Пудова, М. Р. Шарипова // Микробиология. – 2021.- Т. 90.- № 1.- С.100-109
26. Фенотаксономия и геносистематика лактобацилл / Под ред. д.б.н. проф. Г.И. Григорьевой. - Н. Новгород: Изд. Ю. А. Николаев, 2009.- 248 с.
27. Хиштова, Н. С. Учебное пособие к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии (общая часть) / Н. С. Хиштова. - Майкоп: ОАО «Полиграфиздат» «Адыгея», 2008.- 108 с.
28. Четверикова, О. П. Сырье и ингредиенты хлебопекарного и кондитерского производства. Справочник / О. П. Четверикова. - СПб.: ИД «Профессия», 2018.- 668 с.
29. Чижова, К. Н. Технохимический контроль хлебопекарного производства / К. Н. Чижова, Т. И. Шкваркина, Н. В. Запенина и др.– М.: Пищевая промышленность, 1975. – 479 с.
30. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. - URL:https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf. (дата обращения:18.05.2026)

31. Alkay, Z. Exploring the Nutritional Impact of Sourdough Fermentation: Its Mechanisms and Functional Potential / Z. Alkay, F. Falah, H. Cankurt, E. Dertli // *Foods*. -2024.-№ 13(11).
32. Altschul, S.F. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller [et al.] // *J Mol Biol.* – 1990. – V. 215(3). – P. 403-410.
33. Alvarez-Sieiro, P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family / P. Alvarez-Sieiro, M. Montalbán-López, D. Mu, O.P. Kuipers // *Appl Microbiol Biotechnol.* - 2016.- Vol.100.- № 7. - P. 2939–2951.
34. Arora, K. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review / K. Arora, H. Ameer, A. Polo [et al.] // *Trends Food Sci Technol.*– 2021. – Vol. 108. – P.71-83.
35. Baev, V. 16S-rRNA-based metagenomic profiling of the bacterial communities in traditional Bulgarian sourdoughs / V. Baev, E. Apostolova, V. Gotcheva [et al.] // *Microorganisms.* – 2023. – Vol. 11. – № 3.
36. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes.* Springer; Auflage: 2nd ed. 2009. - 1450 p.
37. Bessmeltseva, M. Evolution of bacterial consortia in spontaneously started rye sourdoughs during two months of daily propagation / M. Bessmeltseva, E. Viiard, J. Simm [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 4.
38. Boiocchi, F. Insect frass in stored cereal products as a potential source of *Lactobacillus sanfranciscensis* for sourdough ecosystem / F. Boiocchi, D. Porcellato, L. Limonta [et al.] // *Journal of Applied Microbiology.* - 2017. – Vol.123. – № 4. – P.944-955.
39. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics.* -2014. - №30(15). - P. 2114–2120.
40. Boreczek, J. Bacterial community dynamics in spontaneous sourdoughs made from wheat, spelt, and rye wholemeal flour / J. Boreczek, D. Litwinek, J. Żylińska-Urban [et al.] // *Microbiology Open.* – 2020. – Vol. 9. – № 4.

41. Callahan, B. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data / B. Callahan, P. McMurdie, M. Rosen [et al.] // *Nature Methods*. – 2016. – V. 13(7). – P. 581–583.
42. Calvert, M. D. A review of sourdough starters: Ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research / M. D. Calvert, A. A. Madden, L. M. Nichols [et al.] // *PeerJ*. – 2021. – Vol. 9.
43. Canesin, M. R. Nutritional Quality and Nutrient Bioaccessibility in Sourdough Bread / M. R. Canesin, C. B. B. Cazarin // *Curr. Opin. Food Sci.* -2021.-Vol.40.-P. 81–86.
44. Caporaso, J. G. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data / J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh [et al.] // *Nat Methods*. - 2010.-№7 (5). - P.335–336.
45. Caporaso, J.G. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample / J. G. Caporaso, C. L. Lauber, W.A. Walters [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – Vol. 108, Suppl 1. – P. 4516-22.
46. Ceresino, E.B. Sourdough microbiota and starter cultures for industry / E. B. Ceresino, G. Juodeikiene, S. M. Schwenninger, J. M. F. da Rocha; Springer International Publishing AG; 2024. - 495 p.
47. Cho, J. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product / J. Cho, D. Lee, C. Yang [et al.] // *FEMS microbiology letters*. – 2006. – Vol. 257. – № 2. – P. 262-267.
48. Comasio, A. Diverse microbial composition of sourdoughs from different origins/ A. Comasio, M. Verce, S. Van Kerrebroeck, L. De Vuyst // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11.
49. Coronas, R. Type I sourdough preservation strategies and the contribution of microbial biological resource centers to biodiversity protection: A narrative review / R. Coronas, A. Bianco, A. M. L. Sanna [et al.] // *Foods*. - 2025.-№ 14(15).

50. Corsetti, A. A taxonomic survey of lactic acid bacteria isolated from wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours / A. Corsetti, L. Settanni, C. C. López [et al.] // *Syst Appl Microbiol.* -2007. - №30 (7). - P.561–571.
51. Corsetti, A. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling / A. Corsetti, M. Gobbetti, B. De Marco [et al.] // *Journal of agricultural and food chemistry.* -2000.- №48 (7). - P. 3044-3051.
52. Corsetti, A. Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. In: *Handbook on Sourdough Biotechnology*, ed. M. Gobbetti and M. G. Gänzle, New York: Springer. - 2012. – P.85-103.
53. Costa, L. F. X. Evolution of the spontaneous sourdoughs microbiota prepared with organic or conventional whole wheat flours from South Brazil / L. F. Costa, C. I. Kothe, T. T. Grassotti [et al.] // *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* – 2022. – Vol. 94., suppl 4.
54. Daniel, H. M. *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem / H. M. Daniel, M. C. Moons, S. Huret [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2011. – Vol. 99. – № 1. – P.63-73.
55. Darbandi, A. Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials / A. Darbandi, A. Asadi, Ari M. Mahdizade [et al.] // *J Clin Lab Anal.* -2022. - Vol.36.-№1.
56. De Angelis, M. Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs / M. De Angelis, R. Di Cagno, G. Gallo [et al.] // *International Journal of Food Microbiology.* - 2007. – Vol. 114. – № 1. – P.69-82.
57. De Angelis, M. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: Purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 / De M. Angelis, G. Gallo, M. R. Corbo // *International Journal of Food Microbiology.* - 2003. – 87 (3). - P.259–270.
58. De Angelis, M. Wholemeal wheat flours drive the microbiome and functional features of wheat sourdoughs / M. De Angelis, F. Minervini, S. Siragusa [et al.] // *International journal of food microbiology.* – 2019. – Vol.302. – P.35-46.

59. De Man, J.C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J.C. de Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // *J. Appl. Bacteriol.* -1960.-№23.-P. 130-135.
60. De Vuyst, L. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota/ L. De Vuyst, G. Vrancken, F. Ravyts [et al.] // *Food microbiology.* – 2009. – Vol.26. –№7. - P. 666-675.
61. De Vuyst, L. Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation/ L. De Vuyst, S. V. Kerrebroeck, F. Leroy // *Advances in applied microbiology.* – 2017. – Vol.100. – P. 49-160.
62. De Vuyst, L. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? / L. De Vuyst, S. V. Kerrebroeck, H. Harth [et al.] // *Food microbiology.* – 2014. – Vol.37. – P. 11-29.
63. De Vuyst, L. Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients / L. De Vuyst, A. Comasio, S. V. Kerrebroeck // *Critical reviews in food science and nutrition.* – 2023. – Vol. 63. – №15. – P. 2447-2479.
64. De Vuyst, L. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions/ L. De Vuyst, P. Neysens // *Trends in Food Science & Technology.* – 2005. – Vol.16. – №1-3. - P.43-56.
65. De Vuyst, L. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities / L. De Vuyst, H. Harth, S. V. Kerrebroeck, F. Leroy // *Int J Food Microbiol.* - 2016. – Vol. 239. – №19. - P.26-34.
66. Dinardo, F. R. Dynamics of Enterobacteriaceae and lactobacilli in model sourdoughs are driven by pH and concentrations of sucrose and ferulic acid [et al.] / F. R. Dinardo, F. Minervini, M. De Angelis // *LWT.* – 2019. – Vol. 114.
67. Ercolini, D. Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation / D. Ercolini, E. Pontonio, F. Filippis [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2013. – Vol. 79. – № 24. – P. 7827-7836.

68. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. - URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. (дата обращения 18.05.2026)
69. Fekri, A. Considering sourdough from a biochemical, organoleptic, and nutritional perspective / A. Fekri, S. Abedinzadeh, M. Torbati [et al.] // *Journal of Food Composition and Analysis*. - 2024.- Vol. 125.
70. Fraberger, V. Functional properties and sustainability improvement of sourdough bread by lactic acid bacteria / V. Fraberger, C. Ammer, K. J. Domig // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – № 12.
71. Gänzle, M. Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality/ M. Gänzle, V. Ripari // *International Journal of Food Microbiology*. – 2016. – Vol.239. – P. 19-25.
72. Gänzle, M. G. Lifestyles of sourdough lactobacilli – Do they matter for microbial ecology and bread quality? / M.G. Gänzle, J. Zheng // *International Journal of Food Microbiology*. – 2019. – Vol. 302. – №2. - P.15-23.
73. Gänzle, M. G. Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation / M. G. Gänzle, M. Ehmman, W. P. Hammes // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1998. – Vol. 64. – № 7. – P. 2616-2623.
74. Ganzle, M.G. Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in an industrial sourdough fermentation / M. G. Gänzle, R. F. Vogel // *International Journal of Food Microbiology*. – 2003. – Vol.80. – № 1. – P.31-45.
75. Gobbetti M, Rizzello C. G, editors. Basic methods and protocols on sourdough. New York: Humana Press; 2024. - 176 p.
76. Gobbetti, M. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria/ M. Gobbetti, M. De Angelis, A. Corsetti, R. Di Cagno // *Trends in Food Science & Technology*. – 2005. – Vol. 16. – № 1-3. – P. 57-69.

