

УДК 579.67

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ОБРАЗОВАНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ФЕРМЕНТАЦИИ КОРОВЬЕГО МОЛОКА ПРОБИОТИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ

Lactocaseibacillus paracasei

© 2023 г. К. В. Моисеенко¹, А. В. Шаббаев¹, О. А. Глазунова¹, О. С. Савинова¹, Т. В. Федорова^{1, *}

¹ Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 09.04.2023 г.

После доработки 20.04.2023 г.

Принята к публикации 29.04.2023 г.

Проведен сравнительный анализ профиля жирных кислот (ЖК) и летучих органических соединений (ЛОС) коровьего обезжиренного молока, ферментированного четырьмя различными пробиотическими штаммами *Lactocaseibacillus paracasei* (ABK, KF1, MA2 и MA3). Анализ профилей ЖК и ЛОС проводили с использованием ГХ-МС. Для дополнительной характеристики изменений запаха и его выраженности в образцах ферментированного *L. paracasei* молока использовали анализатор запахов E-nose “электронный нос”. Суммарно во всех образцах было обнаружено 42 различных ЖК, из которых 17 были насыщенными, 8 – мононенасыщенными и 5 – полиненасыщенными ЖК. Различия между исследованными образцами носили штамм-специфичный характер и не могли быть объяснены лишь варьированием вклада нескольких отдельно взятых ЖК. Рассчитанные на основе состава ЖК индексы, характеризующие пищевую и биологическую ценность образцов, отличались для молока, ферментированного различными штаммами. Анализ ЛОС показал, что основными формирующими запах соединениями в исследованных образцах были ЖК и продукты их метаболизма – 2-гептанон, 2-нонанон и 2-нонанол, которые образовывались в результате превращений: β -окисление $\rightarrow$ $\rightarrow$ декарбоксилирование $\rightarrow$ восстановление. Аромат продуктов ферментации *L. paracasei*, предсказанный на основе запахов индивидуальных ЛОС, в целом, совпадал с описанным при органолептической оценке, как типичный для сквашенного молока (йогурт, простокваша) аромат с цветочно-фруктовыми нотками.

Ключевые слова: *Lactocaseibacillus paracasei*, коровье молоко, ферментация, ГХ-МС, “электронный нос”, жирные кислоты, летучие органические соединения

DOI: 10.31857/S0555109923050136, **EDN:** NRGPVU

На территории Российской Федерации и стран СНГ кисломолочные продукты такие, как кефир, ряженка, йогурт и простокваша, традиционно пользуются большой популярностью. Спрос на эти продукты исторически обусловлен их высокой питательной ценностью, приятными органолептическими характеристиками и долгими сроками хранения. Более того, систематическое употребление этих продуктов снижает риск возникновения различных заболеваний и способствует сохранению и улучшению состояния здоровья [1].

В настоящее время продукты, которые помимо их питательной ценности так же обладают различными оздоравливающими эффектами (антигипертензивные, гипохолестеринемические и иммуномодулирующие) принято называть “функциональными” [2]. Сегодня рынок функциональных

продуктов более чем наполовину представлен кисломолочными продуктами [3]. Функциональные свойства этих продуктов прежде всего обусловлены заквасочными культурами, используемыми для их изготовления [4]. В процессе ферментации в результате протеолиза, гликолиза и липолиза соответственно белков, жиров и углеводов молока, при участии ферментов заквасочных культур образуется ряд летучих и нелетучих соединений, включая органические кислоты, пептиды, аминокислоты и другие низкомолекулярные соединения [5]. Образование этих соединений приводит к повышению кислотности, формированию уникального вкуса и аромата, а также изменению питательных и функциональных свойств ферментированного продукта [6].

Возрастающий спрос на функциональные продукты питания вызвал повышенный интерес к изменению состава традиционных и созданию принципиально новых заквасок [7–9]. Так в состав заквасок наряду со стартерными (техническими) культурами молочнокислых бактерий (МКБ) включают различные микроорганизмы с пробиотическими свойствами, способные оказывать благотворное влияние на функционирование как всего организма, так и отдельных его систем [10].

Одной из наиболее перспективных лактобактерий, способной существенно повысить функциональный потенциал получаемого кисломолочного продукта, является *Lacticaseibacillus paracasei* (ранее *Lactobacillus paracasei*) [11]. На сегодняшний день ряд выделенных штаммов *L. paracasei* уже используются как в качестве пробиотиков, так и в качестве дополнительных штаммов в традиционных йогуртовых заквасках: *L. paracasei* DG (*L. paracasei* CNCM I-1572) используется в качестве моноштаммового пробиотика в пищевой добавке Enterolactis итальянской компании SOFAR; *L. paracasei* F19 от Chr. Hansen используется как часть закваски в популярном скандинавском йогурте от компании Arla Foods; *L. paracasei* Shirota используется как моноштаммовая закваска для приготовления японского подслащенного пробиотического молочного напитка Yakult компании Yakult Honsha.

Несмотря на то, что в настоящее время известно более 300 штаммов *L. paracasei* с секвенированными геномами [12], поиск новых перспективных штаммов *L. paracasei* продолжается. Ранее в работе Моисеенко с соавт. [13] были охарактеризованы штаммы *L. paracasei* KF1, ABK, выделенные из кефирных грибков, и штаммы *L. paracasei* MA2 и MA3, выделенные из традиционного Южно-Африканского безалкогольного напитка на основе кукурузы, махеву. Также был проведен сравнительный анализ секвенированных геномов данных четырех штаммов и исследован ряд их пробиотических и функциональных свойств таких, как антагонистическая активность в отношении распространенных патогенных микроорганизмов и способность синтезировать в процессе ферментации коровьего молока биоактивные пептиды с антиоксидантными и антигипертензивными свойствами [13].

Целью настоящей работы было исследование изменения профиля жирных кислот (ЖК) и образование летучих органических соединений (ЛОС) при ферментации коровьего молока пробиотическими штаммами *L. paracasei* KF1, ABK, MA2 и MA3. Знания о составе ЖК и ЛОС для молока, ферментированного различными штаммами *L. paracasei*, в совокупности со знанием генетических особенностей, определяющих метаболический потенциал каждого из штаммов, формируют научную базу для дальнейшего их использования при созда-

нии новых функциональных пре- и пробиотических субстанций.

