

FTAMP:34.27.17

Г.Қ. АБАЙ^{1*}, Р.Ж. БЕРЖАНОВА², У.Ч. ЧОМАНОВ¹, Ш. ХАРСА³, А.А. САРТАЕВА⁴,
Н.К. ДИНАНОВА²

¹Қазақ қайта өңдеу және тағам өнеркәсіптері ғылыми зерттеу институты, Алматы,
Қазақстан

²әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы, Қазақстан

³Измир Технологиялық Институты, Измир, Түркия

⁴Қазақ ұлттық қыздар педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: abay.gk@mail.ru

ІРІМШІК ӨНДІРІСІНДЕ ҚОЛДАНЫЛАТЫН ЛАКТОБАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ПРОТЕОЛИТИКАЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.07

Түйін

Тағамдық биотехнология саласында ірімшік биологиялық және нутрицевтикалық құндылығы жоғары сүт өнімі ретінде белгілі. Организммен биосіңірілуі жоғары болғандықтан тұтынушылар арасында мол сұранысқа ие. Пайдалы қасиеттерін нақтылау мақсатында қазіргі таңда ірімшік өндірісіндегі базалық құрам-бөлік – бактериялық ұйытқы дақылдарын белсенділік деңгейлері бойынша іріктеудің маңыздылығы жоғары. Ұйытқы дақылының құрамына енетін лактобактерия штамдарының протеолитикалық қасиеттерін зерттеудің өзектілігі бұл штамдардың соңғы өнімнің органолептикалық қасиеттері мен биологиялық құндылығына тікелей әсер етуімен негізделеді. Лактобактериялардың өніммен бірге адам организміне енген сәттен бастап асқазан – ішек жолындағы микробиомды қалыпқа келтіруге қызмет етуі соңғы өнімнің (ірімшіктің) функционалдылығын нақтылайды. Мақалада функционалды бағыттағы ірімшік өндірісінде қолданылатын бактериялық ұйытқының құрамына кіретін лактобактерия штамдарының технологиялық маңызды протеолитикалық қасиеттерін зерттеу нәтижелері берілген. Зерттеу объектілерінің барлығы дерлік казеин протеолизіне қатыса алатындығы зерттелінді. Жоғары белсенділікке ие штамдар: *Lactiplantibacillus plantarum* СНЕ37 Ch-1 - 19,0±0,5 мм, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 және *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8 дақылдарында - 12,0±0,2 мм мөлшерінде мөлдірлену аймағы анықталды. Сонымен қатар, желатинді протеолиздеу қарқындылығы жоғары штамдар *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 және *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 штамдары екендігі белгілі болды. Олар ЕПЖ (ет-пептонды желатин) қоректік ортасында пробирка бойымен және пробирка түбінде тұнба тұзу арқылы өсу ерекшелігін көрсетіп, жартылай қатты ЕПЖ қоректік ортасын толықтай сұйылтты.

Жұмыс қорытындысы бойынша протеолитикалық белсенділіктері жоғары сүтқышқылды бактериялар штамдары функционалды бағыттағы ірімшік өндірісі үшін қолданылатын ұйытқы дақылдарының құрамына енуіне толық негіз бар.

Кілтті сөздер: лактобактериялар, казеин протеолизі, желатин протеолизі.

Ірімшік – сүттен өндірілетін белоктың ферментативті коагуляциялану өнімі. Ірімшіктің жоғары тағамдық құндылыққа ие болуы құрамында көп мөлшерде белок пен алмастырылмайтын аминқышқылдарының кездесуімен түсіндіріледі [1-3]. Құрамындағы белоктар мен басқа да азоттық қосылыстардың көп бөлігі ерітілген күйде болуына байланысты ірімшік адам организммен оңай сіңіріліп, қорытылады. Ірімшіктің құрғақ затының құрамында 20 – 55% май, 1,5 – 3,5% минералды тұздар, ұшқыш май қышқылдары, карбонильді қосылыстар, дәрумендер, кальций, фосфор, микроэлементтер мен ферменттер кездеседі, энергетикалық құндылығы ондағы май мен белоктың мөлшеріне байланысты 1 кг өнімде 2500-4000 ккал аралығында ауытқып тұрады [4,5].

Ірімшіктің 100 г тұтыну арқылы организмді кальцийдің тәуліктік мөлшерімен қамтамасыз етуге болады. Аталған микроэлементтің жетіспеуі салдарынан организмде тірек-қимыл жүйесінің аппараттары, сүйектер мен тістердің зақымдалу қаупі жоғары.