77. Gobbetti, M. Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota / M. Gobbetti, F. Minervini, E. Pontonio [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. - 2016.- Vol. 239. -№ 19. - P.3–18.
78. Gobbetti, M. *Handbook on Sourdough Biotechnology* / M. Gobbetti, M. Gänzle; Springer Nature Switzerland AG, 2023.- 397 p.
79. Gobbetti, M. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods / M. Gobbetti, C. G. Rizzello, R. Di Cagno, M. De Angelis // *Food Microbiology*. - 2014. - Vol. 37. –P. 30–40.
80. Gonzalez-Alonso, V. Microbial ecology and metabolite dynamics of backslopped triticale sourdough productions and the impact of scale / V. Gonzalez-Alonso, I. Pradal, Y.R. Wardhana [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2024. – Vol. 408.
81. Graça, C. Sourdough fermentation as a tool to improve the nutritional and health-promoting properties of its derived-products / C. Graça, A. Lima, A. Raymundo, I. Sousa // *Fermentation*. - 2021.-№ 7(4).
82. Groenewald, W. H. Identification of lactic acid bacteria from vinegar flies based on phenotypic and genotypic characteristics/ W. H. Groenewald, C. A. Van Reenen, S. D. Todorov [et al.] // *American journal of enology and viticulture*. – 2006. – Vol. 57. – № 4. – P.519-525.
83. Gunduz C. P. B. Evaluation of the variations in chemical and microbiological properties of the sourdoughs produced with selected lactic acid bacteria strains during fermentation / C. P. B. Gunduz, B. Agirman, R. Gaglio [et al.] // *Food Chemistry: X*. – 2022. – Vol. 14.
84. *Handbook of microbiological media* / Atlas, Ronald M. - 4th ed / Ronald M. Atlas; CRC Press, 2010. - 2040 p.
85. Harth, H. Community dynamics and metabolite target analysis of spontaneous, backslopped barley sourdough fermentations under laboratory and bakery conditions / H. Harth, S. Van Kerrebroeck, L. De Vuyst // *International Journal of Food Microbiology*. – 2016. – Vol. 228. – P.22-32.

86. He, X. Comparative genomics reveals genetic diversity and variation in metabolic traits in *Fructilactobacillus sanfranciscensis* strains / X. He, Y. Yu, R. Kemperman [et al.] // *Microorganisms*. – 2024. – Vol. 12. – № 5.
87. Hernández-Parada, N. Exploiting the native microorganisms from different food matrices to formulate starter cultures for sourdough bread production / N. Hernández-Parada, O. González-Ríos, M. L. Suárez-Quiroz [et al.] // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 11. – №. 1.
88. Islam, M. A. Sourdough bread quality: Facts and Factors / M. A. Islam, S. Islam // *Foods*. – 2024. – Vol. 13. – № 13.
89. Jacques, N. Three novel ascomycetous yeast species of the *Kazachstania* clade, *Kazachstania saulgeensis* sp. nov., *Kazachstania serrabonitensis* sp. nov. and *Kazachstania australis* sp. nov. Reassignment of *Candida humilis* to *Kazachstania humilis* f.a. comb. nov. and *Candida pseudohumilis* to *Kazachstania pseudohumilis* f.a. comb. nov. / N. Jacques, V. Sarilar, C. Urien // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – Vol. 66. – № 12. – P. 5192-5200.
90. Kline, L. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process: II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity/ L. Kline, T. F. Sugihara // *Applied microbiology*. – 1971. – Vol. 21. – № 3. – P.459-465.
91. Korakli, M. Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis* / M. Korakli, A. Rossmann, M. G. Ganzle, R. F. Vogel // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. - Vol. 49(11). -P. 5194–5200.
92. Landis, E.A. The diversity and function of sourdough starter microbiomes / E.A. Landis, A. M. Oliverio, E. A. McKenney [et al.] // *elife*. – 2021. – Vol.10.
93. Lau, S. W. Sourdough microbiome comparison and benefits / S.W. Lau, A. Q. Chong, N. L. Chin [et al.] // *Microorganisms*. - 2021. - №9 (7).
94. Leroy, F. The bacteriocin producer *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is a competitive starter culture for type II sourdough fermentations / F. Leroy, T. De Winter,

M. Remedios [et al.] // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2007. – Vol. 87. – № 9. – P.1726-1736.

95. Lhomme, E. The predominance of *Lactobacillus sanfranciscensis* in French organic sourdoughs and its impact on related bread characteristics / E. Lhomme, S. Orain, P. Courcoux [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2015. – Vol. 213. – P.40-48.

96. Lima, T. T. M. How to deliver sourdough with appropriate characteristics for the bakery industry? The answer may be provided by microbiota / T. T. M. Lima, B. de Oliveira Hosken, J. D. D. Lindner [et al.] // Food Bioscience. - 2023. – Vol. 56.

97. Liu, T. Prevalence and diversity of lactic acid bacteria in Chinese traditional sourdough revealed by culture dependent and pyrosequencing approaches / T. Liu, Y. Li, J. Chen, F. A. Sadiq [et al.] // LWT-Food Science and Technology. – 2016. – Vol. 68. – P. 91-97.

98. Liu, X. Bacterial diversity in traditional sourdough from different regions in China / X. Liu, M. Zhou, C. Jiabin [et al.] // LWT. - 2018. - №96 (2). - P.251–259.

99. Martin-Garcia, A. Influence of process parameters on sourdough microbiota, physical properties and sensory profile / A. Martin-Garcia, M. Riu-Aumatell, E. Lopez-Tamames // Food Reviews International. – 2023. – Vol. 39. – № 1. – P.334-348.

100. Martino, M. E. Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different niches / M. E. Martino, J. R. Bayjanov, B. E. Caffrey // Environmental microbiology. – 2016. – Vol. 18. – № 12. – P. 4974-4989.

101. Matsushika, A. Identification and characterization of a novel *Issatchenkia orientalis* GPI-anchored protein, IoGas1, required for resistance to low pH and salt stress / A. Matsushika, K. Negi, T. Suzuki [et al.] // PLoS ONE. – 2016. – №11(9).

102. McKenney, E. A. Sourdough starters exhibit similar succession patterns but develop flour-specific climax communities / E. A. McKenney, L. M. Nichols, S. Alvarado [et al.] // PeerJ. – 2023. – Vol.11.

103. McMurdie, P. J. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data/ P. J. McMurdie, S. Holmes // PLoS ONE. -2013.-№8 (4).
104. Menezes, L. A. A. Sourdough bacterial dynamics revealed by metagenomic analysis in Brazil / L. A. A. Menezes, M. S. Sardaro, R. T. D. Duarte [et al.] // Food Microbiology. – 2020. – Vol.85.
105. Michel, E. Artisanal and farmers bread-making practices differently shape fungal species community composition in French sourdoughs / E. Michel, E. Masson, S. Bubbendorf [et al.] // BioRxiv. – 2019. – Vol. 3.
106. Minervini, F. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough / F. Minervini, M. De Angelis, R. Di Cagno, M. Gobbetti // International journal of food microbiology. – 2014. – Vol. 171. – P.136-146.
107. Minervini, F. House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs / F. Minervini, A. Lattanzi, M. De Angelis [et al.] // Food Microbiology. – 2015. – Vol. 52. – P.66-76.
108. Minervini, F. Lactic acid bacterium population dynamics in artisan sourdoughs over one year of daily propagations is mainly driven by flour microbiota and nutrients / F. Minervini, F. R. Dinardo, G. Celano [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol.9.
109. Minervini, F. Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I / F. Minervini, M. De Angelis, R. Di Cagno [et al.] // Food Microbiology. – 2010. – Vol.27. – №7. – P.897-908.
110. Montemurro, M. Investigation of the nutritional, functional and technological effects of the sourdough fermentation of sprouted flours / M. Montemurro, E. Pontonio, M. Gobbetti, C. Giuseppe // Int. J. Food Microbiol. – 2019.- Vol.302.- P. 47–58.
111. Oberg, T.S. Invited review: Review of taxonomic changes in dairy-related lactobacilli / T.S. Oberg, D.J. McMahon, M.D. Culumber [et al.] // Journal of Dairy Science. - 2022. - Vol. 105, №. 4. - P. 2750–2770.

