

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.22+579.67
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-268-276>

Поступила в редакцию 30.07.2018
Received 30.07.2018

М. Е. Сафонова, И. А. Найденко, А. И. Буко

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *LACTOCOCCUS LACTIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Аннотация. Изучены физиолого-биохимические свойства (активность роста и кислотообразования, протеолитическая активность, устойчивость к NaCl, антагонистическая активность) выделенных из природных источников Беларуси штаммов молочнокислых бактерий вида *Lactococcus lactis*, перспективных для использования в качестве заквасочных культур для ферментированных кисломолочных продуктов и сыров.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Lactococcus lactis*, физиолого-биохимические свойства, активность кислотообразования, ферментированные кисломолочные продукты

Для цитирования: Сафонова, М. Е. Физиолого-биохимические свойства штаммов бактерий *Lactococcus lactis*, выделенных из природных источников / М. Е. Сафонова, И. А. Найденко, А. И. Буко // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 268–276. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-268-276>

M. E. Safonova, I. A. Naidenko, A. I. Buko

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE *LACTOCOCCUS LACTIS* STRAINS ISOLATED FROM NATURAL SOURCES

Abstract. The data have been presented on physiological and biochemical properties (growth, acidogenic, proteolytic and antagonistic activity, resistance to NaCl) of lactic acid bacterial strains of *Lactococcus lactis* isolated from Belarus natural sources. These strains are promising for use as starter cultures for fermented dairy products, cheese.

Keywords: lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, physiological and biochemical characteristics, acidogenic activity, fermented dairy products

For citation: Safonova M. E., Naidenko I. A., Buko A. I. Physiological and biochemical characteristics of the *Lactococcus lactis* strains isolated from natural sources. *Vesti Natsyunal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 268–276 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-268-276>

Введение. Представители вида *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) – грамположительные неподвижные неспорообразующие аэротолерантные гомоферментативные молочнокислые бактерии, относящиеся к семейству Streptococcaceae. В окружающей среде они распространены достаточно широко: встречаются на растительных субстратах, в желудочно-кишечном тракте животных, а также в молочных продуктах и на оборудовании и материалах, связанных с их производством. Клетки этих микроорганизмов овальные, размером $(0,5-1,2) \times (0,5-1,5)$ мкм, расположены одиночно, парами или в цепочках, по Граму окрашиваются положительно [1, 2].

Ввиду отсутствия данных о плохой переносимости и о нежелательных реакциях при длительном применении *L. lactis* этим микроорганизмам присвоен статус GRAS (Generally Regarded as Safe), что свидетельствует о международном признании безопасности лактококков и о возможности их неограниченного использования в пищевой и фармацевтической промышленности [2, 3].

Подвиды *L. lactis* – представители наиболее часто и широко применяемых в пищевой промышленности молочнокислых бактерий. Лактококки входят в большинство стартовых заквасок для производства сыров, используются при получении разнообразных молочных продуктов. Метаболические особенности штаммов *L. lactis* оказывают прямое и опосредованное влияние на

органолептические, питательные свойства и гигиеническое качество готовых продуктов. Для штаммов, входящих в состав заквасок, кроме кислотообразования важны такие свойства, как протеолитическая активность, антагонизм по отношению к патогенным и вызывающим порчу микроорганизмам, фагоустойчивость, ароматообразование, осмолотерантность и др. В связи с увеличением в последнее время спроса на продукты с функциональными свойствами и приданием здоровому питанию статуса одного из важнейших национальных приоритетов предъявляются дополнительные требования к используемым в процессе производства культурам молочнокислых бактерий [4, 5]. Богатыми источниками выделения природных штаммов лактококков, обладающих производственно ценными свойствами, являются молоко, а также простокваша и другие ферментированные продукты спонтанного брожения [6, 7].

Выделение и характеристика бактерий *L. lactis* является актуальной задачей, поскольку селекция новых штаммов дает возможность расширять ассортимент и выпускать новые виды продуктов с желаемыми органолептическими и функциональными характеристиками, а также при необходимости проводить ротацию заквасочных культур.

Цель работы – сравнение физиолого-биохимических (активность роста и кислотообразования, протеолитическая активность, устойчивость к NaCl, антагонистическая активность, утилизация сахаров) свойств новых штаммов бактерий *L. lactis*, выделенных из природных источников Беларуси.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили бактерии трех штаммов – *L. lactis* T8, *L. lactis* KM1, *L. lactis* 4/4с, выделенные из образцов спонтанно сквашенного непастеризованного коровьего и козьего молока и творога из индивидуальных хозяйств пригородов Минска [8].

