

ISSN 1817-7204 (Print)
ISSN 1817-7239 (Online)

ПЕРАПРАЦОЎКА І ЗАХАВАННЕ СЕЛЬСКАГАСПАДАРЧАЙ ПРАДУКЦЫІ PROCESSING AND STORAGE OF AGRICULTURAL PRODUCTS

УДК 637.12.055:579.864:577.21.08
<https://doi.org/10.29235/1817-7204-2026-64-3-252-264>

Поступила в редакцию 19.08.2025
Received 19.08.2025

Е. Н. Бирюк, Н. К. Жабанос, А. А. Соглаева, Т. А. Савельева, Д. С. Корягина

*Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ГАЗО- И АРОМАТОБРАЗУЮЩИХ ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ

Аннотация. Представлены результаты исследований разрешающей способности методов RAPD- и Rep-ПЦР для выявления генетической гетерогенности газо- и ароматобразующих молочнокислых бактерий, выделенных из сырого молока. Изучение типизирующей способности Rep-ПЦР в отношении лейконостоков показало, что изоляты, выделенные из разных природных источников, образуют отличающиеся профили ампликонов при использовании праймеров BOXA1R, BOXA2R, ERIC2-1. Типизирующая способность Rep-ПЦР в отношении изолятов диацетильного лактококка выявлена только с праймерами BOXA2R и ERIC2-1. Метод RAPD-ПЦР обладает типизирующей способностью в отношении лейконостоков при использовании праймеров XD8, P15, P16 и RAPD-mes. Анализ профилей фрагментов изолятов диацетильного лактококка, полученных с помощью RAPD-ПЦР с праймерами XD8 и P16, подтвердил способность метода выявлять гетерогенность внутри биоварианта *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Результаты исследований используются для выделения новых штаммов и пополнения Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мясо-молочной промышленности».

Ключевые слова: генотипирование, RAPD-ПЦР, Rep-ПЦР, заквасочные культуры, лейконостоки, диацетильный лактококк

Для цитирования: Генотипирование газо- и ароматобразующих заквасочных культур с использованием молекулярных методов / Е. Н. Бирюк, Н. К. Жабанос, А. А. Соглаева [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя аграрных навук. – 2026. – Т. 64, № 3. – С. 252–264. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2026-64-3-252-264>

Alena N. Biruk, Natallia K. Zhabanos, Alla A. Soglaeva, Tamara A. Savelyeva, Darya S. Karahina

Institute for the Meat and Dairy Industry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

GENOTYPING OF GAS- AND AROMA-FORMING STARTER CULTURES USING MOLECULAR METHODS

Abstract. The article presents the results of studies on the resolving power of the RAPD and Rep-PCR methods for revealing the genetic heterogeneity of gas- and aroma-forming lactic acid bacteria isolated from raw milk. The study of the typing ability of Rep-PCR in relation to leuconostocs showed that isolates obtained from different natural sources form different amplicon profiles when using primers BOXA1R, BOXA2R, ERIC2-1. The typing ability of Rep-PCR for diacetyl lactococci isolates was demonstrated only with primers BOXA2R and ERIC2-1. The RAPD-PCR method showed typing ability for leuconostocs using primers XD8, P15, P16, and RAPD-mes. The analysis of the fragment profiles of diacetyl lactococcal isolates obtained by RAPD-PCR with primers XD8 and P16 confirmed the ability of the method to detect heterogeneity within the biovariant of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. The results of the research are used to isolate new strains and replenish the Republican collection of industrial strains of starter cultures and their bacteriophages of RUE “Institute of Meat and Dairy Industry”.

Keywords: genotyping, RAPD-PCR, Rep-PCR, starter cultures, leuconostocs, diacetyl lactococcus

For citation: Biruk A. N., Zhabanos N. K., Soglaeva A. A., Savelyeva T. A., Karahina D. S. Genotyping of gas- and aroma-forming starter cultures using molecular methods. *Vesti Natsyional'noi akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2026, vol. 64, no. 3, pp. 252–264 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2026-64-3-252-264>

Введение. Производство ферментированных молочных продуктов базируется на использовании заквасок на основе комбинаций молочнокислых микроорганизмов разных таксономических групп. Получение готовых продуктов с заданным комплексом характеристик во многом определяется составом и свойствами применяемых микроорганизмов. Наиболее часто для производства молочных продуктов (в частности, творога, сметаны, сыра и др.) применяют бактериальные закваски, в состав которых входят штаммы лактококков (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), термофильного стрептококка (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) и лейконостоков: *Leuconostoc lactis* и *Leuconostoc mesenteroides*, который включает три подвида: *dextranicum*, *mesenteroides*, *cremoris*.

Газо- и ароматобразующие микроорганизмы (лейконостоки и диацетильный лактококк) продуцируют в ферментируемое сырье продукты метаболизма, обладающие специфическим вкусом и запахом, которые придают аромат молочному сгустку. Вкус и аромат зависят от различных эфиров, возникающих при взаимодействии спиртов и органических кислот, образуемых микроорганизмами. *Leuconostoc mesenteroides* является активным продуцентом уксусной, молочной, муравьиной, пировиноградной кислот и ацетона [1–4].

Доказано, что *Leuconostoc mesenteroides* продуцируют бактериоцины, которые рассматриваются как современная альтернатива антибиотикам по причине селективного подавления роста патогенной микрофлоры, не оказывая отрицательного воздействия на представителей нормофлоры [5, 6]. Поэтому штаммы *Leuconostoc* используются в молочной промышленности для предотвращения роста патогенных микроорганизмов, а также для производства пробиотиков и биологически активных добавок¹ [7].

Одной из отличительных особенностей *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* является способность продуцировать фермент цитритазу, которая расщепляет цитраты с образованием диоксида углерода (CO₂) и ароматических веществ – ацетона и диацетила. Диацетил имеет особое значение для ароматизации масла, а также важен как ароматизирующий компонент в сливках, пахте и различных сортах свежего сыра [8]. Благодаря газообразующей микрофлоре молочный сгусток содержит углекислый газ, что обеспечивает всплытие творога при отваривании. В кисломолочных напитках присутствие диоксида углерода в известной степени улучшает вкус, придавая продукту легкий пикантный привкус [3]. Газообразующая микрофлора также важна для формирования глазков во многих видах сыра, кроме того, лейконостоки оказывают сильное влияние на органолептические показатели сыра.

Выделение чистых культур молочнокислых бактерий является основой по созданию и поддержанию отраслевых коллекций микроорганизмов. Для изготовления ассортимента заквасок и обеспечения их стабильных функциональных характеристик необходимо постоянно обеспечивать ротацию заквасочных штаммов, что связано как с изменением биологических свойств заквасочных микроорганизмов при их длительном культивировании и хранении, так и с разнообразием бактериофагов на молокоперерабатывающих предприятиях. Развитие молокоперерабатывающей промышленности как основного потребителя заквасок ставит новые задачи по обеспечению направленности технологических процессов ферментации сырья, а также получению продукции со стабильными показателями качества и определенными органолептическими характеристиками [9]. Этим обусловлена необходимость постоянного выделения чистых культур молочнокислых бактерий с целью получения производственно ценных штаммов заквасочных микроорганизмов.

Важнейшей задачей при выделении производственно ценных штаммов заквасочных культур является их точная таксономическая идентификация. Современные исследования показывают, что в последние годы идентификация микроорганизмов только на основании морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков стала недостоверной, так как было установлено, что многие виды молочнокислых бактерий обладают высоким уровнем фенотипической изменчивости. Указанные признаки дают только предварительные сведения о систематическом положении данного микроорганизма и часто не позволяют отнести его к определенному виду.