112. Oleinikova, Y. Sourdough microbiota for improving bread preservation and safety: Main directions and new strategies / Y. Oleinikova, A. Amangeldi, A. Zhaksylyk [et al.] // *Foods*. - 2025.-№ 14(14).
113. Oshiro, M. Diversity and dynamics of sourdough lactic acid bacteria created by a slow food fermentation system / M. Oshiro, T. Zendo, J. Nakayama // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2021. – Vol. 131. – № 4. – P.333-340.
114. Oshiro, M. Impact of pH on succession of sourdough lactic acid bacteria communities and their fermentation properties / M. Oshiro, M. Tanaka, T. Zendo [et al.] // *Bioscience of microbiota, food and health*. – 2020. – Vol.39. – № 3. – P. 152-159.
115. Pétel, C. Sourdough Volatile Compounds and Their Contribution to Bread: A Review / C. Pétel, B. Onno, C. Prost [et al.] // *Trends Food Sci. Technol.*- 2017.- Vol.59. - P.105–123.
116. Picozzi, C. Comparison of cultural media for the enumeration of sourdough lactic acid bacteria / C. Picozzi, S. Gallina, T. D. Fera, R. Foschino // *Comparison of cultural media for enumeration of sourdough lactic acid bacteria*//*Annals of microbiology*. -2005.-55 (4). - P.317-320.
117. Qiao, N. After the storm — Perspectives on the taxonomy of Lactobacillaceae / N. Qiao, S. Wittouck, P. Mattarelli [et al.] // *JDS Communications*. - 2022. - №3 (3). - P.222-227.
118. Reese, A. T. Influences of ingredients and bakers on the bacteria and fungi in sourdough starters and bread / A. T. Reese, A. A. Madden, M. Joossens // *MSphere*. – 2020. – Vol. 5. – № 1.
119. Reffai, Y. M. A critical review on the role of lactic acid bacteria in sourdough nutritional quality: Mechanisms, potential, and challenges / Y. M. Reffai, T. Fechtali // *Applied Microbiology*. – 2025. – Vol. 5. – № 3.
120. Ribet, L. Nutritional Benefits of Sourdoughs: A Systematic Review / L. Ribet, R. Dessalles, C. Lesens [et al.] // *Adv. Nutr.* -2023.- Vol.14 (1). - P.22–29.
121. Ripari, V. Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. *International Journal of Food Microbiology* / V.

Ripari, M. G. Gänzle, E. Berardi [et al.] // International journal of food microbiology. – 2016. – Vol. 232. – P.35-42.

122. Rogalski, E. Intraspecies diversity and genome-phenotype-associations in *Fructilactobacillus sanfranciscensis* / E. Rogalski, M. A. Ehrmann, R. F. Vogel // Microbiological Research. – 2021. – Vol. 243.

123. Rogalski, E. Monitoring of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains during wheat and rye sourdough fermentations by CRISPR locus length polymorphism PCR/ E. Rogalski, R. F. Vogel, M. A. Ehrmann //International journal of food microbiology. – 2020. – Vol. 316.

124. Rogalski, E. Role of *Kazachstania humilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in the strain-specific assertiveness of *Fructilactobacillus sanfranciscensis* strains in rye sourdough / E. Rogalski, M. A. Ehrmann, R. F. Vogel // Eur Food Res Technol – 2020. – Vol. 246. – № 9. – P.1817-1827.

125. Sadiq, F.A. Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive review / F.A. Sadiq, B. Yan, F. Tian [et al.] // Compr Rev Food Sci Food Saf. -2019. - Vol.18.-№5. - P.1403–1436.

126. Scheirlinck, I. Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments / I. Scheirlinck, R. Van der Meulen, L. De Vuyst [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 106. – № 4. – P.1081-1092.

127. Siepmann, F. B. Overview of Sourdough Technology: From Production to Marketing / F. B. Siepmann, V. Ripari, N. Waszczynskyj, M. R. Spier // Food Bioproc. - 2018. – Vol. 11. – № 2. – P.242-270.

128. Sieuwerts, S. Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation / S. Sieuwerts, P. A. Bron, E. J. Smid // LWT. - 2018.- № 90.- P. 201–206.

129. Siragusa, S. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using

Lactobacillus sanfranciscensis starters / S. Siragusa, R. Di Cagno, D. Ercolini [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2009. – Vol.75. – № 4. – P. 1099-1109.

130. Tolu, V. Dynamics of microbiota in three backslopped liquid sourdoughs that were triggered with the same starter strains / V. Tolu, C. Fraumene, A. Carboni // Fermentation. – 2022. – Vol. 8. – №10.

131. Urien, C. Fungal species diversity in French bread sourdoughs made of organic wheat flour / C. Urien, J. Legrand, P. Montalent [et al.] // Front Microbiol. – 2016. – Vol.10. – P.201.

132. Van der Meulen, R. Population dynamics and metabolite target analysis during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs / R. Van der Meulen, I. Scheirlinck, A. Van Schoor [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. - 2007. - №73(15).

133. Van Kerrebroeck, S. Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis / S. Van Kerrebroeck, D. Maes, L. De Vuyst // Trends in Food Science & Technology. – 2017. – Vol.68. – P. 152-159.

134. Verdonck, C. Impact of acetic acid, lactic acid, and succinic acid on protein secondary structure and water-binding capacity of bread dough in the context of sourdough-type breadmaking / C. Verdonck, Y. De Bondt, I. J. Joye, C. M. Courtin // Food Hydrocolloids. - 2025.- № 165.

135. Vogel, R. F. Genomic analysis reveals Lactobacillus sanfranciscensis as stable element in traditional sourdoughs / R. F. Vogel, M. Pavlovic, M.A Ehrmann [et al.] // Microbial Cell Factories. – 2011. – Vol. 10, Suppl 1.

136. Vogel, R. F. Identification of lactobacilli from sourdough and description of Lactobacillus pontis sp. nov. / R. F. Vogel, G. Bocker, P. Stolz [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1994.-№44 (2). - P. 223-229.

137. von Gastrow, L. Microbial community dispersal in sourdough / L. von Gastrow, R. Amelot, D. Segond [et al.] // bioRxiv. - 2021.

138. Weckx, S. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt

sourdough fermentations / S. Weckx, R. Van der Meulen, D. Maes [et al.] // *Food Microbiol.* - 2010- №27(8). - P.1000-1008.

139. Weisburg, W.G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / W.G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, D. J. Lane // *J Bacteriol.* – 1991. – V. 173(2). – P. 697-703.

140. Wright, E. S. Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R/ E.S. Wright // *The R Journal.* -2016.-№8 (1). - P. 352–359

141. Zhang, G. H. Preparation screening, production optimization and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis* Ls-1001 isolated from Chinese traditional sourdough / G.H. Zhang, W.Z. Zhang, L.J. Sun [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. - Vol. 139. - P.1295–1303.

142. Zhang, G. Prevalence, genetic diversity, and technological functions of the *Lactobacillus sanfranciscensis* in sourdough: A review / G. Zhang, J. Tu, F. A. Sadiq, W. Zhang // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* – 2019. – Vol. 18. – № 4. – P.1209-1226.

143. Zheng, J. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* [et al.] / J. Zheng, S. Wittouck, E. Salvetti // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2020. – Vol. 70. – № 4. – P. 2782-2858.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таксономический состав микробиома муки ржаной обдирной и обойной

Таблица А.1 - Состав бактериальных сообществ ржаной муки (встречаемость таксона, %).

Филум	Порядок	Семейство	Род, вид	Образец ржаной муки						
				обдирной, пробы муки						обойной
				1	2	3	5	6	7	
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>unclassified Lactobacillaceae</i>	-	-	-	1,0	-	2,4	-
			<i>Lactiplantibacillus</i> sp.	1,8	-	-	-	-	-	1,8
			<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	24,2	3,6	-	-	-	3,4	12,2
			<i>Limosilactobacillus pontis</i>	5,6	57,5	0,9	-	-	1,4	5,2
			<i>Levilactobacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	1,1
			<i>Lactobacillus helveticus</i>	-	-	-	-	0,4	-	-
			<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>	-	3,7	0,2	-	-	-	-
			<i>Weissella</i> sp.	2,1	-	0,8	-	-	0,7	-
<i>Paenibacillales</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	-	-	4,0	0,9	0,8	-	-	
			<i>Staphylococcales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	0,5	-
<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Erwiniaceae</i>	<i>Pantoea</i> sp.	37,0	-	42,3	60,8	56,9	65,7	43,9
			<i>unclassified Erwiniaceae</i>	-	16,3	-	0,3	4,4	-	-
		<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>unclassified Enterobacteriaceae</i>	6,6	2,6	1,3	2,8	8,2	1,7	5,8
		<i>Pectobacteriaceae</i>	<i>unclassified Pectobacteriaceae</i>	-	1,7	-	0,8	0,9	1,0	1,2
	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Massilia</i> sp.	1,8	0,6	8,6	7,0	6,8	2,1	4,5
	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	5,3	7,9	15,8	10,4	9,8	4,5	8,1
	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i> sp.	1,0	0,5	3,8	2,7	2,8	0,4	1,7
	<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>unclassified Rhizobiaceae</i>	-	-	1,7	1,1	0,5	-	-
<i>Actinobacteriota</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>unclassified Microbacteriaceae</i>	2,1	-	2,2	5,1	4,7	4,0	0,5
			<i>Curtobacterium</i> sp.	-	1,2	4,0	-	-	-	-
	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Cutibacterium</i> sp.	6,6	-	3,9	-	-	-	4,5
	<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>unclassified Pseudonocardiaceae</i>	-	-	2,3	-	-	-	-
<i>Bacteroidota</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Weeksellaceae</i>	<i>Chryseobacterium</i> sp.	-	-	2,3	1,9	0,5	-	1,3
	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Pedobacter</i> sp.	-	0,3	2,0	-	0,9	-	-

Прочерки (-) в таблице означают, что бактерии присутствовали в количестве ниже предела достоверного определения методом высокопроизводительного секвенирования

L. fermentum 34

TTGTTACGACTTCACCCTAATCATCTGTCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTG
 GGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGA
 TCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAGTCCGAACCTGAGAACGGTTTTAA
 GAGATTTGCTTGCCCTCGCGAGTTCCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAA
 GGGCATGATGATCTGACGTGTCACCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTACTAGAGTGCCCAACT
 AATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACG
 ACGACCATGCACCACCTGTCATTGCGTTCCCGAAGGAAACGCCCTATCTCTAGGGTTG

L. brevis 1

CTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGTGTCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGCC
 GAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACC
 GCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC
 CGGCGTATTAGTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGC
 CACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAA
 AGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTGTTGTTAAAGAAGAACA
 TATCTGAGAGTAACTGTTCAAGGATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGT
 CTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAC
 AGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCT
 GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCG
 TAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCTGAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCT
 GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
 TTAATTCGAAGCTACGCGAAGANCCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCC
 CTTCCGGGGACATGGATAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAAC
 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATG
 GTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGC
 AACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
 TTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCA
 GCCGCCTAAGGTGGACAGATGATAGGGTGAAGTCGTAACAA