Выделение, первичную идентификацию и изучение морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств молочнокислых бактерий проводили общепринятыми методами [9, 10]. Чистые культуры молочнокислых бактерий поддерживали на модифицированной среде MRS с 1 % лактозы или глюкозы и 10 %-ном обезжиренном молоке [11].

Молекулярно-генетическую идентификацию проводили методом полимеразной цепной реакции. В качестве матрицы использовали тотальную ДНК исследуемых бактерий. Выделение тотальной ДНК осуществляли при помощи набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва). Для визуализации результатов применяли электрофорез. Амплификацию 16S рРНК осуществляли с помощью праймеров 8f-seq (прямой праймер) и 1492r-Seq (обратный праймер). Для секвенирования амплифицированных последовательностей ампликоны лигировали в вектор рJET1.2, который затем со вставкой трансформировали в *E. coli* XL-1 Blue. После этого выделяли плазмидную ДНК и проверяли наличие вставки при помощи рестрикции вектора по сайту BglII. Полученные продукты разделяли при помощи электрофореза. Для секвенирования генов 16S рРНК исследуемых образцов использовали праймер рJET-F. При идентификации полученных секвенированных последовательностей 16S рРНК исследуемых микроорганизмов использовали данные GeneBank.

Для определения оптимальной температуры роста бактерии культивировали на среде MRS при 28, 37 и 43 °С. Оптическую плотность культуральной жидкости измеряли турбидиметрически на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 590 нм после 24 ч термостатирования.

Изучение динамики роста, а также активности кислотообразования выделенных бактерий проводили путем культивирования их в 10 %-ном стерильном обезжиренном молоке. В качестве посевного материала использовали 5 об.% 18-часовой культуры бактерий, выращенной на среде MRS. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом предельных разведений при высеве на слабоагаризованную питательную среду. Отбор проб для определения числа КОЕ, активной и титруемой кислотности производили каждые 3 ч в течение суток. Активную кислотность (рН) измеряли потенциометрически. Титруемую кислотность культуральной жидкости определяли титрометрическим методом. Результаты выражали в градусах Тернера (°Т).

Антагонистическую активность определяли методом лунок и совместного культивирования в жидких питательных средах [12].

Протеолитическую активность выделенных культур оценивали по методике Белозерского в модификации ВНИМИ, определяя накопление в молоке свободных аминокислот тирозина и триптофана с использованием реактива Фолина. Результат выражали в мкмоль тирозина/мл молока [13].

Определение активности протеолитических ферментов осуществляли с помощью модифицированного метода Ансона [14], используя в качестве субстрата 2 %-ный раствор казеината натрия в 0,2 М фосфатном буфере, pH 8,0. За единицу протеолитической активности принимали количество фермента, которое за 1 мин при 37 °С катализирует переход в неосаждаемое ТХУ состояние такого количества казеина, которое содержит 1 мкмоль тирозина; продукцию протеиназы выражали в условных ед/г сухой биомассы.

Все эксперименты выполнены в трехкратной повторности, приведены средние значения данных.

Результаты и их обсуждение. Бактерии *L. lactis* T8, *L. lactis* KM1 и *L. lactis* 4/4с выделены из образцов спонтанно сквашенного коровьего и козьего молока и творога. Полученные культуры имели типичные для лактококков признаки, при глубинном росте на жидкой питательной среде MRS накапливали кислые продукты метаболизма. Сферические или овальные клетки в цепочках различной длины положительно окрашивались по Граму, спор не образовывали. Тест на гидролиз аргинина с образованием аммиака положительный, образования газа из глюкозы не отмечалось. В результате молекулярно-генетического метода типирования исследуемые микроорганизмы были идентифицированы как *L. lactis*.

Основополагающими критериями для отбора перспективных для промышленного использования штаммов являются активный рост и накопление необходимых метаболитов. Изучение особенностей роста и кислотообразования выделенных лактококков позволило выявить штаммовые различия. Так, при исследовании влияния температуры на накопление биомассы бактериями *L. lactis* установлено, что для всех изучаемых культур температурный оптимум составляет 28 °С. Спустя 24 ч культивирования на среде MRS при оптимальной температуре самым активным по накоплению биомассы оказался штамм *L. lactis* 4/4с, а при повышении температуры культивирования до 37 и 43 °С у бактерий штамма *L. lactis* T8 накопление биомассы уменьшалось в 4,4 и 15,5 раза соответственно. Клетки штаммов *L. lactis* 4/4с и *L. lactis* KM1 при повышении температуры культивирования также накапливали меньше биомассы, однако различия были не такими выраженными (рис. 1).