¹ Патент RU 2273662, МПК C12N 1/20 (2006.01), A23C 9/12 (2006.01), C12R 1/01 (2006.01). Консорциум микроорганизмов пробиотического действия: № 2004118804/13: заявлено 22.06.2004: опубл. 10.04.2006 / Рожков А. В., Шестаков А. И.; заявители: Рожков А. В., Шестаков А. И. Бюл. № 10.

Для более точной идентификации микроорганизмов необходимо использовать различные молекулярно-генетические методы [10, 11].

В специализированных коллекциях поддерживается большое число промышленно ценных штаммов ограниченного количества видов. Важной задачей является сохранение их внутривидового разнообразия. Выбор штаммов для включения в коллекционный фонд проводится на основании анализа экологических особенностей (место, время, объект выделения), фено- и генотипических диагностических свойств, внесенных в паспорт штамма. Для отбора культур в коллекционный фонд важно использование дополнительных тестов, которые позволяют дифференцировать разные штаммы одного вида или подвида [12].

В настоящее время для оценки гетерогенности микроорганизмов используют методы генотипирования, которые можно разделить на несколько групп: фрагментный анализ ДНК, прямые методы (на основе секвенирования специфичных участков ДНК, ДНК-микрочипы, полногеномное секвенирование) и косвенные методы (электрофорез в денатурирующей системе, анализ кривых плавления). Фрагментный анализ ДНК включает различные методы получения фингерпринтов: гель-электрофорез в пульсирующем поле (*PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis*), анализ полиморфизма рестрикционных фрагментов (*RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism*), полиморфизм произвольно амплифицированных фрагментов ДНК (*RAPD – Random Amplification of Polymorphic DNA*), амплификацию повторяющихся последовательностей экстрагенных полиндромов, многолокусный анализ вариабельного числа копий tandemных повторов (*MLVA – Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis*); анализ полиморфизма амплифицированных фрагментов (*AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism*) удачно совмещает возможности эндонуклеаз, рестрикции и амплификации [13].

Дифференцирующие возможности, определяющие способность метода различать бактериальные штаммы конкретного вида, являются одним из наиболее важных критериев для выбора метода генотипирования объекта исследования. Такими свойствами, например, обладают молекулярные маркеры RAPD-ПЦР и AFLP, которые позволяют оценить стабильность штаммов микроорганизмов при ведении коллекций и производстве бактериальных препаратов. Разрешающая способность метода зависит от многих факторов, среди которых ключевую роль играет выбор наиболее информативного участка генома. Кроме того, большинство методов генотипирования проявляют специфичность по отношению к бактериальным штаммам, вследствие чего они с различной эффективностью дифференцируют тот или иной вид. Воспроизводимость результатов генотипирования является важным требованием к методу ДНК-фингерпринта, обычно результаты фрагментарного анализа ДНК труднее воспроизвести и сравнить между лабораториями, чем результаты генотипирования, основанного на секвенировании последовательностей ДНК [13].

Цель настоящей работы – изучение разрешающей способности методов RAPD- и Rep-ПЦР для выявления генетической гетерогенности газо- и ароматобразующих молочнокислых бактерий, выделенных из сырого молока.

Материалы и методы исследований. Исследования по изучению разрешающей способности методов RAPD- и Rep-ПЦР для генотипирования изолятов заквасочных культур проводили в отделе биотехнологий РУП «Институт мясо-молочной промышленности» в 2021–2023 гг. В работе использовали изоляты лейконостоков и диацетильного лактококка, выделенные из природных источников в рамках выполнения мероприятия 100 (93) «Разработать технологию получения газо- и ароматобразующих микроорганизмов на основе методов молекулярно-генетического типирования и освоить производство заквасок для творога с их использованием» подпрограммы «Инновационные биотехнологии» Государственной программы «Научные технологии и техника» на 2021–2025 годы.

Бактериальные культуры выращивали в жидкой среде MRS [14]. Выделение ДНК из бактериальных клеток проводили с использованием коммерческого набора «АртДНК MiniSpin» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь) согласно инструкции производителя. Для проведения амплификации использовали реактивы и праймеры производства ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

Для Rep-ПЦР использовали праймеры ERIC2-1, ERIC IR1, BOX A1R и BOX A2R. Для RAPD-ПЦР использовали праймеры P15, P16, XD8 и XD9, (GTG)₅ и RAPD-mes (только для *Leuconostoc*). Про-

дукты амплификации смешивали с интеркалирующим красителем UView 6x Loading Dye (Bio-Rad) и разделяли с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с использованием 1X TAE буфера. Для документирования результатов электрофореза использовали систему GelDoc XR+ (Bio-Rad). Размеры фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в геле, в качестве маркеров молекулярного веса использовали M1Kb и M100bp (ОДО «Праймтех», Республика Беларусь).

Кластерный анализ полученных ПЦР-профилей осуществляли с помощью программы TREECON for Windows (версия 1.3b). Бинарные матрицы исходных данных создавали вручную после визуализации гелей, обозначая присутствие фрагмента как 1, а его отсутствие – 0. Анализ осуществляли методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Бутстрап вычисляли по выборке из 100 деревьев. Критерием устойчивости кластера считали значение бутстрапа выше 60.

Результаты и их обсуждение. Анализ литературных данных показал, что для генотипирования *Leuconostoc mesenteroides* чаще применяют Rep-ПЦР (амплификация повторяющейся экстрагенной палиндромной ДНК) и RAPD-ПЦР (ПЦР с неспецифическими праймерами). Эти методы основаны на использовании коротких праймеров, число и расположение сайтов связывания таких неспецифических праймеров различаются среди бактерий разных видов и различных штаммов одного вида, что позволяет по профилю образуемых ПЦР-фрагментов выявлять генетическое различие/сходство микроорганизмов [15, 16].

Геномы прокариот характеризуются наличием нескольких категорий повторяющихся последовательностей, таких как гены рРНК, тРНК, IS-элементы, а также прямые повторяющиеся последовательности, локализованные в некодирующих регионах или Rep-участках. Праймеры ERIC, соответствующие последовательностям Rep-повторов *E.coli*, успешно используют для анализа меж- и внутривидовых различий бактериальных геномов. Генетические перестройки приводят к тому, что в ходе ERIC-ПЦР могут образовываться профили ампликонов, которые отличаются не только у разных видов микроорганизмов, но и у представителей одного вида [17].

Для анализа разрешающей способности методов Rep- и RAPD-ПЦР отобраны 6 изолятов лейконостоков (p1601/1-7-7, p1656/1-2-1, p1618/1-2, p1613/2-1-5, p1736/1-1, p1766/2-2) и 4 изолята диациетильного лактококка (p1607/2-5-7, p1609/1-3-2, p1604/1-9-7, p1606/1-2-8), выделенные из сырого молока из разных регионов Республики Беларусь (табл. 1).