МЕТОДИКА

Штаммы и условия культивирования. Штаммы лактобактерий *L. paracasei* ABK, *L. paracasei* KF1, *L. paracasei* MA2 и *L. paracasei* MA3 были получены из Коллекции Всероссийского научно-исследовательского Института молочной промышленности (ВНИМИ, Москва, Россия), где их хранили при температуре -80°C в обезжиренном молоке, содержащем 10% (об./об.) глицерина. Штаммы *L. paracasei* ABK и *L. paracasei* KF1 были выделены из кефирного грибка [14], штаммы *L. paracasei* MA2 и *L. paracasei* MA3 из махеву – традиционного безалкогольного напитка в Южно-Африканской Республике, получаемого путем ферментации кукурузной муки [15]. Для всех штаммов последовательности генов 16S рПНК были депонированы в GeneBank: *L. paracasei* MA2 под номером MW558121.1, *L. paracasei* ABK – MN994625.1, *L. paracasei* MA3 – MW558122.1 и *L. paracasei* KF1 – MW558119.1. Также геномы всех штаммов были отсеквенированы и депонированы в GeneBank [13]: *L. paracasei* MA2 под номером GCA_018966985.1, *L. paracasei* ABK – GCA_018967025.1, *L. paracasei* MA3 – GCA_023470655.1 и *L. paracasei* KF1 – GCA_023470645.1.

Для культивирования лактобактерий использовали восстановленное (120 г на 1 л воды) обезжиренное коровье молоко (ОАО “Слуцкий сыродельный комбинат”, Республика Беларусь) после автоклавирования (1 атм., 10 мин).

Ферментированные образцы получали внесением в стерилизованное обезжиренное коровье молоко 3% инокулята *L. paracasei* каждого штамма с последующей инкубацией в течение 48 ч при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. По окончании ферментации концентрация лактобактерий в каждом образце составляла в среднем (8.8 ± 0.1) lg КОЕ/мл.

По окончании ферментации проводили органолептическую оценку образцов с участием восьми экспертов, знакомых с продуктом. Образцы оценивали по консистенции, аромату, вкусу, горечи, цвету и общей приемлемости.

Профиль жирных кислот ферментированного молока. Экстракцию ЖК из образцов ферментированного молока проводили по методу Фолча. После экстракции ЖК были дериватизированы с использованием 3 М метанольного раствора HCl (“Supelco”, США) в соответствии с протоколом производителя. Производные ЖК разделяли на хроматографе GC 2010 (“Shimadzu”, Япония) с колонкой MDN-5 (30 м $\times$ 0.25 мм; “Thermo Scientific”, США) и анализировали с на масс-детекторе GCMS-QP 2010 в режиме температурного градиента. В качестве стандарта использовали набор

ПНЖК-2 (“Supelco”, США). Идентификацию ЖК проводили, как описано в работе Моисеенко с соавт. [15]. Относительные интенсивности (далее относительные содержания) ЖК получали нормированием на общую интенсивность припи-

сываемых пиков. Все эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Оценку показателей качества жиров кисломолочных продуктов проводили с использованием следующих индексов, которые рассчитывали в соответствии с Чен с соавт. [16]:

$$\begin{aligned} \text{ПНЖК/НЖК} &= \Sigma \text{ПНЖК} / \Sigma \text{НЖК}; \\ \text{IA} &= [\text{C12:0} + (4 \times \text{C14:0}) + \text{C16:0}] / [\Sigma \text{МНЖК} + \Sigma \text{ПНЖК}]; \\ \text{HPI} &= [\Sigma \text{МНЖК} + \Sigma \text{ПНЖК}] / [\text{C12:0} + (4 \times \text{C14:0}) + \text{C16:0}]; \\ \text{IT} &= [\text{C14:0} + \text{C16:0} + \text{C18:0}] / [0.5(\Sigma \text{МНЖК} + \Sigma \text{ПНЖК}\{n-6\})]; \\ \text{НН} &= [\text{C18:1} + \Sigma \text{ПНЖК}] / [\text{C12:0} + \text{C14:0} + \text{C16:0}]; \\ \text{UI} &= 1(\% \text{monoenoics}) + 2(\% \text{dienoics}) + 3(\% \text{trienoics}) + 4(\% \text{tetraenoics}), \end{aligned}$$

где НЖК — насыщенные жирные кислоты; МНЖК — моновенасыщенные жирные кислоты; ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты; IA — индекс атерогенности; HPI — индекс здоровья (является обратным IA и используется в основном в исследованиях молочных продуктов); IT — индекс тромбогенности; НН — соотношение между гипохолестеринемическими и гиперхолестеринемическими жирными кислотами; UI — индекс ненасыщенности.

Анализ запаха и его интенсивности на приборе “электронный нос”. Для проведения мультисенсорных исследований запаха ферментированного разными штаммами *L. paracasei* коровьего молока на приборе “VOCmeter” (“AppliedSensor”, Германия), из каждого анализируемого образца после его перемешивания отбирали по три пробы массой 3 г и помещали в специальные стеклянные вials, которые затем плотно закрывали и термостатировали при температуре 60°C. Далее в вials вводилась игла для автоматического отбора анализируемого газа, который поступал в прибор “VOCmeter”. Анализ полученных откликов металлоксидных сенсоров (MOS 1–4) прибора проводили с использованием специальной программы “Argus”.

Анализ летучих органических соединений методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Для анализа ЛОС были объединены эквивалентные объемы молока, заквашенного с помощью *L. paracasei* KF1, *L. paracasei* ABK, *L. paracasei* MA2 и *L. paracasei* MA3. Летучие соединения экстрагировали методом твердофазной микроэкстракции с применением картриджей SPME Fiber Assembly Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB) (“Supelco”, США). Экстрагированные ЛОС анализировали на газовом хроматографе GS 2010 (“Shimadzu”, Япония) с колонкой Optima-1 (25 м × 0.25 мм, “Supelco”, США), непосредственно подключенному к масс-спектрометру GCMS-QP 2010 (“Shimadzu”, Япония). Перед анализом колон-

ка была откалибрована по стандартам индекса удерживания (“Sigma” США) алифатических углеводородов C8 и C32. Обнаружение массы проводилось в режиме регистрации ТИС в диапазоне масс (*m/z*) от 45 до 450. Относительные интенсивности (далее относительное содержание) ЛОС были получены нормированием на общую интенсивность идентифицированных пиков. Летучие соединения идентифицировали путем сравнения их экспериментальных спектров со спектрами Национального института стандартов и технологий (база данных масс-спектров NIST/EPA/NIH, NIST 11). Только отнесения пиков с достоверностью идентификации ≥90% считались надежными. Данные об ароматах отдельных соединений были извлечены из базы FlavorDB [17].