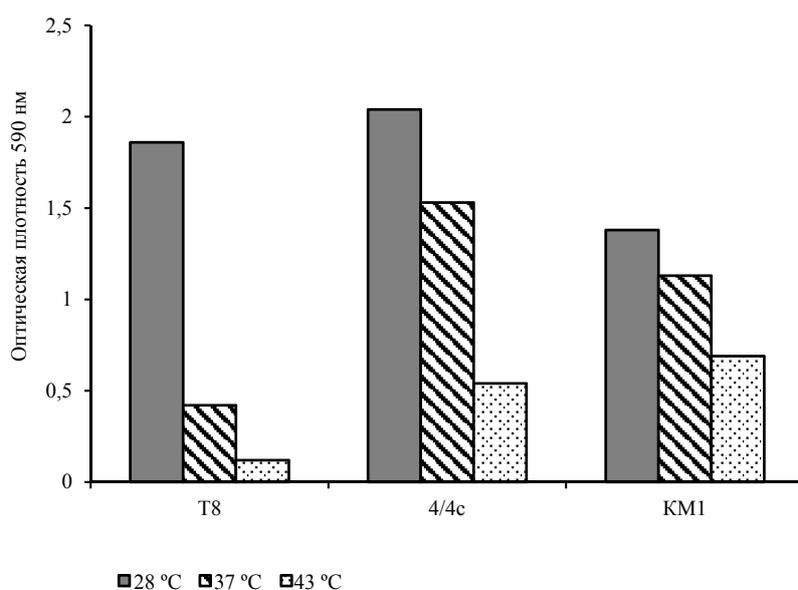


Рис. 1. Влияние температуры культивирования на накопление биомассы клетками штаммов *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4с и *L. lactis* KM1 на среде MRS

Fig. 1. Influence of the culture temperature on the biomass accumulation by strains of *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4с and *L. lactis* KM1 on MRS medium

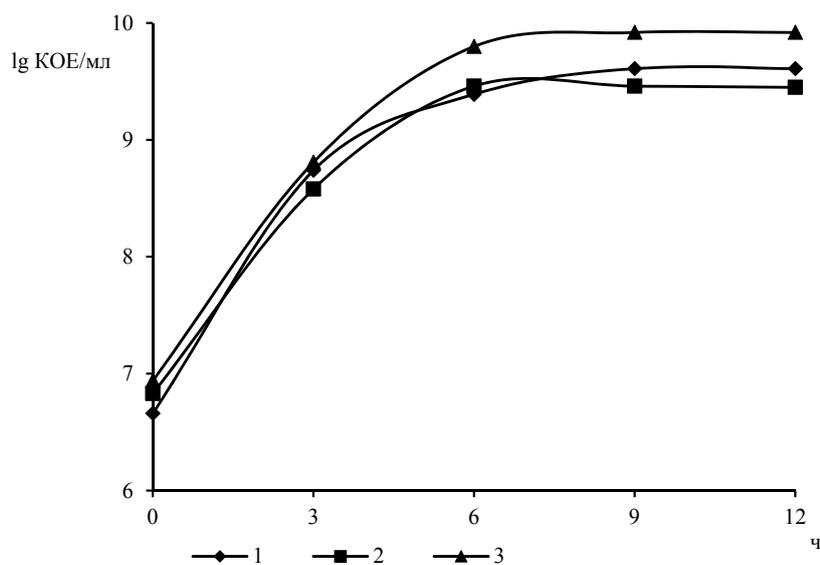


Рис. 2. Динамика роста бактерий *L. lactis* при культивировании в молоке:
1 – *L. lactis* T8, 2 – *L. lactis* KM1, 3 – *L. lactis* 4/4c

Fig. 2. Dynamics of growth of *L. lactis* strains during milk cultivation:
1 – *L. lactis* T8, 2 – *L. lactis* KM1, 3 – *L. lactis* 4/4c