Таблица 1. Изоляты лейконостоков и диациетильного лактококка, отобранные для исследований разрешающей способности методов Rep- и RAPD-ПЦР

Table 1. *Leuconostoc* and diacetyl lactococcus isolates selected for studies of the resolving power of the Rep- and RAPD-PCR methods

Номер изолята	Источник выделения	Видовая принадлежность
p1601/1-7-7	Молоко сырое, ОАО «Городея», д. Большая Лысица, Несвижский р-н, Минская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1613/2-1-5	Молоко сырое, ОАО «Щорсы», д. Щорсы, Новогрудский р-н, Гродненская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1618/1-2	Молоко сырое, СРДУП «Свитязь», д. Валевка, Новогрудский р-н, Гродненская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1656/1-2-1	Молоко сырое, СПК АК «Снов», д. Снов, Несвижский р-н, Минская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1736/1-1	Молоко сырое, Барановичский молочный комбинат, г. Барановичи, Брестская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1766/2-2	Молоко сырое, ОАО «Комаровка», аг. Томашовка, Брестский р-н, Брестская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1604/1-9-7	Молоко сырое, СК «Острошицы», д. Веснино, Логойский р-н, Минская обл.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>
p1606/1-2-8	Молоко сырое, СПК «Агрокомбинат Снов», д. Новый Снов, Несвижский р-н, Минская обл.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>
p1607/2-5-7	Молоко сырое, СПК «Агрокомбинат Снов», д. Сычи, Несвижский р-н, Минская обл.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>
p1609/1-3-2	Молоко сырое, ОАО «Смолевичи Бройлер», филиал «Смолевичи Дэйриз», Смолевичский р-н, Минская обл.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>

Видовая принадлежность исследуемых культур подтверждена результатами ПЦР со специфичными праймерами Lmes-f (5'-AACTTAGTGTGCGCATGAC-3') и Lmes-r (5'-AGTCGAGTTACAGACTACAA-3'), размер ПЦР-продукта – 1 150 п. н., опубликованными в работе [18].

Анализ профилей фрагментов, полученных с помощью Rep-ПЦР с праймерами ERIC 1IR, ERIC2-1, BOXA1R и BOXA2R, показал, что метод обладает типизирующей способностью и позволяет выявлять гетерогенность внутри вида *Leuconostoc mesenteroides* (рис. 1). При использовании праймеров BOXA1R и BOXA2R все исследуемые изоляты отличаются профилями фрагментов Rep-ПЦР.

При использовании праймеров ERIC 1IR и ERIC2-1 большее количество ампликонов образуется с праймером ERIC2-1 по сравнению с ERIC 1IR. Кроме того, с праймером ERIC2-1 для каждого изолята лейконостоков образуется уникальный профиль, в отличие от праймера ERIC 1IR, с которым два изолята (p1613/2-1-5 и p1766/2-2) из шести имеют схожий паттерн (см. рис. 1).

Анализ профилей фрагментов разных изолятов диацетильного лактококка, полученных с праймерами BOXA1R и BOXA2R, позволил установить, что с праймером BOXA1R образуются практически идентичные профили у всех исследуемых культур. В то же время с праймером BOXA2R у всех изолятов образуются различные профили ампликонов. С праймерами ERIC 1IR и ERIC2-1 образуются схожие профили у изолятов p1606/1-2-8 и p1609/1-3-2 (рис. 2).

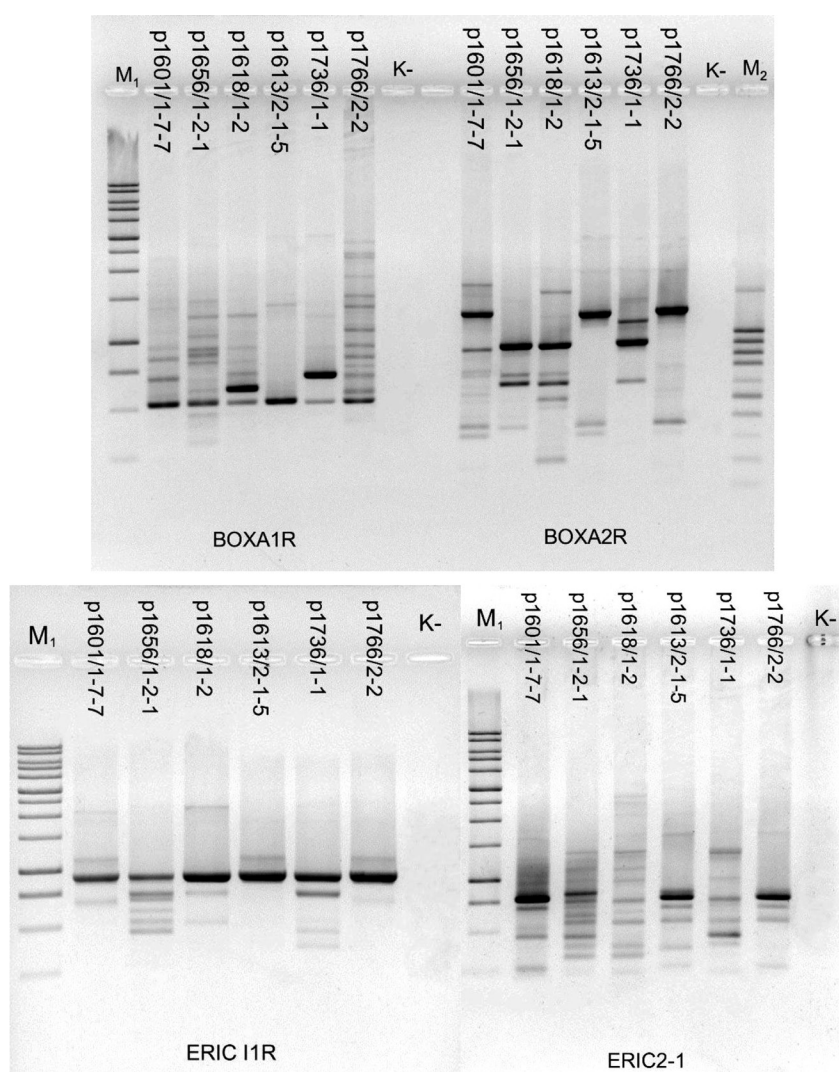


Рис. 1. Электрофоретические профили продуктов Rep-ПЦР лейконостоков с праймерами BOXA1R, BOXA2R, ERIC 1IR и ERIC2-1; M₁ – маркер молекулярного веса M1Kb; M₂ – маркер молекулярного веса M100bp; K- – отрицательный контроль

Fig. 1. Electrophoretic profiles of Rep-PCR products of leuconostocs with primers BOXA1R, BOXA2R, ERIC 1IR and ERIC2-1; M₁ – molecular weight marker M1Kb; M₂ – molecular weight marker M100bp; K- – negative control