L. plantarum 30

CCTAATACATGCAAGTCGAACGCGTCTTGGTTATTGATGTTAGGATGCTTGCATTTAACTGATTTAACATTGA
 GACGAGTGGCGAACTGGTGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTGAAGTAGGGGATAACACTTGGAAACAG
 GTGCTAATACCGTATAACAACCAAAACCACCTGGTTTTGGTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTAGGAT
 GGACCCGCGCGTATTAGCTTGTGGTAAGGTAACGGCCTACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC
 AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTG
 GAGAAGAACAGGTGTGAGAGTAACTGTTACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCG
 GTTTCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACGGAGAAGTGCATCGGAAACCAGGAGACTTGAGTGC
 AGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAG
 GCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
 GTCCATGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCTGAGCTAACGCATTA
 GCACCTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
 GAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGAT
 TAGGCGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCG
 GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
 ACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAACCGCGAGGTCAAGCTAATCTTTAAAGCCGTTCTCAGTTCCGGAT
 TGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACG
 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGGAGGTAACCTT
 CGGGGACCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAA

L. plantarum 63

CTATACATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCA
 TAGATCCAAGAACCAGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTAT
 TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTCTGAGAGGTTGATCGGCCACATT
 GGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGA
 TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTCGTAATAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCA
 GAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC

L. brevis 78

CTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGC
 GAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACC
 GCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGG
 CGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGC
 CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAA
 AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACA
 TATCTGAGAGTAACTGTTCAAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
 GCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGT
 CTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGGAGTGCAGAAGAGGAC
 AGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCT
 GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCG
 TAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCT
 GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
 TTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCC
 CTTCCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAAC
 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAT
 GGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG
 CAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
 CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACC
 AGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAG

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица В.1- Влияние продолжительности ведения густых ржаных заквасок спонтанного брожения на показатели качества хлеба ржаного из обдирной муки формового

Наименование показателей	Значения свойств полуфабрикатов и показателей качества хлеба ржаного формового из обдирной муки, приготовленного с использованием густой ржаной закваски											
	Г1-10	Г1-17	Г1-24	Г1-31	Г2-10	Г2-17	Г2-24	Г2-31	Г3-10	Г3-17	Г3-24	Г3-31
Закваска												
Влажность, %	50,3	50,6	51,1	51,2	49,6	49,4	48,5	49,9	50,3	50,9	50,2	50,4
Титруемая кислотность, град	13,8	13,8	13,5	11,2	12,6	11,3	13,5	12,5	13,7	10,7	14,5	12,7
Подъемная сила, мин	19	21	17	15	21	19	22	10	15	12	13	16
Содержание спирта, % на СВ	1,37	1,65	1,81	2,00	1,37	1,36	1,07	1,79	2,01	2,20	1,82	2,23
Содержание летучих кислот - град	5,95	5,40	4,35	4,35	4,85	4,45	5,75	2,75	4,90	3,65	6,25	3,10
- % к титруемой кислотности	43,1	39,1	32,2	38,8	38,5	39,4	42,6	22,0	35,8	34,1	43,1	32,9
Тесто												
Кислотность, град												
- начальная	8,0	6,8	7,8	7,1	7,1	6,7	7,3	7,3	6,5	6,8	7,3	8,3
- конечная	11,0	11,6	11,0	10,5	12,0	10,0	12,2	9,7	9,5	8,5	11,4	10,6
Изменение объема, %	65	50	50	76	50	70	66	90	85	65	75	78
Подъемная сила, мин	12	12	9	6	11	13	17	9	11	10	13	9
Продолжительность брожения, мин	90											
Продолжительность расстойки, мин	40	31	27	40	44	31	41	40	32	34	43	43
Хлеб												
Влажность мякиша, %	49,0	48,9	49,0	48,8	48,0	49,0	49,0	49,0	49,0	49,0	49,0	48,9
Кислотность мякиша, град	10,0	9,4	8,6	8,0	9,5	6,4	10,4	8,0	8,2	6,2	9,0	8,8
Пористость, %	59	58	51	60	60	59	58	59	61	60	62	64
Удельный объем, см ³ /г	1,30	1,43	1,45	1,53	1,46	1,34	1,46	1,46	1,41	1,54	1,58	1,70
Внешний вид:												
- форма	соответствующая хлебной форме, в которой производилась выпечка											
- поверхность	гладкая, без трещин и подрывов											
- цвет корки	темно-коричневый											
Состояние мякиша:												
- пористость	развитая, без пустот и уплотнений, мелкая, толстостенная											
- промес	без следов непромеса											
- пропеченность	пропеченный, не липкий, не влажный на ощупь											
Вкус	соответствует данному виду изделий, без постороннего привкуса											
Запах	соответствует данному виду изделий, без постороннего запаха											

Таблица В.2 - Влияние продолжительности ведения жидких ржанных заквасок без заварки спонтанного брожения на показатели качества хлеба ржаного из обдирной муки формового

Наименование показателей	Значения свойств полуфабрикатов и показателей качества хлеба ржаного формового из обдирной муки, приготовленного с использованием жидкой ржаной закваски без заварки											
	Ж1-10	Ж1-17	Ж1-24	Ж1-31	Ж2-10	Ж2-17	Ж2-24	Ж2-31	Ж3-10	Ж3-17	Ж3-24	Ж3-31
Закваска												
Влажность, %	73,0	72,1	71,9	72,5	70,0	71,8	71,7	71,4	72,4	71,8	71,0	72,3
Кислотность, град	11,6	12,0	12,2	12,2	12,6	13,2	13,6	13,3	11,8	12,0	11,2	11,7
Подъемная сила, мин	24	27	23	22	29	32	30	22	25	22	21	22
Содержание спирта, % на СВ	3,11	3,05	3,23	3,35	2,09	2,36	2,52	2,09	3,21	3,22	2,89	2,41
Содержание летучих кислот												
- град	4,00	3,65	3,45	4,10	3,75	3,15	3,10	2,98	3,85	3,90	4,15	3,85
- % к титруемой кислотности	34,5	30,4	28,3	33,6	29,8	23,9	22,8	22,4	32,6	32,5	37,1	32,9
Тесто												
Кислотность, град												
- начальная	8,3	8,8	9,2	8,2	8,0	8,5	9,4	8,2	6,8	8,3	8,5	8,3
- конечная	10,0	11,0	11,4	12,0	11,0	11,6	12,2	11,2	10,2	10,9	9,8	10,6
Изменение объема, %	65	50	50	61	35	50	65	80	80	75	80	78
Подъемная сила, мин	14	13	11	10	24	14	10	12	14	16	7	9
Продолжительность брожения, мин	90											
Продолжительность расстойки, мин	44	41	37	36	58	41	42	41	36	39	40	43
Хлеб												
Влажность мякиша, %	49,0	49,0	49,0	49,9	47,4	49,0	48,8	48,5	49,1	48,3	48,8	48,9
Кислотность мякиша, град	9,0	9,6	9,4	9,0	10,3	9,4	9,4	9,8	8,4	9,0	8,8	8,8
Пористость, %	57	56	56	58	58	59	60	59	61	62	60	64
Удельный объем, см ³ /г	1,31	1,39	1,42	1,47	1,42	1,42	1,56	1,49	1,37	1,64	1,54	1,70
Внешний вид:												
- форма	соответствующая хлебной форме, в которой производилась выпечка											
- поверхность	гладкая, без трещин и подрывов											
- цвет корки	темно-коричневый											
Состояние мякиша:												
- пористость	развитая, без пустот и уплотнений, мелкая, толстостенная											
- промес	без следов непромеса											
- пропеченность	пропеченный, не липкий, не влажный на ощупь											
Вкус	соответствует данному виду изделий, без постороннего привкуса											
Запах	соответствует данному виду изделий, без постороннего запаха											

Таблица В.3- Влияние продолжительности ведения заквасок спонтанного брожения на показатели качества хлеба ржаного «Простого»

Наименование показателей	Значения свойств полуфабрикатов и показателей качества хлеба ржаного «Простого» формового, приготовленного с использованием заквасок					
	густой ржаной			жидкой ржаной без заварки		
	Г4-10	Г4-17	Г4-24	Ж4-10	Ж4-17	Ж4-24
Закваска						
Влажность, %	49,4	50,3	49,8	72,7	72,0	72,3
Кислотность, град	14,3	13,5	14,7	11,5	11,8	13,0
Подъемная сила, мин	31	23	23	16	18	26
Содержание спирта, % на СВ	0,91	0,76	0,92	3,71	3,16	2,91
Содержание летучих кислот - град	4,43	5,50	4,75	2,30	5,00	4,00
- % к титруемой кислотности	30,9	40,7	32,3	20,0	42,4	30,8
Тесто						
Кислотность, град - начальная	8,0	8,0	8,2	8,0	8,5	9,0
- конечная	11,6	10,4	12,2	9,8	12,7	11,5
Изменение объема, %	50	50	50	60	75	50
Подъемная сила, мин	16	12	15	7	9	13
Продолжительность брожения, мин	90					
Продолжительность расстойки, мин	40	41	42	26	25	35
Хлеб						
Влажность мякиша, %	49,8	50,5	49,9	50,4	50,4	49,9
Кислотность мякиша, град	9,6	10,2	11,2	7,5	9,5	10,8
Пористость, %	54	58	56	56	56	53
Удельный объем, см ³ /г	1,40	1,38	1,23	1,38	1,29	1,23
Внешний вид:	соответствующая хлебной форме, в которой производилась выпечка					
- форма						
- поверхность						
- цвет корки	темно-коричневый					
Состояние мякиша:	развитая, без пустот и уплотнений, мелкая, толстостенная					
- пористость						
- промес						
- пропеченность	пропеченный, не липкий, не влажный на ощупь					
Вкус	соответствует данному виду изделий, без постороннего привкуса					

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Паспорт штамма *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131



196608, г. Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, д.7, литера А
тел./факс. 8 (812)386-00-01
e-mail: info-spb@gosniihp.ru

КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Санкт-Петербургского филиала
федерального государственного
автономного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
хлебопекарной промышленности»

«Молочнокислые бактерии и дрожжи
для хлебопекарной промышленности»

Входит в перечень коллекций, утвержденных
Постановлением Правительства РФ
от 24.06.96 № 725-47
и Приказом Минсельхозпрод России от
15.08.96 №14с.