Изучение динамики роста *L. lactis* T8, *L. lactis* KM1 и *L. lactis* 4/4c при культивировании в обезжиренном молоке показало, что у всех исследуемых штаммов активное увеличение количества жизнеспособных клеток происходит в первые 9 ч развития популяции бактерий и составляет $4,1 \cdot 10^9$, $2,9 \cdot 10^9$ и $8,3 \cdot 10^9$ КОЕ/мл соответственно (рис. 2). Значение числа КОЕ/мл остается неизменным и спустя 24 ч культивирования, а через 72 ч снижается до $3,0 \cdot 10^8$, $2,8 \cdot 10^8$ и $1,8 \cdot 10^8$ (данные на рисунке не представлены). Как видно из рис. 2, кривые роста изучаемых культур почти совпадают. Значения константы скорости деления клеток (v) в период экспоненциального роста культур также близки: у *L. lactis* T8 – $1,52 \text{ ч}^{-1}$, у *L. lactis* KM1 – $1,46$, у *L. lactis* 4/4c – $1,57 \text{ ч}^{-1}$. Параметры экспоненциального роста исследуемых культур близки к соответствующим показателям штаммов лактококков, традиционно используемых в молочной промышленности [15, 16].

Активность кислотообразования является одной из важнейших характеристик заквасочных культур. Накопление органических кислот (преимущественно молочной) в результате брожения, осуществляемого молочнокислыми бактериями, приводит к снижению pH молока и образованию молочного сгустка. В процессе изготовления сыра вносимые заквасочные культуры создают оптимальные условия для действия сычужного фермента. Кроме того, молочная кислота предотвращает развитие нежелательных и вызывающих порчу микроорганизмов, а также влияет на характер и выраженность ферментативных превращений в ходе созревания, участвует в формировании вкуса и аромата готового продукта [17–21].

При изучении накопления кислых продуктов метаболизма в процессе роста исследуемых штаммов в обезжиренном молоке выяснилось, что активное снижение pH происходит в период логарифмической фазы роста всех культур и продолжается в стационарной фазе. Спустя 24 ч культивирования активная кислотность культуральной жидкости во всех вариантах снизилась до pH 4,2 (рис. 3).

Данные о кислотообразующей активности выделенных штаммов лактококков, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что все исследуемые культуры являются активными кислотообразователями – уже через 6 ч культивирования pH в обезжиренном молоке снижается на 1,34–1,65 ед. Согласно литературным сведениям, доля штаммов – активных кислотообразователей, выделяемых в разных регионах из молочных продуктов и сыров, колеблется от единичных случаев до 35–40 % [22–25].

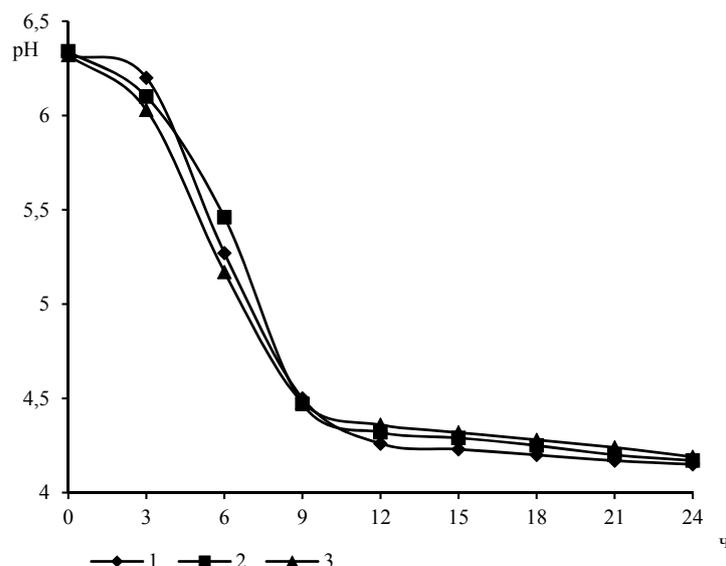


Рис. 3. Кислотообразование в процессе роста бактерий *L. lactis* в молоке:
1 – *L. lactis* T8, 2 – *L. lactis* KM1, 3 – *L. lactis* 4/4c

Fig. 3. Acidification during growth of *L. lactis* strains in milk:
1 – *L. lactis* T8, 2 – *L. lactis* KM1, 3 – *L. lactis* 4/4c

Т а б л и ц а 1. Кислотообразующая активность бактерий *L. lactis*
при культивировании в обезжиренном молоке

Table 1. Acidogenic activity of *L. lactis* strains during cultivation in skim milk