Статистический и биоинформационный анализ. Все статистические сравнения выполнялись с использованием подхода однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и применением *F*-критерия Фишера. При обнаружении значимого (*p* < 0.05) значения *F*-статистики попарные различия между средними оценивали с помощью теста множественных сравнений, применяя критерий Тьюки (HSD тест Тьюки) (*p* < 0.05).

Анализ главных компонент (англ. Principal Components Analysis, PCA) проводился на нормализованных *z*-масштабированных данных. Для иерархической кластеризации тепловой карты в качестве меры близости использовалось корреляционное расстояние, а кластеризация проводилась методом *k*-средних.

Для поиска генов, кодирующих ферменты метаболических путей, использовали как аннотацию геномов, ранее полученную [13] с помощью программы Anvi'o [18, 19], так и аннотацию, полученную в ходе выполнения данной работы с помощью программы eggNOG-mapper v2 [20]. Визуальный анализ полноты того или иного метаболического пути проводили с помощью программы KEGG Mapper [21].

Таблица 1. Соотношение различных ЖК в образцах молока, ферментированного исследуемыми штаммами *L. paracasei*

Категории	Штамм <i>L. paracasei</i>				
	Молоко	МА2	АВК	МА3	KF1
	Вклад, %*				
Насыщенные ЖК	56	58	57	60	63
Короткоцепочечные ЖК	6	6	5	4	8
Мононенасыщенные ЖК	30	29	27	28	20
Полиненасыщенные ЖК	10	9	13	7	6
Разветвленные ЖК	3	2	Н.о.**	4	Н.о.
2-гидрокси-разветвленные ЖК	Н.о.	0.8	0.6	0.1	7.3
Окисленные ЖК	1.2	1.1	2.2	Н.о.	3.4

* Предел погрешности не превышал единицы последней значащей цифры.

** Н.о. — не обнаружено.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Профиль жирных кислот ферментированного молока. В результате анализа состава ЖК, во всех исследованных образцах было обнаружено 42 различные ЖК, большая часть которых относилась к насыщенным (17 соединений) и ненасыщенным (8 соединений) мононенасыщенным и 5 — полиненасыщенным (рис. 1). Соотношения различных ЖК в образцах представлены в табл. 1. Содержание насыщенных ЖК в молоке, ферментированном штаммами *L. paracasei* АВК и МА2, статистически значимо не отличалось от такового в не ферментированном молоке (57%), а в молоке, ферментированном штаммами *L. paracasei* KF1 и МА3 — значимо увеличивалась (до 60 и 63%, соответственно). Содержание мононенасыщенных ЖК в молоке, ферментированном штаммами *L. paracasei* МА2 и МА3 было таким же, как в не ферментированном в молоке (30%), а в молоке, ферментированном штаммами *L. paracasei* АВК и KF1 — значимо уменьшалась (до 27 и 20%, соответственно). Содержание полиненасыщенных ЖК в молоке, ферментированном штаммом *L. paracasei* МА2, было таким же, как в неферментированном молоке (10%); в молоке, ферментированном штаммом АВК — увеличивалось до 13%; в молоке, ферментированном штаммами *L. paracasei* KF1 и МА3 — уменьшалось до 7%. Изменение содержания свободных ЖК в ходе ферментации молока с одной стороны может быть связано с процессами липолиза молочного жира, а с другой — с биосинтезом ЖК лактобациллами *de novo*. Ранее в работе Моисеенко с соавт. [13] было показано, что все 4 штамма *L. paracasei* в тестах API ZYM проявляли С4-эстеразную и С8-липазную/эстеразную активность, что в свою очередь могло приводить к гидролизу триглицеридов молочного жира с высвобождением преимущественно короткоцепочечных (С4:0–С10:0) ЖК

[22]. Причем штаммы из кефирного грибка АВК и KF1 имели более высокую эстеролитическую активность *in vitro*. С другой стороны, анализ геномов *L. paracasei* показал наличие генов, кодирующих белки FabD, FabF, FabG, FabZ, FabK и др., которые участвуют в синтезе алифатических карбоновых кислот с числом углеродных атомов от 6 до 18, в частности капроновой (гексановой С6:0), каприловой (октановой С8:0), каприновой (декановой С10:0), лауриновой (додекановой С12:0), миристиновой (тетрадекановой С14:0), пальмитиновой (гексадекановой С16:0), стеариновой (октадекановой С18:0).

Также в образцах ферментированного молока было обнаружено от 1 до 4% разветвленных ЖК (9 соединений) и от 0.1 до 7% 2-гидрокси-разветвленных ЖК (ВСНА, branched chain hydroxy acids). Среди 2-гидрокси-разветвленных ЖК были идентифицированы 2 соединения, такие как 2-гидрокси-3-метилпентановая кислота (или 2-гидрокси-3-метилвалериановая, **HMVA**) и 2-гидрокси-4-метилпентановая кислота (или 2-гидрокси-4-метилвалериановая, или лейциновая кислота, **HICA**), которые образуются в результате метаболизма разветвленных аминокислот L-изолейцина и L-лейцина в клетках МКБ: аминокислота → α-кето-кислота → → 2-гидрокси-кислота [23]. Биоинформационный анализ показал наличие в геномах всех 4 штаммов *L. paracasei* гена *ilvE*, кодирующего аминотрансферазу разветвленных аминокислот (**BCAT**, branched-chain aminotransferase, КФ 2.6.1.42) и различные гены, кодирующие D-специфичные дегидрогеназы 2-гидрокси-кислот (**2HADHs**, D-2-hydroxyacid dehydrogenases, КФ 1.1.1.-) — 4 гена у штамма KF1 и 5 у АВК, МА2 и МА3. **BCAT** осуществляет трансминирование L-изолейцина и L-лейцина с образованием 2-кето-3-метилвалерата (или 3-метил-2-оксвалерата) и 2-кето-4-метилвалерата (или 4-метил-2-оксвалерата) соответственно,