ПАСПОРТ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА

1. **Название рода, вида и подвида микроорганизмов:**
Fructilactobacillus sanfranciscensis B131
2. **Номер штамма в коллекции:** B131
3. **Дата поступления в коллекцию:** 2020 г
4. **Способ получения штамма:** без использования методов геной инженерии
5. **Источник выделения штамма:** субстрат, географический пункт, дата выделения:
выделен в 2020 г из густой ржаной закваски длительного ведения в лабораторных условиях
(СПБФ ФГАНУ НИИХП, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин)
6. **Автор (авторы) штамма:** Локачук М.Н.
7. **Методы идентификации штамма, кем идентифицирован (фамилия, имя, отчество)**
ссылка на используемые определители: секвенирование гена 16S рРНК (ЦКП «Геномные
технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ), идентифицирован
согласно определителю Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes. Springer;
Auflage: 2nd ed. 2009. - 1450 p.

Нуклеотидная последовательность 16S рРНК

TCNCCСТААТСАТСТГТССАССТТАGGCGGGCGGACTCСТААААAGGTTATCCAACCGACTTTGGGTGTTA
САААСТСТСАТGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCAACCGTGGCATGCTGATCCA
CGATТАСТАGCGAТТССААСТТСАТGСАGТCGAGTTGСАGACTGСААТССGAАСТGAGAACGACTTTAAG
AGATTAGCTTGACСТCGCGGTTTCGСААСТCGTTGТАТCGCCАТТGTAGCACGТGTGTAGCCСАGGGACAT
AAGGGGСАТGATGATTGACGТСАТСССАССТТССТССGGTTТАТСАСCGGСАGТСТСТТАGAGTGGCC
ААСТТААТGCTGGСААСТААAGАСАAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTТААСССАСАТСТСАСGACACG
AGCTGACGАСААССАТGСАССАССТGТСАТТСТGТСССGAAGGGAACGТСТААТСТСТТАGATTGGCAG
AAGATGТСАAGТССТGGТАAGGTTCTTCGCGTAGCATCGAАТТААСССАТGТССACCCTTGTGCGG
GTСССCGTСААТТССТТТGAGTTСААСТТGCGGTGCTACTСССAGGCGGAATGCTТААТGCGTTAGCT
GCGGСАТGAAAGGCGGAAACСТТССААССТАGСАТТСАТCGTTТАCGGСАТGGACTACCAGGGTATC
ТААТСТGТТТGСТАСССАТGCTTTCGAGCСТСАGCGTСАGTTACAGACСАGATAGCCGCTTCGССACTG
GTGTTCCСТТАТАТАТСАТGСАТТТСАСCGTACACATGAAGTTCCАСТАТСТТТТGСАТСААГТТ
АТСАGТТССGATGCAСТТТССGGTTAAGCCGAAGGCTTТСАТСАGACTТААТААААССGCTGCGCTC
CSTTTACGСССААТАААТССGGАСААСГТТТGССАССТACGТАТТАСCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGC
CGTGACTTCTGGTTAGATACCCTСАТАСCGTGAGCAGTTGCTSTCACGGCTGTTCTSTТААСААСАGА
GTTTTACGAGCCGAAАССТТТСАТСАСCGGCGTGTCTCCATСАGACTTTCGТСАТТGTGGAAGAT
TCCСТАТGCTGCTССCGTAGGAGTATGGGCGGTGTCTСАGТССАТТGTGGCAGATТАСССТСАGГТ
CTGCTACGТАТСАТТGCTTGGTGAGСТАТТАТСТСАССАСТАGСТААТACGCCGCGGGTCCATCCAGAA
GСАСТАGСАСААAGGCCAGCTTТСАААСААGААССАТGTGGTTCTTGTGTTATACGGТАТТАGСАТСТGT
TCCAGGTGTTATCCСТТТCTTGGGСАGГТАСССАСГТТАCTACCAGTTCGССACTСАGТCGGAT
ССАААТСАТСТТАGТGСАAGCАСТААGААТСААТТGGGCGACTTCGNTCGA

8. Причина депонирования (практическая ценность культуры, антагонист, продуцент физиологически активных веществ и т.д.): обладает высокой кислотообразующей активностью

9. Способ хранения штамма и состав среды: на бульоне SFM (SanFrancisco medium в прописи С. Picozzi et.al) методом периодических пересевов (1 раз в месяц), температурный оптимум 30⁰С. Хранение в холодильнике при температуре +4-6⁰С.

10. Культурально-морфологические особенности штамма:

а) колонии на SFM агаре (SanFrancisco medium в прописи С. Picozzi et.al): колонии округлой формы 4-5 мм в диаметре, серовато-белые, блестящие, плоские, с гладкой поверхностью и ровным краем

б) рост на SFM бульоне: сильное равномерное помутнение среды, плотный осадок белого цвета

в) вегетативные клетки: мелкие тонкие палочки 0,3-0,4x1,5-3,5 мкм, некоторые слегка изогнутые, одиночные, парами и в коротких цепочках

11. Применение штамма: рекомендуется использовать для приготовления густых ржаных заквасок по разводочному циклу

12. Сведения о безопасности использования штамма: штамм *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 не является генетически модифицированным штаммом, не относится к микроорганизмам, патогенным для человека, согласно классификации микроорганизмов, приведенной в санитарных правилах СП. 3.3686-21. Работа со штаммом не требует специальных мер предосторожности

Директор СПбФ ФГАНУ НИИХП

Руководитель Коллекции

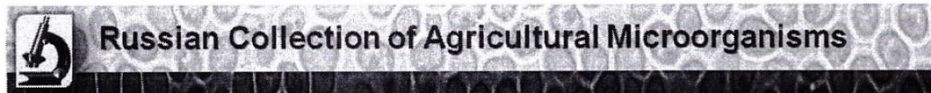


Парахина Ольга Ивановна

Петрова Марина Николаевна

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Справка о депонировании штамма *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131



Russian Collection of Agricultural Microorganisms

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)**

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00

Выдано в СПБФ ФГАНУ НИИХП

Факс 470-43-62

22.06.2024 № 251/06

СПРАВКА

**о депонировании культуры микроорганизмов в Сетевой биоресурсной
коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства
(RCAM)**

1.Депозитор: Санкт-Петербургский филиал федерального государственного автономного научного учреждения «Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности» (СПБФ ФГАНУ НИИХП), 196608, г. Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д.7, литера А.

2.Автор: Локачук М.Н.

3.Штамм *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 является активным кислотообразователем. Рекомендуется использовать для приготовления густых ржаных и пшеничных заквасок. Депонирован как практически-ценный для целей патентной процедуры.

4. Штамм *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B131 депонирован 24 июня 2024 г. под регистрационным номером **RCAM06919**.

5.Адрес коллекции: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812)470-51-00, факс(812)470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru, сайт: <http://www.arriam.ru>

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ, д.б.н.

В.Е.Цыганов

Заведующая RCAM, к.б.н.

В.И.Сафронова



ПРИЛОЖЕНИЕ Ж**Уведомление о положительном результате формальной экспертизы заявки на изобретение**

Федеральная служба по интеллектуальной
собственности
Федеральное государственное бюджетное
учреждение

Форма N 91 ИЗ-2025
910



«Федеральный институт
промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993
Телефон (8-499) 240-60-15, Факс (8-495) 531-63-18

СПБФ ФГАНУ НИИХП, Савкиной О.А.
ш. Подбельского, 7
Пушкин
Санкт-Петербург
196608

На № - от -
Наш № 2025135487/10(081690)
При переписке просим ссылаться на номер заявки
Исходящая корреспонденция от **03.02.2026**

У В Е Д О М Л Е Н И Е

**о положительном результате формальной экспертизы
заявки на изобретение**

(21) Заявка № 2025135487/10(081690)

Дата поступления документов заявки 12.12.2025

(22) Дата подачи заявки 12.12.2025

(71) Заявитель(и) ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ХЛЕБОПЕКАРНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ" (ФГАНУ НИИХП), RU, Общество с ограниченной
ответственностью "ЭЙВА-ПРО", RU, Сергеев Сергей Александрович, RU

(54) Название изобретения Новые стартеры для ржаных заквасок и способ их применения

1	ДПМ 30.01.2026	200201
---	----------------	--------



ПРИЛОЖЕНИЕ И

Технологические инструкции

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ХЛЕБОПЕКАРНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ НИИХП)
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ФИЛИАЛ
(СПБФ ФГАНУ НИИХП)

Утверждаю:
Директор СПБФ ФГАНУ НИИХП
 О.И. Парахина
"08" декабря 2025 г.

**ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ**

по приготовлению ржаной закваски «Деревенская»
с использованием молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* B131 и
дрожжей *K. humilis* Y128

Дата введения: 08.12.2025

Санкт – Петербург
2025 г

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ХЛЕБОПЕКАРНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ НИИХП)
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ФИЛИАЛ
(СПБФ ФГАНУ НИИХП)

УТВЕРЖДАЮ:
Директор СПБФ ФГАНУ НИИХП



Пар О. И. Парахина

08 " *декабрь* 2025 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

по производству микробного консорциума на основе штаммов
F. sanfranciscensis B131 и *K. humilis* Y128 для приготовления густой ржаной
закваски «Деревенская»

Дата введения: *08.12.25*

Санкт-Петербург
2025

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Акты опытно-промышленной апробации хлеба на густой ржаной закваске «Деревенская»

УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель генерального директора
по производству и качеству
ООО «Опытный хлебозавод»



Спахова М.В.
«26» марта 2026 г

АКТ

опытно-промышленной апробации хлеба на густой ржаной закваске
«Деревенская»

Комиссией, в составе заместителя директора по научной работе ФГАНУ НИИХП Мартиросяна В.В., старшего научного сотрудника СПБФ ФГАНУ НИИХП Локачук М.Н., и технолога ООО «Опытный хлебозавод» Павлуши А.А., составлен настоящий Акт о том, что в условиях ООО «Опытный хлебозавод» проведена опытно-промышленная апробация нового штамма молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* при приготовлении ржаной густой закваски «Деревенская».

Апробация включала выведение закваски «Деревенская» влажностью 48%, приготавливаемой в разводочном цикле с использованием нового штамма молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* B131 и чистой культуры дрожжей *K. humilis* Y128, выпечку хлеба ржаного из обдирной муки формового.

Для приготовления закваски «Деревенская» в разводочном цикле использовали 60 см³ культуральной жидкости молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* B131, выращенных на солодовом сусле (12% сухих веществ). Для приготовления суспензии заквасочных дрожжей *K. humilis* Y128 (ранее *S. milleri* Чернореченский) в пробирку с выросшей культурой вносили 10 см³ воды и смывали дрожжевые клетки с помощью стеклянной палочки с поверхности скошенного сусло-агара. В качестве контроля использовали густую ржаную закваску, выведенную на чистых культурах молочнокислых бактерий *Lactiplantibacillus plantarum* B4 (ранее *L. brevis* 78), *Lacticaseibacillus paracasei/casei* B3 (ранее *L. brevis* 5), *Lacticaseibacillus paracasei/casei* B31 (ранее *L. plantarum* 63) и дрожжей *K. humilis* Y128. Культуры молочнокислых бактерий и дрожжей вносили в водно-мучную смесь I фазы разводочного цикла.

Рецептура и режимы приготовления густой ржаной закваски контрольной и «Деревенская» влажностью 48% в I фазе разводочного цикла приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Рецепт и режимы приготовления густой ржаной закваски контрольной и «Деревенская» с использованием чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и значение показателей процесса для ржаной закваски
Культуральная жидкость молочнокислых бактерий, л	0,06
Суспензия чистой культуры дрожжей, л	0,02
Мука ржаная хлебопекарная обдирная*, кг	5,9
Вода питьевая, кг	4,0
Общая масса, кг	10,0
Температура начальная, °С	28 - 30
Продолжительность брожения, ч	16 - 20
*Влажность муки - 12,0%	

В производственном цикле закваску освежали дважды в день: первый раз в соотношении выброженная закваска: питательная смесь из муки и воды - 1:3 и оставляли на брожение в течение 5,0-5,5 ч при температуре 26-28 °С, второй раз закваску освежали в соотношении закваска : питательная смесь 1:5 так, чтобы начальная температура закваски была 20-21 °С, затем оставляли на брожение в течение 12-16 ч при температуре 18-20 °С. Физико-химические и микробиологические показатели свойств ржаной закваски контрольной и «Деревенская» представлены в таблице 2.

Таблица 2- Физико-химические и микробиологические показатели свойств ржаной закваски контрольной и «Деревенская»

Наименование показателей	Значение показателей в разных циклах приготовления закваски							
	контрольной				«Деревенская»			
Фаза разводочного цикла	I	II	III	-	I	II	III	-
Номер освежения производственного цикла	-	-	-	2	-	-	-	2
Влажность расчетная, %	48							
Кислотность конечная, град	12,1	12,2	12,8	12,2	16,5	16,8	15,5	13,6
Подъемная сила, мин	25	22	20	16	40	32	28	25
Содержание микроорганизмов, lg КОЕ/г								
-дрожжи	7,3	7,5	7,2	7,8	6,3	6,2	6,4	6,9
- молочнокислые бактерии	8,9	8,8	9,1	9,0	9,6	9,5	9,2	9,2

Закваска «Деревенская» в процессе ведения имела хорошие биотехнологические показатели (титруемую кислотность и подъемную силу). Запах закваски был выраженным, характерным для традиционных деревенских ржаных заквасок, с легкими фруктовыми нотами.

Содержание заквасочных микроорганизмов оставалось высоким на протяжении всего разводочного и производственного циклов. Так, содержание жизнеспособных клеток дрожжей составляло 6,2 - 6,9 lg КОЕ/г, а молочнокислых бактерий - 9,2-9,6 lg КОЕ/г.

На заквасках 2-го освежения производственного цикла замешивали тесто для хлеба ржаного из обдирной муки формового. При замесе теста на контрольной густой закваске и закваске «Деревенская» вносили 33% ржаной муки от общей массы муки в тесте.

Рецептура и режимы приготовления теста на густой закваске приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Рецепттура и режимы приготовления теста на густой ржаной закваске контрольной и «Деревенская»

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и параметры процесса
Закваска густая, кг	55,8
Количество муки в закваске, кг	33,0
Мука ржаная обдирная*, кг	67,0
Соль пищевая, кг	1,5
Вода питьевая, кг	58,2
Влажность расчетная, %	51+(0,5-1,0)
Температура начальная, °С	28
Продолжительность брожения, мин	90
*Влажность муки - 12,0%	

Выброженное в течение 90 мин тесто разделявали на тестовые заготовки массой – 630 г, округляли, укладывали в формы и отправляли на расстойку. Расстоявшиеся тестовые заготовки выпекали в течение 32 мин при температуре 190 °С. Показатели качества хлеба ржаного из обдирной муки формового приведены в таблице 4.

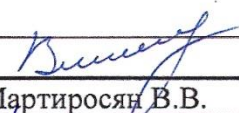
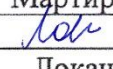
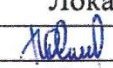
Установлено, что тесто на закваске контрольной и «Деревенская» имело хорошую кислотность и подъемную силу, при этом кислотность опытного теста была на 2,7 град выше, а подъемная сила на 12 минут хуже. Хлеб на закваске «Деревенская» имел большие значения кислотности и содержания летучих кислот, но более низкое содержание спирта. При оценке органолептических показателей дегустаторами отмечено, что хлеб на закваске «Деревенская» имел более выраженные вкус и запах, характерные для ржаного деревенского хлеба.

При принудительном заражении плесневыми грибами *Penicillium chrysogenum* признаки плесневения не проявились на ломтиках опытного образца на протяжении всего периода хранения (7 суток), в то время как на ломтиках контрольного образца рост колоний плесневых грибов наблюдался через 44 ч.

Таблица 4 - Влияние закваски «Деревенская» на свойства теста и качество хлеба ржаного из обдирной муки формового по ГОСТ 2077-2023

Наименование показателей	Значения показателей для хлеба на закваске	
	контрольной	«Деревенская»
Тесто		
Температура, °С		
- начальная	29	29
- конечная	29	29
Кислотность, град		
- начальная	6,4	8,0
- конечная	7,8	10,5
Изменение объема, % к начальному	70	60
Подъемная сила, мин	8	20
Продолжительность брожения, мин	90	
Продолжительность расстойки, мин	30	50
Хлеб		
Влажность мякиша, %	50,0	49,8
Кислотность мякиша, град	6,3	8,5
Пористость, %	57	56
Удельный объем, см ³ /г	1,58	1,56
Содержание спирта, % на СВ	1,65	0,83
Содержание летучих кислот, % к титруемой кислотности	22,0	53,9
Продолжительность хранения до появления признаков микробной порчи при заражении плесневыми грибами <i>Penicillium chrysogenum</i> , ч	44	Признаки микробной порчи не обнаружены при хранении в течение 7 суток
Органолептические показатели:		
- вкус	пресный	свойственный данному виду изделий
- запах	спиртовой	более выраженный

Таким образом, ржаная густая закваска «Деревенская» на новом штамме молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* B131 в сочетании с культурой дрожжей *K. humilis* Y128 позволяет получить хлеб, соответствующий по показателям влажности, пористости и кислотности требованиям ГОСТ 2077-2023. Применение ржаной густой закваски «Деревенская» позволяет повысить устойчивость хлеба к плесневению и улучшить вкус и запах хлеба.

Заместитель директора по научной работе ФГАНУ НИИХП	 Мартirosян В.В.
Старший научный сотрудник СПбФ ФГАНУ НИИХП	 Локачук М.Н.
Технолог ООО «Опытный хлебозавод»	 Павлуша А.А.



УТВЕРЖДАЮ:

Генеральный директор

ООО «Здоровый Хлеб»

Долгих В.В.

02 марта 2026 г

АКТ

опытно-промышленной апробации выработки хлеба на ржаной густой закваске «Деревенская»

Комиссией, в составе представителей СПбФ ФГАНУ НИИХП в лице ведущего научного сотрудника, к.т.н. Савкиной О.А., старшего научного сотрудника Локачук М.Н. с одной стороны, и ООО «Здоровый Хлеб» в лице главного технолога Ландышевой Анны Юрьевны, с другой стороны, составлен настоящий Акт о том, что в условиях ООО «Здоровый Хлеб» проведена опытно-промышленная апробация выработки хлеба заварного кориандрового на густой ржаной закваске «Деревенская», приготовленной с использованием нового штамма молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* B131.