Штамм	pH в зависимости от времени культивирования			
	0 ч	6 ч	24 ч	7 сут
<i>L. lactis</i> T8	6,39	4,76	4,28	4,19
<i>L. lactis</i> 4/4c	6,36	4,97	4,39	4,31
<i>L. lactis</i> KM1	6,09	4,63	4,14	4,09

Важной характеристикой штаммов, применяемых в составе заквасок для ферментированных молочных продуктов и сыров, является также протеолитическая активность. Гидролиз белков молока происходит под действием протеиназ и пептидаз молочнокислых бактерий и способствует накоплению в молоке продуктов реакции – пептидов и аминокислот, благодаря чему ферментированные молочные продукты приобретают большую питательную ценность, лучше усваиваются, уменьшается их аллергенность. Кроме того, аминокислоты являются предшественниками ароматобразующих соединений (спиртов, альдегидов, кислот, эфиров и серосодержащих соединений), которые играют существенную роль в формировании характерного вкуса и аромата ферментированных продуктов [18, 26].

Выявлены различия изучаемых штаммов лактококков в накоплении продуктов гидролиза казеина в обезжиренном молоке (рис. 4). Наиболее высокую активность показал штамм *L. lactis* T8: содержание свободных аминокислот (в пересчете на тирозин) в анализируемых образцах составило 0,74 мкмоль/мл через 24 ч и 1,08 мкмоль/мл через 168 ч.

Установлено, что продукция протеолитических ферментов у *L. lactis* T8 связана с экспоненциальной фазой роста культуры. Процессы роста и образования протеиназ совпадают во времени (рис. 5).

К технологически ценным свойствам заквасочных культур относятся солеустойчивость, антагонистическая активность в отношении патогенных и вызывающих порчу микроорганизмов. Установлено, что исследуемые штаммы лактококков хорошо росли при внесении 4 % NaCl в среду культивирования: накопление биомассы через 48 ч роста составило 65–70 % по сравнению с контролем (среда без внесения NaCl). Увеличение концентрации вносимой соли до 6,5 % при-

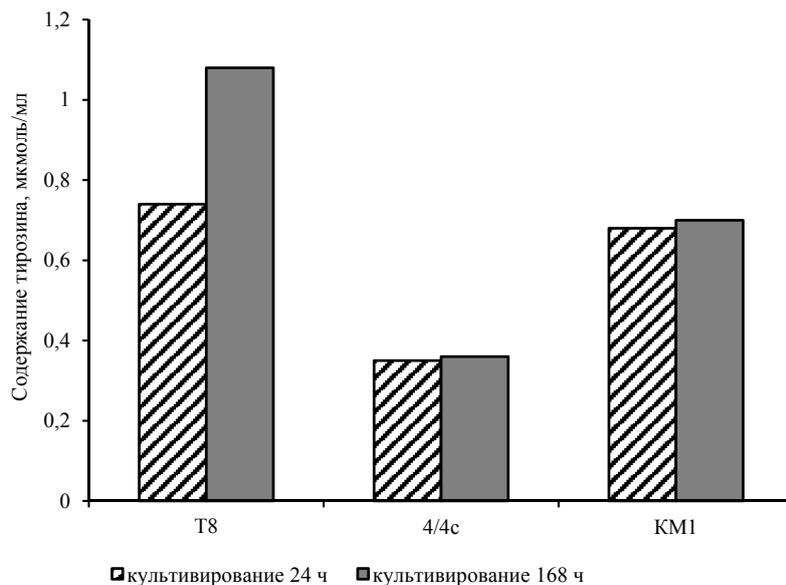


Рис. 4. Протеолитическая активность бактерий штаммов *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4c и *L. lactis* KM1 в молоке

Fig. 4. Proteolytic activity of strains of *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4c and *L. lactis* KM1 in milk