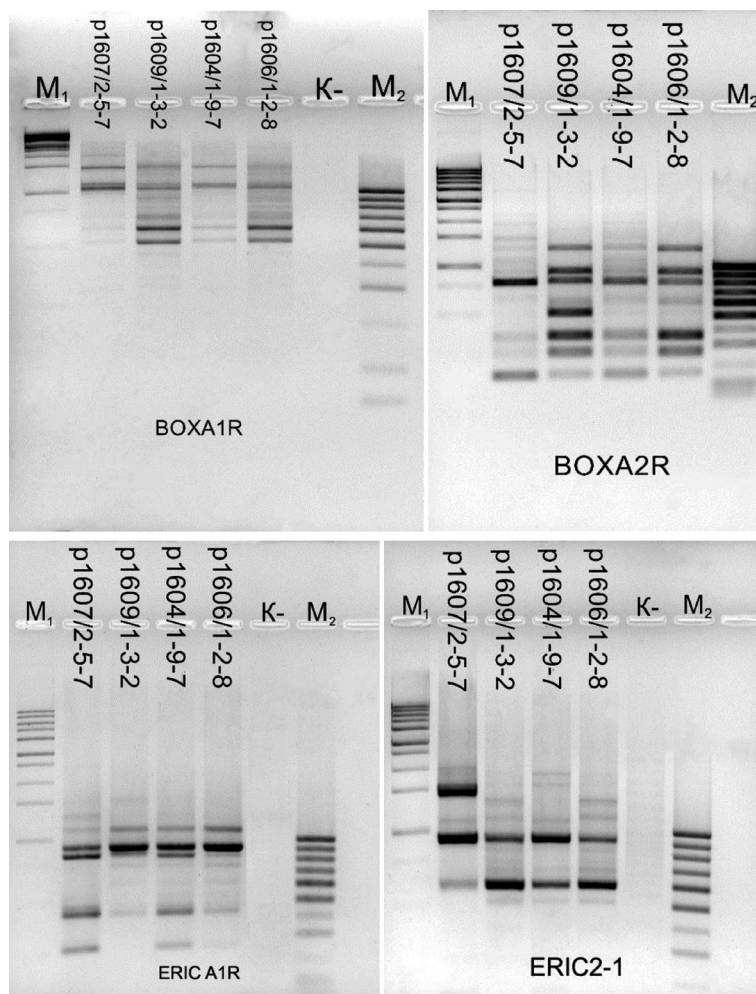


Рис. 2. Электрофоретические профили продуктов Rep-ПЦР диацильного лактококка с праймерами BOXA1R, BOXA2R, ERIC 1R и ERIC2-1; M₁ – маркер молекулярного веса M1Kb; M₂ – маркер молекулярного веса M100bp; K- – отрицательный контроль

Fig. 2. Electrophoretic profiles of Rep-PCR products of diacetyl lactococcus with primers BOXA1R, BOXA2R, ERIC 1R and ERIC2-1; M₁ – molecular weight marker M1Kb; M₂ – molecular weight marker M100bp; K- – negative control

Анализ профилей фрагментов, полученных с помощью RAPD-ПЦР с праймерами P15, P16, XD8, XD9, (GTG)₅, RAPD-mes, подтвердил типизирующую способность метода выявлять гетерогенность внутри вида *Leuconostoc mesenteroides* (рис. 3). При использовании праймеров XD8, P16, (GTG)₅, RAPD-mes все исследуемые изоляты отличаются профилями ампликонов. С праймером P15 только у двух изолятов *Leuconostoc mesenteroides* образуются идентичные профили ампликонов (p1613/2-1-5 и p1766/2-2). Все остальные изоляты имеют уникальные профили ампликонов. Наименьшее количество ампликонов у всех изолятов образуется с праймером XD9. Праймер RAPD-mes, благодаря тому что разработан специально для типирования лейконостоков, позволяет получать хорошо читаемые электрофореграммы.

Анализ профилей фрагментов изолятов диацильного лактококка, полученных с помощью RAPD-ПЦР, показал, что метод обладает типизирующей способностью и позволяет выявлять гетерогенность внутри биоварианта только с праймерами XD8, XD9 и P16 (рис. 4). Наибольшее количество четких ампликонов наблюдается с праймером XD8. С праймером P15 получены схожие профили ампликонов для изолятов p1604/1-9-7, p1606/1-2-8, p1609/1-3-2. С праймером (GTG)₅ получены схожие профили ампликонов для изолятов p1604/1-9-7, p1606/1-2-8, p1607/2-5-7.

Таким образом, для всех исследуемых культур лейконостоков уникальные профили фрагментов получены при проведении Rep-ПЦР с праймерами ERIC2-1, BOXA1R и BOXA2R, для изолятов диацильного лактококка – с праймерами BOXA2R и ERIC2-1.

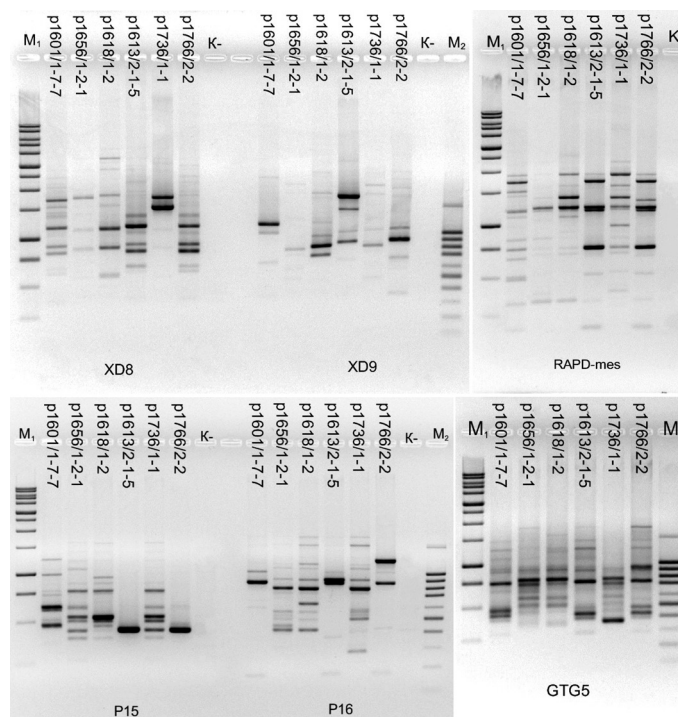


Рис. 3. Электрофорез продуктов RAPD-ПЦР лейконостоков с праймерами XD8, XD9, P15, P16 и (GTG)₅;
M₁ – маркер молекулярного веса 1Kb; M₂ – маркер молекулярного веса 100bp; K- – отрицательный контроль

Fig. 3. Electrophoresis of RAPD-PCR products of leuconostocs with primers XD8, XD9, P15, P16 and (GTG)₅;
M₁ – molecular weight marker 1Kb; M₂ – molecular weight marker 100bp; K- – negative control

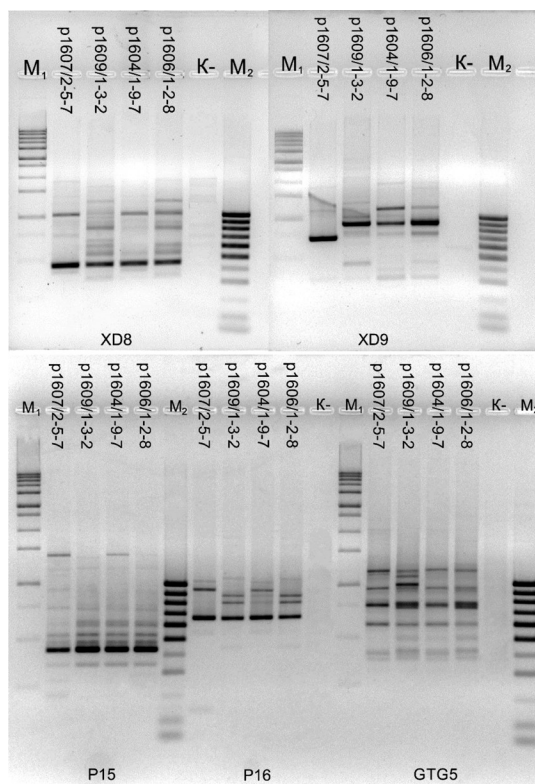


Рис. 4. Электрофорез продуктов RAPD-ПЦР диацильного лактококка с праймерами XD8, XD9, P15, P16 и (GTG)₅;
M₁ – маркер молекулярного веса 1Kb; M₂ – маркер молекулярного веса 100bp; K- – отрицательный контроль

Fig. 4. Electrophoresis of RAPD-PCR products of diacetyl lactococcus with primers XD8, XD9, P15, P16 and (GTG)₅;
M₁ – molecular weight marker 1Kb; M₂ – molecular weight marker 100bp; K- – negative control

При проведении RAPD-ПЦР лучшая разрешающая способность для лейконостоков установлена при использовании праймеров XD8, P15, P16 и RAPD-mes, для диацетильного лактококка – с праймерами XD8 и P16.