Апробация включала выведение закваски «Деревенская» влажностью 48%, приготавливаемой в разводочном цикле с использованием нового штамма молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* B131 и чистой культуры дрожжей *K. humilis* Y128, выпечку хлеба заварного кориандрового.

Закваску «Деревенская» готовили по разводочному циклу с использованием чистой культуры молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* B131, выращенной на солодовом сусле (12% СВ), в количестве 60 см³, и суспензии заквасочных дрожжей *K. humilis* Y128 в количестве 20 см³ (Таблица 1). Для приготовления суспензии дрожжей в пробирку с выросшей культурой вносили 10 см³ воды и смывали дрожжевые клетки с помощью стеклянной палочки с поверхности скошенного сусла-агара. В качестве контроля служила густая ржаная закваска, выведенная в соответствии с инструкцией с использованием чистых культур молочнокислых бактерий *Lactiplantibacillus plantarum* B4 (ранее *L. brevis* 78), *Lacticaseibacillus paracasei/casei* B3 (ранее *L. brevis* 5), *Lacticaseibacillus paracasei/casei* B31 (ранее *L. plantarum* 63) и дрожжей *K. humilis* Y128 (Сборник современных технологий хлебобулочных изделий, М.: ОАО «Московская типография №2», 2008. 268 с.). Культуры молочнокислых бактерий и дрожжей вносили в водно-мучную смесь I фазы разводочного цикла.

Рецептура и режимы приготовления густой ржаной закваски контрольной и «Деревенская» влажностью 48% в I фазе разводочного цикла приведены в таблице 1.

Таблица 1- Рецепт и режимы приготовления густой ржаной закваски контрольной и «Деревенская» с использованием чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей в I фазе разводочного цикла

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья и значение показателей процесса для ржаной закваски
Культуральная жидкость молочнокислых бактерий, л	0,06
Суспензия чистой культуры дрожжей, л	0,02
Мука ржаная хлебопекарная обдирная*, кг	5,9
Вода питьевая, кг	4,0
Общая масса, кг	10,0
Влажность, %	48,0
Температура начальная, °С	28 - 30
Продолжительность брожения, ч	18-20
*Влажность муки -12,0%	

В производственном цикле закваску освежали дважды в день: первый раз в соотношении выброженная закваска: питательная смесь из муки и воды - 1:3 и оставляли на брожение в течение 5,0-5,5 ч при температуре 26-28 °С, второй раз закваску освежали в соотношении закваска : питательная смесь 1:5 так, чтобы начальная температура закваски была 20-21 °С, затем оставляли на брожение в течение 16-18 ч при температуре 18-20 °С. Физико-химические и микробиологические показатели свойств ржаной закваски контрольной и «Деревенская» представлены в таблице 2.

Таблица 2- Физико-химические и микробиологические показатели свойств ржаной закваски контрольной и «Деревенская»

Наименование показателей	Значение показателей в разных циклах приготовления закваски							
	контрольной				«Деревенская»			
Фаза разводочного цикла	I	II	III	-	I	II	III	-
Номер освежения производственного цикла	-	-	-	8	-	-	-	8
Влажность расчетная, %	48							
Кислотность конечная, град	11,1	13,2	12,3	12,0	15,5	15,9	15,9	13,7
Подъемная сила, мин	25	23	21	15	30	29	27	20
Содержание микроорганизмов, lg КОЕ/г								
-дрожжи	7,1	7,2	7,2	7,4	6,4	6,5	6,5	6,9
- молочнокислые бактерии	8,7	8,8	8,9	9,1	9,5	9,5	9,3	9,2

Закваска «Деревенская» в процессе ведения имела хорошие биотехнологические свойства (титруемую кислотность и подъемную силу). Запах закваски был выраженным, характерным для традиционных деревенских ржаных заквасок, с легкими фруктовыми нотами.

Содержание заквасочных микроорганизмов оставалось высоким на протяжении всего разводочного и производственного циклов. Так, содержание

жизнеспособных клеток дрожжей составляло 6,4 - 6,9 lg КОЕ/г, а молочнокислых бактерий - 9,2-9,5 lg КОЕ/г.

На заквасках 8-го освежения производственного цикла замешивали тесто для хлеба заварного кориандрового (ТУ 10.71.11-009-11163857-2017). При замесе теста на контрольной густой закваске и закваске «Деревенская» вносили 25% ржаной муки от общей массы муки в тесте.

Рецептура и режимы приготовления теста на густой закваске приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Рецепттура и режимы приготовления теста для хлеба заварного кориандрового на густой ржаной закваске контрольной и «Деревенская»

Наименование сырья, полуфабрикатов и показателей процесса	Расход сырья на 100 кг муки и параметры процесса		
	закваска	заварка осахаренная	тесто
Закваска густая, кг	14,2	-	42,3
Заварка осахаренная, кг	-	-	61,5
Мука ржаная обдирная*, кг	16,6	15	20,0
Мука пшеничная первого сорта, кг	-	-	35,0
Солод ржаной ферментированный, кг	-	5,0	-
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	-	-	1,0
Соль пищевая, кг	-	-	1,5
Сахар белый, кг	-	-	4,0
Кориандр, кг	-	0,5	-
Вода питьевая, кг	12,0	41,0	18,4
Влажность расчетная, %	48-50	70,4	49
Температура начальная, °С	26-28	63-65	28-30
Продолжительность, мин:			
- осахаривания	-	90	-
- брожения	300	-	90
*Влажность муки -12,0%			

Выброженное в течение 90 мин тесто разделяли на тестовые заготовки массой 600 г, округляли, укладывали в формы и отправляли на расстойку. Расстоявшиеся тестовые заготовки выпекали в течение 35 мин при температуре 170 °С. Показатели качества хлеба заварного кориандрового формового представлены в таблице 4.

Установлено, что тесто на закваске контрольной и «Деревенская» имело хорошую кислотность и подъемную силу, при этом кислотность опытного теста была на 1,6 град выше, а подъемная сила на 11 мин хуже. Хлеб на закваске «Деревенская» имел большие значения кислотности и содержания летучих кислот, но более низкое содержание спирта. При оценке органолептических показателей дегустаторами отмечено, что хлеб на закваске «Деревенская» имел более выраженный запах.

При принудительном заражении тест-штаммом *Penicillium chrysogenum* признаки плесневения не проявились на ломтиках опытного образца на протяжении всего периода хранения (7 суток), в то время как на ломтиках контрольного образца рост плесневых грибов наблюдался через 24 ч.

Таблица 4 - Влияние закваски «Деревенская» на свойства теста и качество хлеба заварного кориандрового формового

Наименование показателей	Значения показателей для образца хлеба на закваске	
	контрольной	«Деревенская»
Тесто		
Температура, °С		
- начальная	31	30
- конечная	32	31
Кислотность, град		
- начальная	6,2	6,8
- конечная	8,2	9,8
Изменение объема, % к начальному	67	67
Подъемная сила, мин	6	17
Продолжительность брожения, мин	90	
Продолжительность расстойки, мин	27	45
Хлеб		
Влажность мякиша, %	47,9	47,8
Кислотность мякиша, град	5,8	7,6
Пористость, %	64	63
Удельный объем, см ³ /г	1,78	1,77
Содержание спирта, % на СВ	1,00	0,68
Содержание летучих кислот:		
- град	1,25	2,75
- % к титруемой кислотности	21,6	36,2
Продолжительность хранения до появления признаков микробной порчи при заражении плесневыми грибами <i>Penicillium chrysogenum</i> , ч	24	Признаки микробной порчи не обнаружены при хранении в течение 7 суток
Органолептические показатели:	свойственный данному виду изделия, без постороннего привкуса	
- вкус		
- запах	спиртовой	более выраженный

Таким образом, густая ржаная закваска «Деревенская» на новом штамме молочнокислых бактерий *F. sanfranciscensis* B131 в сочетании с культурой дрожжей *K. humilis* Y128 позволяет повысить устойчивость хлеба к плесневению и улучшить запах хлеба.

Ведущий научный сотрудник
СПБФ ФГАНУ НИИХП, к.т.н.

Савкина О.А.

Старший научный сотрудник
СПБФ ФГАНУ НИИХП

Локачук М.Н.

Главный технолог
ООО «Здоровый Хлеб»

Ландышева А.Ю.

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Акт внедрения диссертационной работы в курсы повышения квалификации НТЦ
«Академия хлебопечения НИИХП»



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ХЛЕБОПЕКАРНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ НИИХП)

Federal State Autonomous Scientific Institution "Scientific Research Institute for the Baking Industry"

Отмечен благодарностями Президента РФ (№ 210-рп от 14 мая 2002 года, № 90-рп от 27 марта 2023 года)

г. Москва

27.03.2026 г.

Акт

**внедрения результатов диссертационной работы
Локачук Марины Николаевны на тему «Исследования микробиома
заквасок для разработки микробного консорциума, обеспечивающего
повышение качества хлебобулочных изделий» в курсы повышения
квалификации НТЦ «Академия хлебопечения НИИХП»**

Результаты исследований, научные рекомендации и выводы, представленные в диссертационной работе Локачук Марины Николаевны, применяются при реализации обучающих программ в НТЦ «Академия хлебопечения НИИХП» (лицензия на образовательную деятельность № Л035-00115-77/00096929 от «18» июля 2016 г., выдана Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки). Результаты исследований в области динамики микробиоты заквасок и ее влияния на формирование качества хлебобулочных изделий включены в программы курсов повышения квалификации для научных сотрудников и специалистов хлебопекарной отрасли: «Теоретические и практические аспекты производства хлебобулочных изделий»; «Управление качеством заквасок и готовых изделий на заквасках».