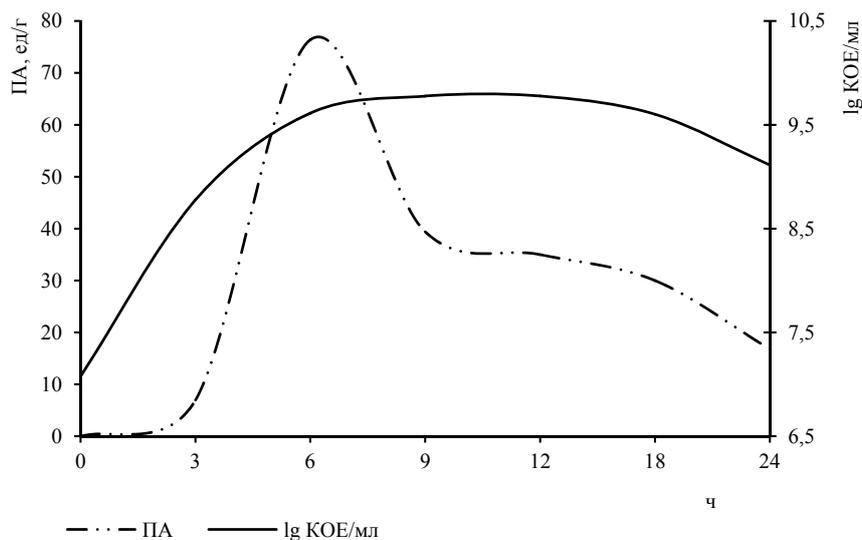


Рис. 5. Динамика роста и продукция протеолитических ферментов *L. lactis* T8 на среде MRS

Fig. 5. Dynamics of growth and production of proteolytic enzymes of *L. lactis* T8 on MRS medium

вело к угнетению роста (рост около 20 % от контроля) и подавлению ацидогенеза лактококков. Штаммы *L. lactis* T8 и *L. lactis* KM1 подавляли рост *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus*. Полученные данные согласуются с литературными сведениями о корреляции антагонистической активности молочнокислых бактерий с накоплением большого количества кислых продуктов метаболизма [27].

На качество некоторых молочных продуктов значительное влияние оказывает способность молочнокислых бактерий сбраживать не только лактозу, но и другие углеводы [28]. Выделенные штаммы лактококков различались по спектру утилизируемых углеводов. Все исследуемые культуры хорошо утилизировали глюкозу, лактозу, фруктозу, галактозу и мальтозу. Ни один из штаммов не утилизировал рафинозу и рамнозу. Сахарозу сбраживал только штамм *L. lactis* T8, а ксилоту – *L. lactis* 4/4c (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Утилизация углеводов бактериями штаммов *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4с и *L. lactis* KM1T a b l e 2. Utilization of carbohydrates by strains of *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4с and *L. lactis* KM1

Углевод	<i>L. lactis</i> T8	<i>L. lactis</i> 4/4с	<i>L. lactis</i> KM1
Глюкоза	+++	+++	+++
Фруктоза	+++	+++	+++
Сахароза	+++	–	–
Лактоза	+++	+++	+++
Мальтоза	+++	+++	+
Галактоза	+++	+++	+++
Целобиоза	+	+++	–
Рафиноза	–	–	–
Ксилоза	–	+++	–
Рамноза	–	–	–

П р и м е ч а н и е. Утилизация: «+++» – хорошая, «+» – медленная, «–» – отсутствует.

Заключение. Изучение физиолого-биохимических свойств бактерий штаммов *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4с и *L. lactis* KM1, выделенных из образцов коровьего и козьего молока спонтанного брожения и творога, показало, что исследованные лактококки активно растут в молоке ($v = 1,46–1,57 \text{ ч}^{-1}$), осмоотолерантны (устойчивы к 4 %-ному NaCl), являются активными кислотообразователями (быстро снижают pH до значения менее 4,7), а также позволяют выявить антагонистически активные по отношению к *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* штаммы T8 и KM1. Полученные данные о свойствах выделенных лактококков важны при подборе штаммов в состав стартовых культур для ферментированных кисломолочных продуктов и сыров.