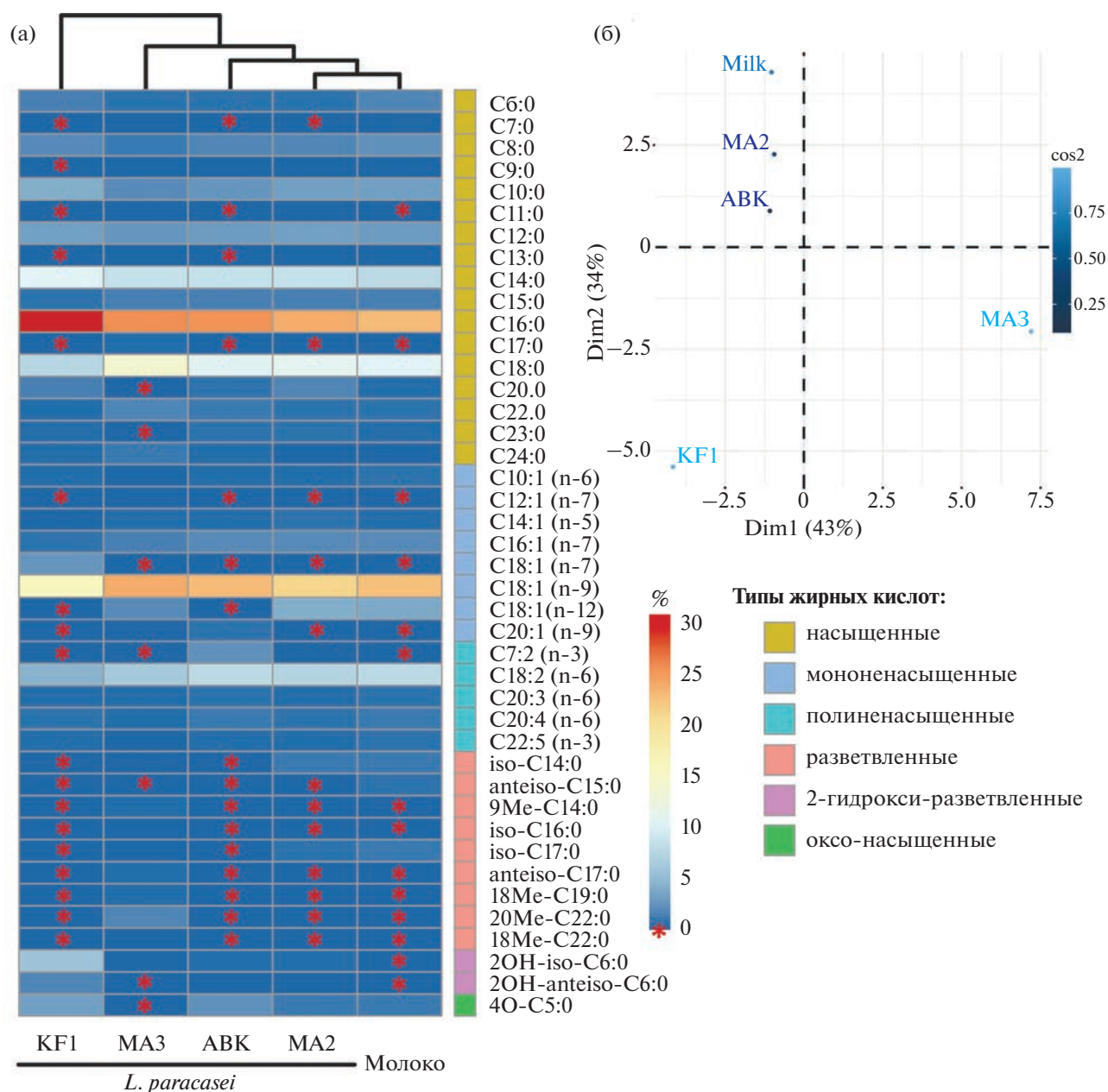


Рис. 1. Сравнение профилей ЖК в образцах молока, ферментированного исследуемыми штаммами *L. paracasei*: а – иерархически кластеризованная тепловая карта; б – диаграмма рассеяния в пространстве выделенных двух главных компонент (Dim1 и Dim2). Проценты объясненной дисперсии, показывающие долю общего разброса точек, приходящуюся на каждую из главных компонент, указаны в скобках. Величины квадратов косинусов углов между векторами индивидов и плоскостью главных компонент показаны цветом.

дальнейшее восстановление которых до 2-гидроксикислот происходит при участии оксидоредуктаз (2HADHs) [24, 25]. Недавно в *in vivo* экспериментах на моделях сахарного диабета 2 типа и диет-индуцированного метаболического синдрома было показано, что гипогликемический и гиполипидемический эффекты при приеме йогуртов обусловлены наличием в них ВСНА (таких как НИСА, НМВА и 2-гидроксиизовалериановая

кислота НИВА), которые регулируют углеводный и липидный обмен в гепатоцитах и миоцитах лабораторных животных [26]. Авторы показали, что данные метаболиты, являясь продуктами биосинтетической активности заквасочных йогуртовых культур, отсутствовали в не ферментированном молоке. В настоящей работе также были обнаружены НИСА и НМВА только в ферментированном молоке, при этом их относительное содержание

сильно варьировало в зависимости от штамма *L. paracasei*. Самое высокое было отмечено для *L. paracasei* KF1 (табл. 1, рис. 1).

Группа окисленных ЖК была представлена только 4-оксо-пентановой (левулиновой) кислотой, содержание которой доходило до 3%. 4/5-оксо-карбоновые кислоты, возможно, могут образовываться в результате восстановления соответствующих 4/5-гидроксикислот, которые в свою очередь образуются в результате окисления свободных жирных кислот, высвобождаемых в процессе гидролиза молочного жира.

Дополнительно стоит выделить группу короткоцепочечных ЖК (C4:0–C10:0), относящихся к ненасыщенным ЖК, которые обладают особо выраженным положительным воздействием на здоровье человека: нормализуют уровень липидов и глюкозы в крови, купируют воспалительные процессы и ингибируют пролиферацию опухолевых клеток [27, 28]. Содержание короткоцепочечных ЖК в ферментированном штаммами *L. paracasei* МА2 и АВК молоке было таким же как в неферментированном (6%). В молоке, ферментированном штаммом *L. paracasei* МА3 уменьшалось до 4%, а в молоке, ферментированном штаммом KF1, напротив, увеличивалась до 8%.