На следующем этапе проведены исследования по выявлению различий по профилю генерируемых ампликонов среди изолятов, выделенных как из одного, так и из разных природных источников. Для типирования отобраны 20 изолятов *Leuconostoc mesenteroides* из 8 природных источников и 10 изолятов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* из 4 природных источников (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Изоляты лейконостоков и диацетильного лактококка, отобранные для генотипирования

Table 2. *Leuconostoc* and diacetyl lactococcus isolates selected for genotyping

Номер изолята	Источник выделения	Видовая принадлежность
p1601/1-4-2 p1601/1-7-7	Молоко сырое, ОАО «Городея», д. Большая Лысица, Несвижский р-н, Минская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1605/2-3-1 p1605/2-5-9	Молоко сырое, ОАО «Новая жизнь», д. Наручевичи, Несвижский р-н, Минская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1613/2-1-2 p1613/2-1-5	Молоко сырое, ОАО «Щорсы», д. Щорсы, Новогрудский р-н, Гродненская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1618/1-2 p1618/1-1-2 p1618/1-1-9	Молоко сырое, СРДУП «Свитязь», д. Валивка, Новогрудский р-н, Гродненская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1656/1-2-1 p1656/1-2-6 p1656/1-2-7	Молоко сырое, СПК АК «Снов», д. Снов, Несвижский р-н, Минская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1754/1-2 p1754/2-1	Молоко сырое козье, д. Большие Прусы, Кобыльский р-н, Минская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1764/2-4	Молоко сырое, ОАО «Агро-Пелище», аг. Пелище, Каменецкий р-н, Брестская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1766/2-1 p1766/2-2 p1766/2-5	Молоко сырое, ОАО «Комаровка», аг. Томашовка, Брестский р-н, Брестская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1604/1-5-2 p1604/1-9-7 p1604/1-3-1	Молоко сырое, СК «Острошицы», д. Веснино, Логойский р-н, Минская обл.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>
p1606/1-2-8 p1606/1-4-3	Молоко сырое, СПК АК «Снов», д. Новый Снов, Несвижский р-н, Минская обл.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>
p1607/2-5-7 p1607/2-6-7	Молоко сырое, СПК АК «Снов», д. Сычи, Несвижский р-н, Минская обл.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>
p1609/1-1-7 p1609/1-3-2 p1609/1-5-4	Молоко сырое, ОАО «Смолевичи Бройлер», филиал «Смолевичи Дэйриз», Смолевичский р-н, Минская обл.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>

Типирование проводили с праймерами, отобранными на предыдущем этапе работы: для Rep-ПЦР использовали праймеры BOXA2R и ERIC2-1 как для лейконостоков, так и для диацетильного лактококка; при проведении RAPD-ПЦР с лейконостоками использовали праймеры XD8, P15, P16 и RAPD-mes, для типирования диацетильного лактококка – праймеры XD8 и P16.

Для оценки генетического родства исследуемых культур провели кластерный анализ результатов генотипирования при помощи программы TREECON for Windows (версия 1.3b) [19]. Результаты анализа представлены на рис. 5 и 6 в виде филогенетических деревьев.

В результате анализа электрофореграмм, полученных с использованием праймеров BOXA2R и ERIC2-1, установлено, что не все исследуемые изоляты лейконостоков, выделенные из одного природного источника, имеют идентичные профили ампликонов. Так, изолят p1618/1-2 имеет профили фрагментов, отличные от профилей изолятов p1618/1-1-2 и p1618/1-1-9, а изоляты p1613/2-1-2 и p1613/2-1-5 различаются профилями фрагментов, полученными в результате Rep-ПЦР с обоими праймерами.

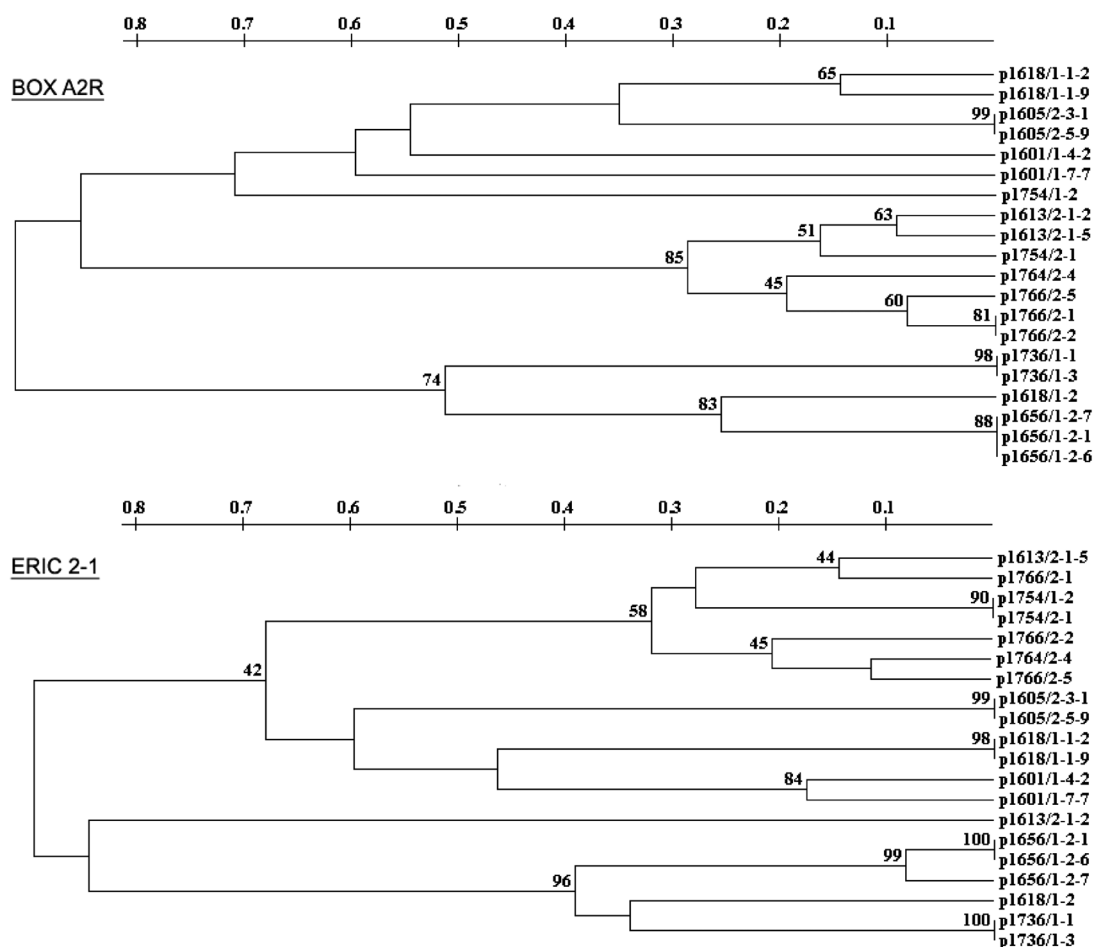


Рис. 5. Филогенетические деревья, полученные в результате анализа электрофореграмм Rep-ПЦР лейконостоков

Fig. 5. Phylogenetic trees obtained as a result of the analysis of Rep-PCR electropherograms of leuconostocs

В результате анализа электрофореграмм, полученных при проведении RAPD-ПЦР с праймерами XD8, P15, P16 и RAPD-mes, выявлены различия в профилях фрагментов для изолятов лейконостоков p1618/1-2, p1618/1-1-2 и p1618/1-1-9, а также для изолятов p1613/2-1-2 и p1613/2-1-5 (рис. 6). Таким образом, результаты исследований показали, что комбинированное использование Rep-ПЦР и RAPD-ПЦР повышает достоверность типирования изолятов лейконостоков.