Список использованных источников

1. Bergey's Manual of systematic bacteriology / P. Vos [et al.]. – 2nd ed. – New York : Springer-Verlag, 2009. – 1422 p.
2. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: in 7 vol. / ed. : M. Dworkin (editor-in-chief) [et al.]. – 3rd ed. – New York : Springer-Verlag, 2006. – Vol. 4 : Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. – 1140 p.
3. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation / S. Wessels [et al.] // Trends Food Sci. Technol. – 2004. – Vol. 15, N 10. – P. 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>
4. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin / E. H. E. Ayad [et al.] // Int. Dairy J. – 1999. – Vol. 9, N 10. – P. 725–735. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(99\)00140-5](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(99)00140-5)
5. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481 / J. C. Piard [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58, N 1. – P. 279–284.
6. Microbes from raw milk for fermented dairy products / J. Wouters [et al.] // Int. Dairy J. – 2002. – Vol. 12, N 2–3. – P. 91–109. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00151-0)
7. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese / J. A. Centero [et al.] // J. Dairy Sci. – 2002. – Vol. 85, N 12. – P. 3164–3172. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74404-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74404-4)
8. Сафонова, М. Е. Физиолого-биохимические свойства молочнокислых бактерий, выделенных из природных источников / М. Е. Сафонова, И. А. Найденко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / ред. : Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2015. – Т. 7. – С. 69–80.
9. Квасников, Е. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е. И. Квасников, О. А. Нестеренко. – М. : Наука, 1975. – 384 с.
10. Методы общей бактериологии : в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М. : Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
11. Man de, J. S. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. S. de Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23, N 1. – P. 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
12. Егоров, Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н. С. Егоров. – М. : Высш. шк., 1965. – 211 с.
13. Грудзинская, Э. И. Выбор методики для определения протеолитической активности молочнокислых бактерий и заквасок / Э. Е. Грудзинская, А. К. Максимова // Тр. ВНИМИ. – 1974. – Вып. 33. – С. 58–64.
14. Anson, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin / M. L. Anson // J. Gen. Physiol. – 1938. – Vol. 22, N 1. – P. 79–83. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>

15. Flambard, B. Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk / B. Flambard, J. Richard, V. Juillard // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, N 6. – P. 2131–2135.
16. Helinck, S. The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* in milk depend on the type of enzyme / S. Helinck, J. Richard, V. Juillard // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, N 6. – P. 2124–2130.
17. Buckenhuskes, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities / H. J. Buckenhuskes // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1993. – Vol. 12, N 1–3. – P. 253–272. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90067-j](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90067-j)
18. Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects / P. F. Fox [et al.] // *Advances in food and nutrition research.* – 1996. – Vol. 39. – P. 163–305. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60075-3](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60075-3)
19. Hansen, E. B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future / E. B. Hansen // *Int. J. Food Microbiol.* – 2002. – Vol. 78, N 1–2. – P. 119–131. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00238-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00238-6)
20. Leroy, F. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry / F. Leroy, L. De Vuyst // *Trends in Food Sci. Technol.* – 2004. – Vol. 15, N 2. – P. 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
21. Identification and technological characterization of *Lactococcus* isolated from traditional Turkish cheeses / R. Cibik [et al.] // *Revue Med. Vet.* – 2010. – Vol. 161, N 11. – P. 509–514.
22. Technological characterization of lactococci isolated from traditional Chinese fermented milks / C. Ma [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2011. – Vol. 94, N 4. – P. 1691–1696. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3738>
23. Cultivable lactic acid bacteria isolated from algerian raw goat's milk and their proteolytic activity / M. Moulay [et al.] // *World J. Dairy Food Sci.* – 2006. – Vol. 1, N 1. – P. 12–18.
24. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: a multivariate screening study / P. Piraino [et al.] // *Int. Dairy J.* – 2008. – Vol. 18, N 1. – P. 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.06.002>
25. Smit, G. Flavor formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese product / G. Smit, B. A. Smit, W. J. M. Engels // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 29, N 3. – P. 591–610. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.002>
26. Caplice, E. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation / E. Caplice, G. F. Fitzgerald // *Int. J. Food Microbiol.* – 1999. – Vol. 50, N 1–2. – P. 131–149. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00082-3)
27. Lindgren, S. E. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations / S. E. Lindgren, W. J. Dobrogosz // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1990. – Vol. 7, N 1–2. – P. 149–163. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90703-s](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90703-s)
28. Онопрійко, А. В. Технологія молочних продуктів міні-виробництва / А. В. Онопрійко, А. Г. Храмов, В. А. Онопрійко. – Ростов-н/Д : Март, 2004. – 411 с.