Во всех исследованных образцах наблюдалось доминирование пяти ЖК (рис. 1) – пальмитиновой (C16:0), олеиновой (C18:1 (n-9)), стеариновой (C18:0), миристиновой (14:0) и линолевой (C18:2 (n-6)). Вклад пальмитиновой кислоты составлял от 23 до 31%, олеиновой – от 16 до 24%, стеариновой – от 7 до 14%, миристиновая – от 8 до 11% и линолевой – от 4 до 8%. Вклад остальных ЖК варьировал от 0.02 до 3.5% (в среднем – 0.7%). Среди короткоцепочечных ЖК (C4:0–C10:0) преобладали декановая (C10:0; 2–4%) и октановая (C8:0; 1–2%) кислоты, а суммарное количество короткоцепочечных ЖК составляло от 4 до 8%.

В целом полученные данные по ЖК составу исходного молока и молока, ферментированного различными штаммами *L. paracasei* находятся в пределах значений, ранее опубликованных для коровьего молока и кисломолочных продуктов. Во многих работах было показано, что из более чем 400 различных ЖК, входящих в состав триацилглицеридов молочного жира, почти все присутствуют в следовых количествах, и только около 15 кислот присутствуют на уровне 1% или выше [29]. Обычно, примерно 70% всех ЖК коровьего молока приходится на насыщенные ЖК, при этом на долю пальмитиновой, стеариновой и миристиновой кислот приходится около 30, 12 и 11% соответственно. Примерно 11% приходится на короткоцепочечные ЖК. Приблизительно 25% ЖК в молоке являются мононенасыщенными, при этом доля олеиновой кислоты (18 : 1) составляет около 24%. Полиненасыщенные жирные кисло-

ты составляют ~2% от общего количества жирных кислот [30–32].

На данный момент опубликовано лишь небольшое количество работ об изменениях состава ЖК молока в процессе его ферментации чистыми культурами МКБ, при этом данные, приводимые в этих работах, весьма противоречивы. Так в работе Соломон с соавт. [33] было показано, что ферментация сливок восемью чистыми культурами широко используемыми в промышленности МКБ, существенно не изменяла состав их ЖК. В то же время, в работе Йылмаз-Эрсан с соавт. [34] было показано, что чистые культуры трех пробиотических МКБ увеличивали содержание среднецепочечных и полиненасыщенных ЖК в ферментированных сливках. В работе Экинчи с соавт. [35] при ферментации сливок шестью пробиотическими МКБ было показано, что содержание короткоцепочечных ЖК существенно изменялось в зависимости от используемого микроорганизма, а концентрации длинноцепочечных ЖК оставались неизменными. Напротив, в работе Бао с соавт. [36] показали значительное увеличение длинноцепочечных ЖК и неизменность содержания короткоцепочечных при ферментации молока *Lactobacillus casei*. Также стоит отметить, что сравнительные исследования изменения ЖК состава молока при его сбраживании различными штаммами одного вида МКБ практически отсутствовали.

Сравнение полученных профилей ЖК для исходного молока и молока, ферментированного четырьмя различными штаммами *L. paracasei* представлено в виде тепловой карты с иерархической кластеризацией и диаграммы рассеяния в пространстве выделенных двух главных компонент рис. 1. В целом в процессе ферментации штаммы *L. paracasei* KF1 и *L. paracasei* МА3 изменяли состав ЖК молока сильнее, чем штаммы АВК и МА2. При этом за наблюдаемое распределение точек в пространстве главных компонент были в равной степени ответственны 26 из 42 обнаруженных ЖК, каждая из которых вносила примерно равный вклад (от 2.5 до 3%) в две выделенные главные компоненты, в сумме объясняющие 77% всей вариации между образцами. Таким образом, различия между исследованными образцами носят комплексный штамм-специфичный характер и не могут быть объяснены лишь изменением вклада нескольких ЖК.

Для комплексной оценки полученных ферментированных продуктов был рассчитан ряд индексов, основанных на соотношении определенных насыщенных и ненасыщенных ЖК и характеризующих качество липидов жировой фазы (табл. 2). Так, например, ІА отражает вероятность развития атеросклероза при постоянном употреблении анализируемого образца [37], ІТ – вероятность

Таблица 2. Расчетные индексы, характеризующих качество липидов жировой фазы в образцах молока, ферментированного исследуемыми штаммами *L. paracasei*

Индекс*	Быстрая интерпретация	Штамм <i>L. paracasei</i>				
		молоко	MA2	ABK	MA3	KF1
ПНЖК/НЖК	“чем выше, тем лучше”	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
IA	“чем ниже, тем лучше”	1.4	1.6	1.6	1.8	2.9
НPI	“чем выше, тем лучше”	0.7	0.6	0.6	0.6	0.3
IT	“чем ниже, тем лучше”	1.9	2.1	1.6	2.6	3.5
НН	“чем выше, тем лучше”	1.0	0.8	1.0	0.8	0.5
UI	“чем выше, тем лучше”	55	51	57	45	35

* Предел погрешности в значениях индексов не превышал двух единиц последней значащей цифры.

развития тромбоза [37], а НН – вероятность развития гиперхолестеринемии [38]. В целом все рассчитанные индексы показывали, что ферментация молока штаммами *L. paracasei* ABK и MA2 значительно не влияла на риски возникновения заболеваний сердечно-сосудистой системы, связанных с его постоянным потреблением. В тоже время для молока, ферментированного штаммами *L. paracasei* KF1 и MA3 все индексы были несколько хуже, чем для исходного молока. В целом, рассчитанные индексы находились в диапазоне, ранее установленном для различных кисломолочных продуктов, таких как йогурт, кефир, ряженка и амаси [15, 16].

Анализ летучих органических соединений на приборе “электронный нос”. Мультисенсорный анализ летучей фазы образцов молочных продуктов, ферментированных исследуемыми штаммами *L. paracasei*, представлен на рис. 2. Вид “визуальных отпечатков” запаха, построенных по отклику четырех сенсоров, детектирующих общее

наличие альдегидов, низкомолекулярных азотсодержащих соединений, свободных аминокислот и кетонов, совпадал для всех исследованных образцов (на рис. 2а – одинаковые по форме, но имеющие разные размеры четырехугольники). На основании рассчитанных площадей “визуальных отпечатков” запаха (рис. 2б) можно заключить, что наиболее выраженным запахом характеризовался образец молока, ферментированного штаммом *L. paracasei* ABK. Остальные образцы имели примерно одинаковые площади “визуальных отпечатков”, которые были в среднем на 33% меньше таковой для образца ABK.