В результате типирования культур диацетильного лактококка методами RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР выявлены различия между изолятами, выделенными из одного природного источника (рис. 7, 8), что позволяет использовать их совместно при создании бактериальных консорциумов.

Закключение. В настоящее время для оценки гетерогенности микроорганизмов широко используют различные методы генотипирования. Разрешающая способность метода зависит от многих факторов, главный из которых – выбор наиболее информативного участка генома. Кроме того, большинство методов генотипирования проявляют специфичность по отношению к бактериальным штаммам, вследствие чего они с различной эффективностью дифференцируют тот или иной вид.

Изучение типизирующей способности Rep-ПЦР в отношении лейконостоков показало, что изоляты, выделенные из разных природных источников, образуют отличающиеся профили ампликонов с использованием праймеров BOXA1R, BOXA2R, ERIC2-1. Типизирующая способность Rep-ПЦР в отношении изолятов диацетильного лактококка выявлена только с праймерами BOXA2R и ERIC2-1. Метод RAPD-ПЦР обладает типизирующей способностью в отношении лейконостоков с использованием праймеров XD8, P15, P16 и RAPD-mes. Анализ профилей фрагментов изолятов диацетильного лактококка, полученных с помощью RAPD-ПЦР, показал, что метод обладает типизирующей способностью и позволяет выявлять гетерогенность внутри биоварианта *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* с праймерами XD8 и P16.

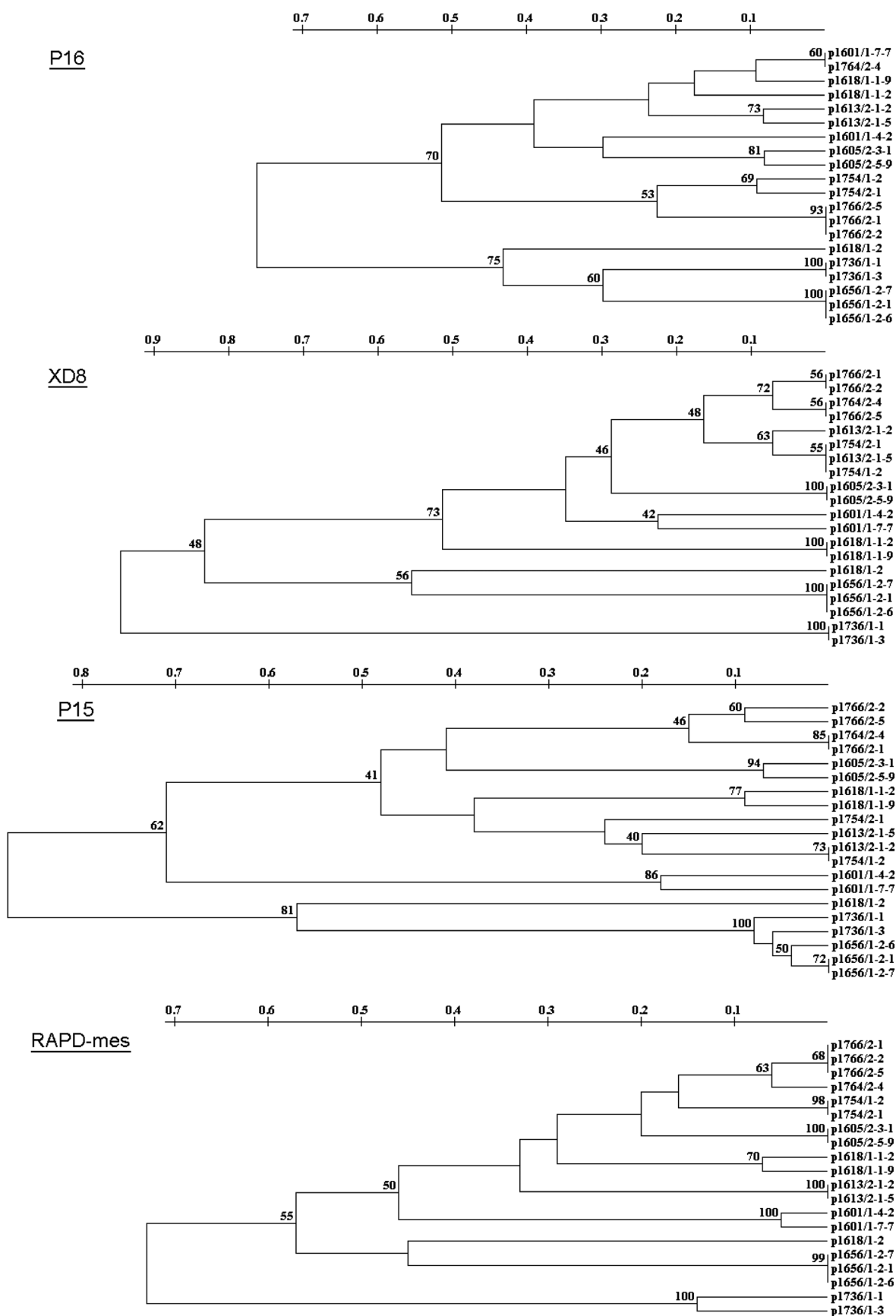


Рис. 6. Филогенетические деревья, полученные в результате анализа RAPD-ПЦР электрофореграмм лейконосточков

Fig. 6. Phylogenetic trees obtained as a result of the analysis of RAPD-PCR electropherograms of leuconostoc

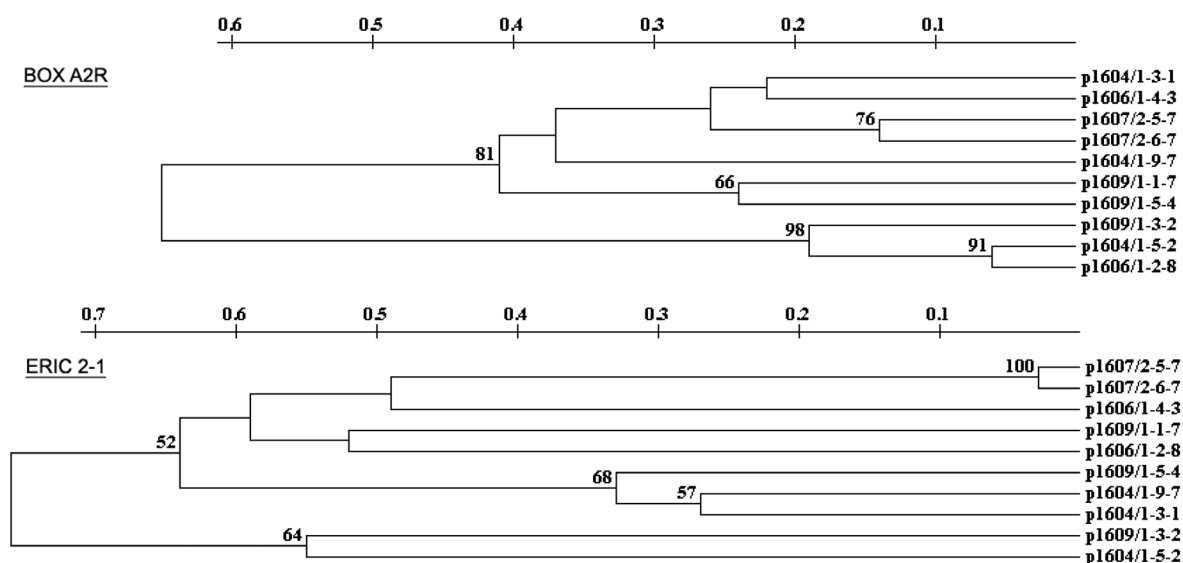


Рис. 7. Филогенетические деревья, полученные в результате анализа электрофореграмм Rep-ПЦР лактококков