References

1. Vos P., Garrity G., Gones D., Krieg N., Ludwig W., Rainey F., Schleifer K.-H., Whitman W. *Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed.* New York, Springer-Verlag, 2009. 1422 p.
2. Dworkin M., Falkov S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria Vol. 4. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3rd ed.* New York, Springer-Verlag, 2006, 1140 p.
3. Wessels S., Axelsson L., Hansen E., De Vuyst L., Laulund S., Lähteenmäki L., Lindgren S., Mollet B., Salminen S., von Wright A. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science and Technology*, 2004, vol. 15, no. 10, pp. 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>
4. Ayad E. H. E., Verheul A., de Jong C., Wouters J., Smith G. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal*, 1999, vol. 9, no. 10, pp. 725–735. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(99\)00140-5](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(99)00140-5)
5. Piard J. C., Muriana P. M., Desmazeaud M. J., Klaenhammer T. R. Purification and partial characterization of lactacin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, vol. 58, no. 1, pp. 279–284.
6. Wouters J. T. M., Ayad E. H. E., Hugenholtz J., Smit J. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 2002, vol. 12, no. 2–3, pp. 91–109. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00151-0)
7. Centro J. A., Tomillo F. J., Fernández-García E., Gaya P., Nunez M. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 2002, vol. 85, no. 12, pp. 3164–3172. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74404-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74404-4)
8. Safonova M. E., Naidenko I. A. Physiological and biochemical properties of lactic acid bacteria isolated from natural sources. *Mikrobye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects: a collection of scientific papers]. Minsk, 2015, vol. 7, pp. 69–80 (in Russian).
9. Kvasnikov E. I., Nesterenko O. A. *Lactic acid bacteria and ways of using them.* Moscow, Nauka Publ., 1975. 384 p. (in Russian).
10. Gerhardt P. (ed.). *Manual of methods for general microbiology. Vol. 1.* Moscow, Mir Publ., 1983. 536 p. (in Russian).
11. De Man J. S., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 1960, vol. 2, no. 1, pp. 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
12. Egorov N. S. *Microbes-antagonists and biological methods for determining antibiotic activity.* Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1965. 211 p. (in Russian).
13. Grudzinskaya E. E., Maksimova A. K. Selection of methods for determination of proteolytic activity of lactic acid bacteria and starter cultures. *Trudy Vserossiiskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta molochnoi promyshlennosti* [Proceedings of the All-Russian Research Institute of the Dairy Industry], 1974, iss. 33, pp. 58–64 (in Russian).

14. Anson M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 1938, vol. 22, no. 1, pp. 79–83. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
15. Flambard B., Richard J., Juillard V. Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 6, pp. 2131–2135.
16. Helinck S., Richard J., Juillard V. The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* in milk depend on the type of enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 6, pp. 2124–2130.
17. Buckenhüskes H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, vol. 12, no. 1–3, pp. 253–272. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90067-j](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90067-j)
18. Fox P. F., O'Connor T. P., McSweeney P. L. H., Guinee T. P., O'Brien N. M. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1996, vol. 39, pp. 163–328. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60075-3](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60075-3)
19. Hansen E. B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, vol. 78, no. 1–2, pp. 119–131. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00238-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00238-6)
20. Leroy F., de Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 2004, vol. 15, no. 2, pp. 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
21. Cibik R., Cetinkaya F., Ersoy M., Yibar A. Identification and technological characterization of *Lactococcus* isolated from traditional Turkish cheeses. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2010, vol. 161, no. 11, pp. 509–514.
22. Ma C. L., Zhang L. W., Yi H. X., Du M., Han X., Zhang L. L., Feng Z., Zhang Y. C., Li Q. Technological characterization of lactococci isolated from traditional Chinese fermented milks. *Journal of Dairy Science*, 2011, vol. 94, no. 4, pp. 1691–1696. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3738>
23. Moulay M., Aggad H., Benmecherrne Z., Guessas B., Henni D. E., Kihal M. Cultivable lactic acid bacteria isolated from algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 2006, vol. 1, no. 1, pp. 12–18.
24. Piraino P., Zotta T., Ricciardi A., McSweeney P. L. H., Parente E. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: a multivariate screening study. *International Dairy Journal*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.06.002>
25. Smit G., Smit B. A., Engels W. J. M. Flavor formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese product. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, vol. 29, no. 3, pp. 591–610. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.002>
26. Caplice E., Fitzgerald G. F. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, vol. 50, no. 1–2, pp. 131–149. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00082-3)
27. Lindgren S. E., Dobrogosz W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, vol. 7, no. 1–2, pp. 149–163. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90703-s](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90703-s)
28. Onopriiko A. V., Khramtsov A. G., Onopriiko V. A. *Technology of dairy products of small-scale factories*. Rostov on Don, Mart Publ., 2004. 411 p. (in Russian).

Информация об авторах

Сафонова Марина Евгеньевна – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: m-safonova14@mail.ru

Найденко Инна Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь).

Буко Андрей Иосифович – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Marina E. Safonova – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: m-safonova14@mail.ru

Inna A. Naidenko – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).

Andrey I. Buko – Junior researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).