Анализ летучих органических соединений методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Для уточнения информации, полученной с применением системы “электронный нос”, был проведен ГХ-МС анализ профиля ЛОС объединенных образцов молока, ферментированного исследуемыми штаммами *L. paracasei* (табл. 3). В целом данные ГХ-МС не противоречили данным,

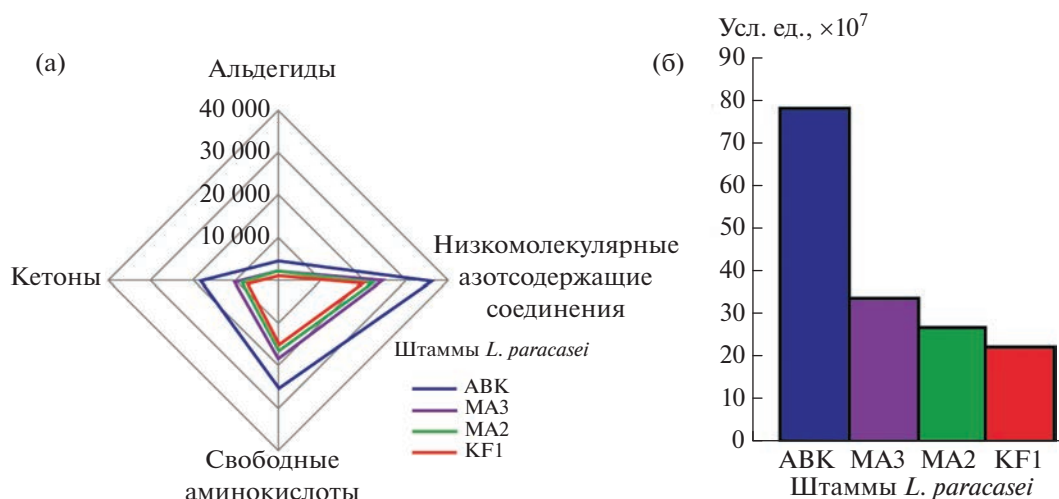


Рис. 2. Анализ профиля ЛОС на приборе “электронный нос”; а – визуальные “отпечатки запаха”, усл. ед.; б – площади визуальных “отпечатков запаха” (усл. ед. × 10⁷).

Таблица 3. ГХ-МС-анализ профиля ЛОС объединенных образцов молока, ферментированного исследуемыми штаммами *L. paracasei*

Название	PubChem ID	Относительная интенсивность, %*	Запах
Жирные кислоты			
Декановая (каприновая)	2969	34	Цитрусовый с жирной нотой
Гексановая (капроновая)	8892	17	Типичный “козий”
Октановая (каприловая)	379	12	Слегка неприятный кисловато-фруктовый
Гексадекановая (пальмитиновая)	985	7	Практически отсутствует
Всего:		70	
Вторичные спирты			
Изопропанол	3776	9	Неприятный, резкий, напоминающий ацетон
2-нонанол	12367	4	Цветочный, фруктовый с оттенками розы и апельсина
Всего:		13	
Метилкетоны			
2-гептанон	8051	6	Бананово-фруктовый
2-нонанон	13187	4	Фруктово-цветочный
Всего:		10	
Аминокислоты			
Треонин	6288	7	Практически отсутствует
Всего:		7	

* Предел погрешности не превышал единицы последней значащей цифры.

полученным с помощью системы “электронный нос”, но при этом давали более детальное представление о составе ЛОС исследуемых образцов. Так показано, что профиль ЛОС представлен в основном такими группами соединений как жирные кислоты (69%), вторичные спирты (13%) и метилкетоны (11%). Среди ЖК были детектированы пальмитиновая (C16:0), каприновая (C10:1), каприловая (C8:0) и капроновая (C6:0), среди группы вторичных спиртов – изопропанол и 2-нонанол, а среди группы метилкетонов – 2-гептанон и 2-нонанон. Также среди ЛОС объединенной пробы было обнаружено присутствие 7% аминокислоты треонин.

Исходя из ранее опубликованных данных [17], все детектированные ЛОС, кроме пальмитиновой кислоты и треонина, обладали ярко выраженными индивидуальными запахами (табл. 3). При этом аромат продуктов ферментации, предсказанный на основе запахов индивидуальных ЛОС, в целом, совпадал с описываемым участниками органолептической оценки и являлся типичным для сквашенного молока (йогурт, простокваша) свежим ароматом с цветочно-фруктовыми нотка-

ми. Хотя пальмитиновая кислота и треонин не обладают ярко выраженными запахами они также существенно влияют на органолептические свойства продукта [17]. Пальмитиновая кислота придает сквашенному молоку “маслянистость”, а треонин – сладковатый привкус. Обе эти характеристики также отмечались участниками в ходе проведения органолептической оценки.

Предшественниками ЛОС в кисломолочных продуктах в основном являются ЖК, углеводы и аминокислоты, как присутствующие в исходном молоке, так и образующиеся в процессе его ферментации заквасочными культурами МКБ [39]. Как показало исследование при использовании штаммов *L. paracasei* для ферментации коровьего молока основным источником ЛОС были насыщенные ЖК и продукты их окислительно-восстановительных превращений – метилкетоны и вторичные спирты [40]. Считается, что для *Lactobacillus* spp. большинство биохимических реакций с участием ЖК молока происходят внутриклеточно. В клетку ЖК попадают либо напрямую через специфические транспортные системы, либо опосредовано в составе жиров, расщепляемых

внутриклеточными липазами и эстеразами [41]. Внутри клетки насыщенные ЖК вступают в реакцию β -окисления с образованием β -кетокислот, в результате декарбоксилирования которых образуются соответствующие метилкетоны [5]. Образованные метилкетоны могут далее восстанавливаться до вторичных спиртов. Как образующиеся внутри клетки ЖК, так и метилкетоны со вторичными спиртами могут в дальнейшем попадать во внеклеточное пространство либо путем диффузии, либо с участием пока еще не установленных транспортных систем [42]. В табл. 3 можно выделить две группы веществ, связанных друг с другом вышеописанными биохимическими реакциями:

каприновая кислота $\rightarrow$ 2-нонанон $\rightarrow$ 2-нонанол;
октановая кислота $\rightarrow$ 2-гептанон.