Fig. 7. Phylogenetic trees obtained as a result of the analysis of Rep-PCR electropherograms of lactococci

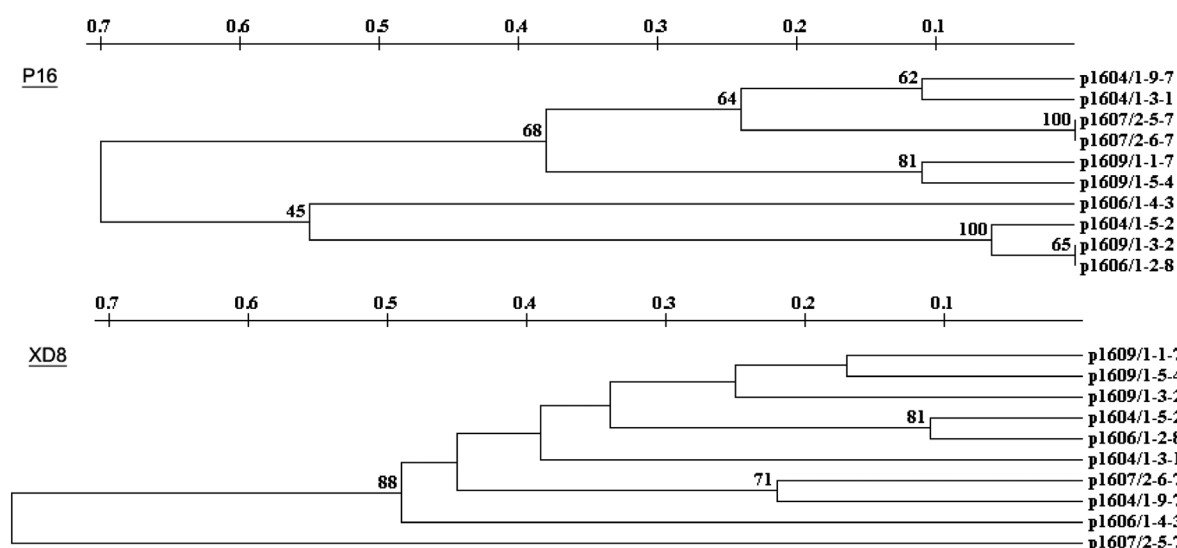


Рис. 8. Филогенетические деревья, полученные в результате анализа электрофореграмм RAPD-ПЦР лактококков

Fig. 8. Phylogenetic trees obtained as a result of the analysis of RAPD-PCR electropherograms of lactococci

Выявление гетерогенности среди изолятов диацетильного лактококка и лейконостоков с помощью комбинированного использования методов Rep-ПЦР и RAPD-ПЦР повышает достоверность типирования изолятов, выделенных из природных источников.

Благодарности. Работа выполнена в рамках мероприятия 100 (93) «Разработать технологию получения газо- и ароматобразующих микроорганизмов на основе методов молекулярно-генетического типирования и освоить производство заквасок для творога с их использованием» подпрограммы «Инновационные биотехнологии» Государственной программы «Научные технологии и техника» на 2021–2025 годы (срок выполнения – 2021–2023 гг.). Авторы выражают благодарность М. А. Шукшиной за помощь в получении экспериментальных данных, использованных при подготовке статьи.

Acknowledgements. This work was carried out within the framework of Activity 100 (93) “To develop a technology for obtaining gas- and aroma-forming microorganisms based on molecular genetic typing methods and to establish the production of starter cultures for cottage cheese using them,” subprogramme “Innovative Biotechnologies” of the State Programme “Science-Intensive Technologies and Equipment” for 2021–2025 (implementation period: 2021–2023). The authors express their gratitude to M. A. Shukshina for her assistance in obtaining the experimental data used in the preparation of this article.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Organic acids production from lactic acid bacteria: a preservation approach / S. P. Bangar, S. Suri, M. Trif, F. Ozogul // *Food Bioscience*. – 2022. – Vol. 46. – Art. 101615. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101615>
2. Bintsis, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: an update in their metabolism and genetics / T. Bintsis // *AIMS Microbiology*. – 2018. – Vol. 4, № 4. – P. 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
3. Smid, E. J. Production of aroma compounds in lactic fermentations / E. J. Smid, M. Kleerebezem // *Annual Review of Food Science and Technology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 313–326. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092339>
4. Impact of lactic acid bacteria and their metabolites on the techno-functional properties and health benefits of fermented dairy products / H. Sharma, F. Ozogul, E. Bartkiene, J. M. Rocha // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2023. – Vol. 63, № 21. – P. 4819–4841. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2007844>
5. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 reduces *Listeria monocytogenes* growth and impacts on fatty acids profile and conjugated linoleic acid content in fermented cream / D. O. Borges, M. M. Matsuo, C. S. Bogsan [et al.] // *LWT*. – 2019. – Vol. 107. – P. 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.085>
6. Coelho, M. Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: from starter cultures to probiotic functions / M. Coelho, F. X. Malcata, C. Silva // *Foods*. – 2022. – Vol. 11, № 15. – Art. 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>
7. Fatma, C. H. Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk / C. H. Fatma, Z. Benmechernene // *African Journal of Microbiology Research*. – 2013. – Vol. 7, № 23. – P. 2961–2969. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5753>
8. Aroma formation during cheese ripening is best resembled by *Lactococcus lactis* retentostat cultures / O. van Mastriht, D. G. Tejeda, M. N. Kristensen [et al.] // *Microbial Cell Factories*. – 2018. – Vol. 17, № 1. – Art. 104. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0950-7>
9. Прикладная биотехнология: от фундаментальных исследований к промышленным технологиям / Н. К. Жабанос, Н. Н. Фурик, Е. Н. Бирюк, Т. А. Савельева // *Наука и инновации*. – 2024. – № 10 (260). – С. 12–18.
10. Локачук, М. Н. Видовая идентификация чистых культур заквасочных лактобацилл / М. Н. Локачук, Ю. М. Фролова // *Пищевые системы*. – 2021. – Т. 4, № 3S. – С. 184–187. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-3S-184-187>
11. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий для ферментированных молочных продуктов / Т. Н. Орлова, И. А. Функ, Р. В. Дорофеев [и др.] // *Ползуновский вестник*. – 2019. – № 2. – С. 47–50. <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2019.02.009>
12. Грачева, И. В. Принципы формирования коллекционных фондов штаммов микроорганизмов / И. В. Грачева, А. В. Осин, В. В. Кутырев // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2021. – № 2. – С. 16–23. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-16-23>
13. Проблемы генотипирования микроорганизмов / Р. А. Волкова, Е. С. Сколотнева, Е. В. Эльберт [и др.] // *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2016. – Т. 16, № 3 (59). – С. 139–144.
14. Development of a selective medium for the enumeration of lactic acid bacteria and bifidobacteria in food products / J. H. Yoon, J. Y. Kim, J. H. Yoo, S. Y. Lee // *Food Science and Biotechnology*. – 2023. – Vol. 32, № 5. – P. 713–721. <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01202-z>
15. Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc* spp. strains from traditional, starter-free cheeses / Á. Alegria, S. Delgado, A. B. Flórez, B. Mayo // *Dairy Science and Technology*. – 2013. – Vol. 93, № 6. – P. 657–673. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0128-3>
16. DNA profiling of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from fermented food and farm produce in Korea by repetitive-element PCR / J. Kaur, S. Lee, A. Sharma, Y.-S. Park // *Food Science and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 26, № 6. – P. 1667–1673. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0189-9>
17. Генетическое типирование *Salmonella enterica* с помощью ПЦР / В. В. Слизень, Ж. Ф. Циркунова, Е. И. Гудкова, О. Ч. Глаз // *Медицинский журнал*. – 2014. – № 3 (49). – С. 93–97.
18. Lee, H. J. Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species / H. J. Lee, S. Y. Park, J. Kim // *FEMS Microbiology Letters*. – 2000. – Vol. 193, № 2. – P. 243–247. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09431.x>
19. Van de Peer, Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment / Y. Van de Peer, R. De Wachter // *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*. – 1994. – Vol. 10, № 5. – P. 569–570. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/10.5.569>