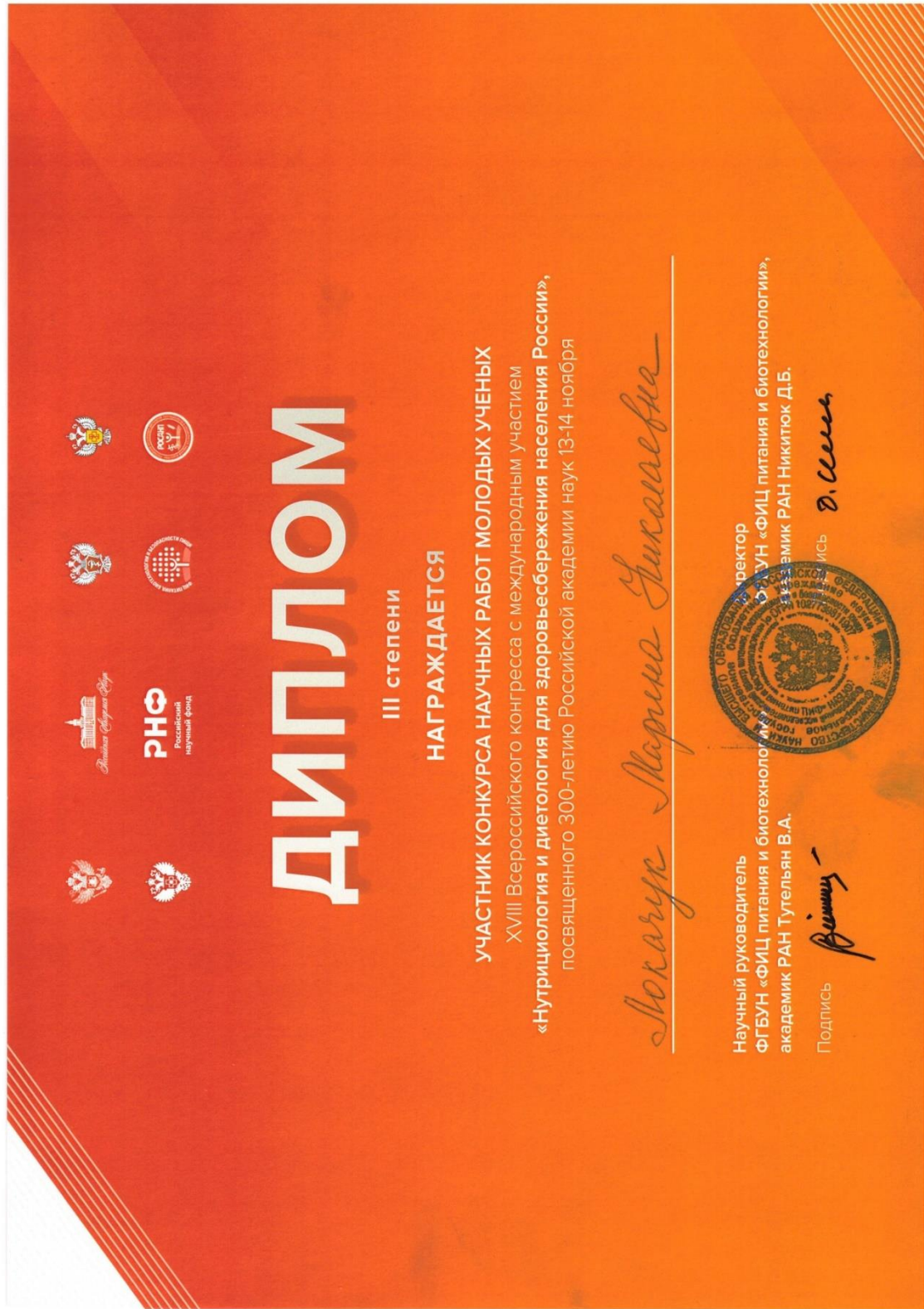
Директор ФГАНУ НИИХП



М.Н. Костюченко

ПРИЛОЖЕНИЕ М

Дипломы участника конференций





ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЮТСЯ

**Локачук Марина Николаевна
Фролова Юлия Михайловна**

за лучшую научно-исследовательскую работу в
рамках XIV Международной конференции
молодых учёных и специалистов

**"СОВРЕМЕННЫЕ ПИЩЕВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ ГЛАЗАМИ
МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ: ПЕРСПЕКТИВЫ, ИННОВАЦИИ
И ПРОГРЕССИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ"**

Директор
ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем
им. В.М. Горбатова" РАН, д.т.н.

 О.А. Кузнецова

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок –
филиал ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им.В.М.Горбатова" РАН

26-27 августа 2021
Санкт-Петербург



**пермский
политех**

ФАКУЛЬТЕТ ХИМИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ,
ПРОМЫШЛЕННОЙ ЭКОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИЙ

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации

Пермский национальный исследовательский
политехнический университет

Благодарственное письмо

Старшему научному сотруднику СПбФ ФГАНУ «Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности»
М.Н. Локачук

Уважаемая Марина Николаевна!

Выражаем благодарность за активное участие
во Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием
«Химия. Экология. Урбанистика»

Проректор ПНИИ
по науке
А.И. Швейкин



19–21 апреля 2023 г., Пермь



СЕРТИФИКАТ

VII международная научно-практическая молодежная конференция
ПОЛАНДОВСКИЕ ЧТЕНИЯ
 посвященная 80-летию Победы в Великой Отечественной войне и 90-летию
 со дня рождения выдающегося ученого Поландовой Раисы Дмитриевны



Локачук Марина Николаевна

принял (а) участие в конференции

**МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЙ СОСТАВА МИКРОБИОМА
 ЗАКВАСОК СПОНТАННОГО БРОЖЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ИХ ВЕДЕНИЯ**

с докладом

М.Н. Костюченко
 директор ФГАНУ НИИХП

Г. МОСКВА
 5 ИЮНЯ 2025 Г.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ПИЩЕВЫХ И ХИМИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»

ДИПЛОМ

награждается

**Локачук
Марина Николаевна**

молодой ученый Санкт-Петербургского филиала ФГАНУ
НИИ хлебопекарной промышленности

за участие в XIII Международной научной конференции студентов
и аспирантов «Техника и технология пищевых производств»
и выступление с докладом
«Исследование влияния видового состава микробных консорциумов
на свойства ржанных густых заквасок и качество хлеба»,
научный руководитель – Савкина О.А., к.т.н.

18-19 апреля 2024 г.

Председатель оргкомитета,
проректор по научной работе,
д.т.н., профессор



А. В. Акулич

Могилев, 2024



МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

СЕРТИФИКАТ

Участника

Настоящим подтверждается, что

Докачук Марина Николаевна

приняла участие в Международной научно-практической конференции
«От модернизации к опережающему развитию: обеспечение конкурентоспособности
и научного лидерства АПК»
24-25 марта 2022 года

Ректор

О.Г. Лоретц





Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский индустриальный университет»

СЕРТИФИКАТ

подтверждает, что

**ЛОКАЧУК
МАРИНА
НИКОЛАЕВНА**

приняла участие в Международной научно-практической конференции
им. Д.И. Менделеева
секция "Биотехнологии и продовольственная безопасность"



0000512867-6

25.11.2022

Тюмень

Федеральное государственное автономное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности»

СЕРТИФИКАТ

III МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ МОЛОДЁЖНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
ПОСВЯЩЁННАЯ ПАМЯТИ Р.Д.ПОЛАНДОВОЙ И 75-ЛЕТИЮ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО
ФИЛИАЛА ФГАНУ НИИ ХЛЕБОПЕКАРНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

**ПИЩЕВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ БУДУЩЕГО:
ИННОВАЦИОННЫЕ ИДЕИ, НАУЧНЫЙ
ПОИСК, КРЕАТИВНЫЕ РЕШЕНИЯ**

Локачук Марина Николаевна

приняла(а) участие в конференции

КОСТЮЧЕНКО М.Н.
ДИРЕКТОР ФГАНУ НИИХП

ПАРАХИНА О.И.
ДИРЕКТОР СПБФ ФГАНУ НИИХП

Лицензия Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки
на осуществление образовательной деятельности от 18.07.2016 №2274,
серия 90ЛО1 №0009320

г. Санкт-Петербург, г. Пушкин 11 июня 2021 г.





МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

СЕРТИФИКАТ

Участника

Настоящим подтверждается, что

Локачук Марина Николаевна

приняла участие в

*Международной научно-практической конференции
«Обеспечение технологического суверенитета АПК: подходы, проблемы, решения»,
посвященную 300-летию Российской академии наук»
16-17 февраля 2023 года*

Ректор



О.Г. Лоретц



Екатеринбург – 2023



ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

УЧАСТНИК КОНКУРСА НАУЧНЫХ РАБОТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
XIX Международного конгресса диетологов и нутрициологов
«Оптимальное питание — основа продолжительной и активной жизни»,
посвященного 95-летию ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»



Виктор Александрович

Тутельян Виктор Александрович
Научный руководитель ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»
Главный внештатный специалист – диетолог Минздрава России
Заслуженный деятель науки РФ, академик РАН

Дмитрий Борисович

Никитюк Дмитрий Борисович
Директор ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,
Заслуженный деятель науки РФ, академик РАН



СЕРТИФИКАТ

участника

МЕЖДУНАРОДНОЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И ОБУЧАЮЩИХСЯ
«ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ КАК ДРАЙВЕР РАЗВИТИЯ
АПК»

Секция «Совершенствование технологий
производства и переработка сельскохозяйственных
культур»

награждается

Марина Николаевна Локачук

Директор института
агротехнологий и пищевых
производств



Орлова Анна-Георгиевна

19-21 марта 2025 г.