Изопропанол может также быть продуктом β -окисления $\rightarrow$ декарбоксилирования $\rightarrow$ восстановления бутановой (масляной) кислоты.

Необходимо отметить, что *L. paracasei* относится к факультативно гетероферментативным МКБ [43] и может при выращивании на углеводах дополнительно к лактату (молочной кислоте) синтезировать такие ЛОС, как ацетат (уксусная кислота), ацетоин, ацетальдегид и/или этанол [5]. Более того в ранее секвенированных геномах каждого из исследуемых штаммов обнаружен полный набор ферментов для осуществления гетероферментативного типа брожения [13]. Однако при ферментации коровьего молока все исследованные штаммы *L. paracasei* не синтезировали детектируемых количеств вышеперечисленных ЛОС в качестве конечных продуктов брожения молочного сахара лактозы.

Наличие треонина среди ЛОС может косвенно свидетельствовать о повышенном уровне этой аминокислоты в ферментированном молоке. Действительно *in silico* анализ геномов показал способность всех 4 штаммов *L. paracasei* синтезировать *de novo* L-треонин из L-аспартата (KEGG MODULE: M00018 threonine biosynthesis pathway) и наличие 5 генов, кодирующих транспортные системы для выделения треонина из клетки (threonine/serine exporter ThrE family). С другой стороны, у исследуемых штаммов имеется достаточно развитая система протеолитических ферментов, включающая ассоциированные с клеточной стенкой протеиназы prtP и prtB (CER, cell-envelope proteinase), транспортеры олиго-, три- и дипептидов (Opp, DtpT, Dpp) в клетку и внутриклеточные пептидазы (PepC, PepN, PepX, PepD, PepV, PepI, PepQ, PepR, PepP, PepE, PepO, PepF и PepS). При этом, несмотря на то, что внеклеточная протеолитическая система МКБ достаточно хорошо изучена [44–46], все еще остается ряд неразрешенных вопросов, касающихся транспорта аминокислот в клетку и из нее [47]. Также мало изучены регуляторные системы МКБ участвующие в поддержа-

нии баланса между количеством необходимых для роста клеток аминокислот, полученных путем их биосинтеза, и в результате поглощения из окружающей среды [48].

В настоящей работе проведено исследование профиля ЖК коровьего молока, ферментированного штаммами *L. paracasei* KF1, АВК, МА2 и МА3. На основе полученного профиля ЖК для сквашенного молока был рассчитан ряд показателей, связанных с поддержанием нормальной работы сердечно-сосудистой системы организма человека. Кроме того, было проведено исследование спектра ЛОС, образующихся в процессе ферментации коровьего молока исследуемыми штаммами *L. paracasei* и формирующих характерный вкус и аромат получаемого кисломолочного продукта. Сопоставление полученных данных с особенностями геномов каждого из штаммов позволило предположить основные биохимические реакции ответственные за образование ими ЛОС и 2-гидроксиразветвленных ЖК. Таким образом, полученные результаты расширяют знания о биохимическом потенциале различных штаммов *L. paracasei*, что позволит в дальнейшем использовать их при производстве биологически активных пре- и пробиотических субстанций.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ 22-16-00108.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rozhkova I.V., Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Begunova A.V., Fedorova T.V. // De Gruyter. 2020. P. 215–234.
<https://doi.org/10.1515/9783110667462-009>
2. Granato D., Barba F.J., Bursać Kovačević D., Lorenzo J.M., Cruz A.G., Putnik P. // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2020. V. 11. P. 93–118.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
3. Turkmen N., Akal C., Özer B. // J. Funct. Foods. 2019. V. 53. P. 62–75.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.004>
4. Gobbetti M., Cagno R.D., De Angelis M. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2010. V. 50. P. 716–727.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499770>
5. Gänzle M.G. // Curr. Opin. Food Sci. 2015. V. 2. P. 106–117.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
6. Granato D., Branco G.F., Cruz A.G., Faria J. de A.F., Shah N.P. // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2010.