References

1. Bangar S. P., Suri S., Trif M., Ozogul F. Organic acids production from lactic acid bacteria: a preservation approach. *Food Bioscience*, 2022, vol. 46, art. 101615. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101615>
2. Bintsis T. Lactic acid bacteria as starter cultures: an update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 2018, vol. 4, no. 4, pp. 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
3. Smid E. J., Kleerebezem M. Production of aroma compounds in lactic fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2014, vol. 5, pp. 313–326. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092339>
4. Sharma H., Ozogul F., Bartkiene E., Rocha J. M. Impact of lactic acid bacteria and their metabolites on the technofunctional properties and health benefits of fermented dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, vol. 63, no. 21, pp. 4819–4841. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2007844>
5. Borges D. O., Matsuo M. M., Bogsan C. S., da Silva T. F., Casarotti S. N., Penna A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 reduces *Listeria monocytogenes* growth and impacts on fatty acids profile and conjugated linoleic acid content in fermented cream. *LWT*, 2019, vol. 107, pp. 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.085>
6. Coelho M., Malcata F. X., Silva C. Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: from starter cultures to probiotic functions. *Foods*, 2022, vol. 11, no. 15, art. 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>
7. Fatma C. H., Benmechernene Z. Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, vol. 7, no. 23, pp. 2961–2969. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5753>

8. Mastrigt O. van, Tejeda D. G., Kristensen M. N., Abee T., Smid E. J. Aroma formation during cheese ripening is best resembled by *Lactococcus lactis* retentostat cultures. *Microbial Cell Factories*, 2018, vol. 17, no. 1, art. 104. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0950-7>
9. Zhabanos N., Furik N., Biryuk E., Savelyeva N. Applied biotechnology: from fundamental research to industrial technologies. *Nauka i innovatsii = Science & Innovations*, 2024, no. 10 (260), pp. 12–18 (in Russian).
10. Lokachuk M. N., Frolova J. M. Species identification of lactobacilli for the sourdough. *Pishchevye sistemy = Food Systems*, 2021, vol. 4, no. 3S, pp. 184–187 (in Russian). <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-3S-184-187>
11. Orlova T. N., Funk I. A., Dorofeev R. V., Ott E. F., Shevchenko K. E. Isolation and identification of lactic acid bacteria for fermented milk products. *Polzunovskiy vestnik*, 2019, no. 2, pp. 46–50 (in Russian). <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2019.02.009>
12. Gracheva I. V., Osin A. V., Kutyrev V. V. Principles of formation of collection funds of microorganism strains. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2021, no. 2, pp. 16–23 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-16-23>
13. Volkova R. A., Skolotneva E. S., Elbert E. V., Mytsa E. D., Davydov D. S., Movsesyants A. A., Merkulov V. A., Bondarev V. P., Borisevich I. V. Genotyping problems of microorganisms. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2016, vol. 16, no. 3, pp. 139–144 (in Russian).
14. Yoon J. H., Kim J. Y., Yoo J. H., Lee S. Y. Development of a selective medium for the enumeration of lactic acid bacteria and bifidobacteria in food products. *Food Science and Biotechnology*, 2023, vol. 32, no. 5, pp. 713–721. <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01202-z>
15. Alegría Á., Delgado S., Flórez A. B., Mayo B. Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc* spp. strains from traditional, starter-free cheeses. *Dairy Science and Technology*, 2013, vol. 93, no. 6, pp. 657–673. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0128-3>
16. Kaur J., Lee S., Sharma A., Park Y.-S. DNA profiling of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from fermented food and farm produce in Korea by repetitive-element PCR. *Food Science and Biotechnology*, 2017, vol. 26, no. 6, pp. 1667–1673. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0189-9>
17. Slizen V. V., Tsyrukunova Z. F., Gudkova E. I., Glaz O. C. Genetic typing of salmonella Enterica by ERIC and RAPD PCR. *Meditsinskii zhurnal = Medical Journal*, 2014, no. 3 (49), pp. 93–97 (in Russian).
18. Lee H. J., Park S. Y., Kim J. Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, vol. 193, no. 2, pp. 243–247. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09431.x>
19. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, 1994, vol. 10, no. 5, pp. 569–570. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/10.5.569>

Информация об авторах

Бирюк Елена Николаевна – кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических исследований и коллекции промышленных микроорганизмов отдела биотехнологий, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (Партизанский пр., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: biohimbel@yandex.by

Жабанос Наталья Константиновна – кандидат технических наук, доцент, заведующий отделом биотехнологий, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (Партизанский пр., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nzhabanos@gmail.com

Соглаева Алла Анатольевна, старший научный сотрудник лаборатории микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических исследований и коллекции промышленных микроорганизмов отдела биотехнологий, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (пр-т Партизанский, 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: soglaevaalla@gmail.com

Савельева Тамара Александровна – кандидат ветеринарных наук, доцент, ученый секретарь, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (Партизанский пр., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tams-11@mail.ru

Корягина Дарья Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических исследований и коллекции промышленных микроорганизмов отдела биотехнологий, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (пр-т Партизанский, 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: koryagina.darya06@gmail.com

Information about the authors

Alena N. Biruk – Ph. D. (Agriculture), Head of the Laboratory of Microbiological, Molecular Genetic and Biochemical Research and the Collection of Industrial Microorganisms of the Department of Biotechnologies, Institute for the Meat and Dairy Industry, National Academy of Sciences of Belarus (172, Partizanskiy Av., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: biohimbel@yandex.by

Natallia K. Zhabanos – Ph. D. (Engineering), Head of the Department of Biotechnologies, Institute for the Meat and Dairy Industry, National Academy of Sciences of Belarus (172, Partizanskiy Av., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nzhabanos@gmail.com

Alla A. Soglaeva – Senior Researcher of the Laboratory of Microbiological, Molecular Genetic and Biochemical Research and the Collection of Industrial Microorganisms of the Department of Biotechnologies, Institute for the Meat and Dairy Industry, National Academy of Sciences of Belarus (172, Partizanskiy Av., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: soglaevaalla@gmail.com

Tamara A. Savelyeva – Ph. D. (Veterinary), Associate Professor, Academic Secretary, Institute for the Meat and Dairy Industry, National Academy of Sciences of Belarus (172, Partizanskiy Av., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tams-11@mail.ru

Darya S. Karahina – Junior Researcher of the Laboratory of Microbiological, Molecular Genetic and Biochemical Research and the Collection of Industrial Microorganisms of the Department of Biotechnologies, Institute for the Meat and Dairy Industry, National Academy of Sciences of Belarus (172, Partizanskiy Av., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: koryagina.darya06@gmail.com