- V. 9. P. 455–470.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>
7. Marshall V.M. // Int. J. Dairy Technol. 1993. V. 46. P. 49–56.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1993.tb00860.x>
8. Bintsis T. // AIMS Microbiol. 2018. V. 4. P. 665–684.
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
9. Marco M.L., Sanders M.E., Gänzle M., Arrieta M.C., Cotter P.D., De Vuyst L. et al. // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2021. V. 18. P. 196–208.
<https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>
10. Zoumpopoulou G., Pot B., Tsakalidou E., Papadimitriou K. // Int. Dairy J. 2017. V. 67. P. 46–60.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.09.010>
11. Jones R.M. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. /Eds. M. Floch, Y. Ringel, W.A. Walker. Elsevier, 2017. P. 99–108.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00009-4>
12. Agarwala R., Barrett T., Beck J., Benson D.A., Bollin C., Bolton E., Bourexis D., Brister J.R., Bryant S.H., Canese K. et al. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. D8–D13.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
13. Moiseenko K.V., Begunova A.V., Savinova O.S., Glazunova O.A., Rozhkova I. V., Fedorova T.V. // Foods. 2023. V. 12. № 1. P. 223.
<https://doi.org/10.3390/foods12010223>
14. Begunova A.V., Savinova O.S., Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Rozhkova I. V., Fedorova T.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. P. 458–467.
<https://doi.org/10.1134/S0003683821040037>
15. Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Ajibade B.O., Ijabadeniyi O.A., Fedorova T.V. // Foods. 2021. V. 10. P. 3082.
<https://doi.org/10.3390/foods10123082>
16. Chen J., Liu H. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V 21. P. 5695.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165695>
17. Garg N., Sethupathy A., Tuwani R., Rakhi N.K., Dokania S., Iyer A. et al. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. D1210–D1216.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx957>
18. Eren A.M., Kiefl E., Shaiber A., Veseli I., Miller S.E., Schechter M.S. et al. // Nat. Microbiol. 2020. V. 6. P. 3–6.
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-00834-3>
19. Delmont T.O., Eren A.M. // Peer J. 2018. V. 6. e4320.
<https://doi.org/10.7717/peerj.4320>
20. Cantalapiedra C.P., Hernández-Plaza A., Letunic I., Bork P., Huerta-Cepas J. // Mol. Biol. Evol. 2021. V. 38. P. 5825–5829.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>
21. Kanehisa M., Sato Y. // Protein Sci. 2020. V. 29. P. 28–35.
<https://doi.org/10.1002/pro.3711>
22. Holland R., Liu S.-Q., Crow V.L., Delabre M.-L., Lubbers M., Bennett M., Norris G. // Int. Dairy J. 2005. V. 15. P. 711–718.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.012>
23. Butel M.-J., Rimbault A., Khelifa N., Champion G., Szylił O., Rocchiccioli F. // FEMS Microbiol. Letters. 1999. V. 132. P. 171–176.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07828.x>
24. Bernard N., Johnsen K., Ferain T., Garmyn D., Hols P., Holbrook J.J., Delcour J. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 224. P. 439–446.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00439.x>
25. Matelska D., Shabalin I.G., Jabłońska J., Domagalski M.J., Kutner J., Ginalska K., Minor W. // BMC Evolutionary Biology. 2018. V. 18. №199.
<https://doi.org/10.1186/s12862-018-1309-8>
26. Daniel N., Nachbar R.T., Tran T.T.T., Ouellette A., Varin T.V., Corillard A. et al. // Nat Commun. 2022. V. 13. Art. № 1343.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-29005-0>
27. Yao Y., Cai X., Fei W., Ye Y., Zhao M., Zheng C. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2022. V. 62. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1854675>
28. Tan J., McKenzie C., Potamitis M., Thorburn A.N., Mackay C.R., Macia L. // Adv. Immunol. 2014. V. 121. P. 91–119.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
29. Jensen R.G. // J. Dairy Sci. 2002. V. 85. P. 295–350.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74079-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4)
30. Shingfield K.J., Bonnet M., Scollan N.D. // Animal. 2013. V. 7. P. 132–162.
<https://doi.org/10.1017/S1751731112001681>
31. Lindmark Mansson H. // Food Nutr. Res. 2008. V. 52. Article № 1821.
<https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1821>
32. Jensen R.G., Newburg D.S. / Handbook of Milk Composition. Academic Press, 1995. P. 543–575.
33. Salamon R.V., Lóki K., Csapó-Kiss Z., Salamon S., Csapó J. // Acta Agric. Slov. 2012. V. 100. P. 323–326.
34. Yilmaz-Ersan L.F. // Mljekarstvo. 2013. V. 63. P. 132–139.
35. Ekinci F.Y., Okur O.D., Ertekin B., Guzel-Seydim Z. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2008. V. 110. P. 216–224.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200700038>
36. Bao Z., Xiong J., Lin W., Ye J. // CyTA J. Food. 2016. V. 14. P. 10–17.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1035673>
37. Ulbricht T.L.V., Southgate D.A.T. // Lancet. 1991. V. 338. P. 985–992.
[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)
38. Santos-Silva J., Bessa R.J., Santos-Silva F. // Livest. Prod. Sci. 2002. V. 77. P. 187–194.
[https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00059-3)
39. Hu Y., Zhang L., Wen R., Chen Q., Kong B. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2022. V. 62. P. 2741–2755.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1858269>
40. Thierry A., Pogačić T., Weber M., Lortal S. / Biotechnology of Lactic Acid Bacteria / Eds. F. Mozzi, R. R. Raya, G. M. Vignolo. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015. P. 314–340.
<https://doi.org/10.1002/9781118868386>
41. Kowalczyk M., Mayo B., Fernández M., Aleksandrzyk-Piekarczyk T. / Biotechnology of Lactic Acid Bacteria / Eds. F. Mozzi, R. R. Raya, G. M. Vignolo. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015. P. 1–24.
<https://doi.org/10.1002/9781118868386>
42. Salvador López J.M., Van Bogaert I.N.A. // Biotechnol. Bioeng. 2021. V. 118. P. 2184–2201.
<https://doi.org/10.1002/bit.27735>

43. Hill D., Sugrue I., Tobin C., Hill C., Stanton C., Ross R.P. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>
44. Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. P. 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
45. Raveschot C., Cudennec B., Coutte F., Flahaut C., Fremont M., Drider D., Dhulster P. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02354>
46. Ji D., Ma J., Xu M., Agyei D. // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2021. V. 20. P. 369–400. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12676>
47. Zafar H., Saier M.H. // Genes (Basel). 2020. V. 11. № 10. 1234. <https://doi.org/10.3390/genes11101234>
48. Liu E., Zheng H., Hao P., Konno T., Yu Y., Kume H., Oda M., Ji Z.-S. // Curr. Microbiol. 2012. V. 65. P. 742–751. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0214-4>

Fatty Acid Profiles Change and the Volatile Organic Compounds Formation During the Cow's Milk Fermentation with Probiotic *Lactisibacillus paracasei* Strains

K. V. Moiseenko^a, A. V. Shabaev^a, O. A. Glazunova^a, O. S. Savinova^a, and T. V. Fedorova^a, *

^a Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

In this work, a comparative analysis of the profile of fatty acids (FA) and volatile organic compounds (VOCs) for skimmed cow's milk fermented by four different probiotic strains of *Lactisibacillus paracasei* (ABK, KF1, MA2 and MA3) was carried out. Analysis of FA and VOC profiles was performed using gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS). For additional visualization of odor changes and its intensity in the fermented milk samples, the E-nose “electronic nose” odor analyzer was used. In total, presence of 42 different FA was detected in all samples, of which 17 were saturated, 8 monounsaturated, and 5 polyunsaturated. The strain-specific differences between the studied samples were of a complex nature and could not be explained only by the variation in the contribution of several individual FAs. The FA-nutritional indices, characterizing the nutritional and biological value of the samples, were different for milk fermented by different strains. Analysis of VOCs showed that the main odor-forming compounds in the studied samples were FAs and their reaction products, 2-heptanone, 2-nonanone, and 2-nonanol, formed as a result of the following chain of transformations: β -oxidation $\rightarrow$ decarboxylation $\rightarrow$ reduction. The aroma of *L. paracasei* fermentation products, predicted on the basis of the odors of individual VOCs, generally coincided with their organoleptic assessment – a flavor typical of fermented milk (yogurt, curdled milk) with floral and fruity notes.

Keywords: *Lactisibacillus paracasei*, cow's milk, fermentation, GC-MS, “electronic nose”, fatty acids, volatile organic compounds