Сонымен қатар ірімшік құрамында маңызды мөлшерде Д дәрумені кездеседі. Д дәрумені кальцийдің сіңірілуін қамтамасыз етеді. Жеткіліксіздігі салдарынан кальцийдің сіңірілуі төмендеп организм дефициттік күйге өтіп кетуі мүмкін [7, 8]. Сондықтан организмді дәрумендік - минералдық кешенмен қамтамасыз ету жолында функционалды бағыттағы ірімшікті өндіру және күнделікті теңгерілген тағам рационы құрамына ендірудің маңыздылығы жоғары.

Ірімшік өндірісі барысында көптеген күрделі биохимиялық және микробиологиялық процестер жүзеге асырылады. Қазіргі таңда тағамдық биотехнологияның қарыштап дамуы арқасында өндірілетін ірімшіктердің алуантүрлілігі кеңею үстінде. Ірімшіктің әрбір түрінің жетілуі мен қалыптасуы өндірісте пайдаланылатын ұйытқы құрамына енетін микрофлораның сандық және сапалық ерекшеліктеріне байланысты [9-11].

Ірімшік өндірісіне қажетті ұйытқы микрофлорасы ретінде сүтқышқылды бактериялардың түрлі штамдары мен түрлері (лактококстар, термофильді стрептококстар, лактобацилдер) пропионқышқылды бактериялар қолданыс табады. Сүтқышқылды бактериялар сүттің негізгі құрам-бөліктерін – лактоза, белоктар мен майлардың дәмдік, ароматикалық және биологиялық белсенді заттарға дейін трансформациялануын жүзеге асырады, сонымен қатар техникалық зиянды микроорганизмдердің өсуін тежейді. Ұйытқы алу жолында сүтқышқылды бактериялардың таза дақылын бөліп алу микроорганизмдердің салалық коллекциясын қалыптастырудың негізі болып есептеледі. Бәсекеге қабілетті бактериялық ұйытқы дақылдарын іздестіру, бактериялық ұйытқылар мен концентраттар өндіру мен дайындау отандық және түрлі шет елдік ғылыми-зерттеу ұйымдарында қарқынды түрде жүргізілу үстінде [12-14].

Бактериялық ұйытқы дақылдары сүт қышқылын түзу арқылы, белок пен майдың аз мөлшерде және баяу ыдырауына байланысты ферменттелген тағам өнімдерінің органолептикалық және құрылымдық-механикалық сипаттарын қалыптастыратын және биологиялық құндылығына әсер ететін, протеолитикалық қасиетке ие негізгі құрам-бөлік [15-19].

Лактобактериялардың протеолитикалық ферменттері клеткаларды азотпен және аминқышқылдарымен қамтамасыз етуде маңызды роль атқарады, себебі сүтқышқылды бактериялар клеткаларының бұл қосылыстарға деген қажеттелігі жоғары деңгейде. Протеолитикалық ферменттердің басты функциясы белоктарды бактерия клеткалары сіңіре алатындай компоненттер формасына дейін гидролиздеу. Лактобактериялардың протеолитикалық жүйесі протеиназамен түзіледі, бұл клетка қабырғасымен, пептидтер мен аминқышқылдарының тасымалдануы үшін қызмет атқаратын арнайы жүйемен және түрлі цитоплазматикалық пептидазалармен байланысты [20].

Соңғы жылдары тағам шикізаттарынан биоактивті пептидтерді теңгерімді тамақтану арқылы алу және қолдану тұрғысынан сүтқышқылды бактериялардың протеолитикалық белсенділігін зерттеуге деген қызығушылық артып отыр. Көптеген ғалымдардың назары лактобактериялардың протеолитикалық белсенділігінің нәтижесінде түзілетін биоактивті пептидті қосылыстардың иммуномодулирлеуші, антигипертензиялық және гипохолестеринемиялық белсенділіктерін зерттеуге бағытталған [21-24]. Ұйытқының қасиеті оның құрамына кіретін жекелеген штамдардың белсенділігіне тікелей байланысты болғандықтан, ұйытқы құрамына өндірістік құнды штамдарды, ең бастысы протеолитикалық белсенділігі жоғары штамдарды енгізу қажет. Тағам биотехнологиясында жоғары биохимиялық белсенділік пен биотехнологиялық қасиеттерге ие, функционалды тағам өнімдерін өндіруде қолданылатын отандық бәсекеге қабілетті сүтқышқылды бактериялардың ұйытқысын өндіру өзекті және перспективті бағыт болып табылады.

Жұмыстың мақсаты – ірімшік өндірісінде қолданылатын жаңа функционалды-белсенді лактобактерия штамдарының протеолитикалық белсенділігіне баға беру.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Жұмыста зерттеу объектілері ретінде табиғи сиыр, ешкі сүтінен және қолдан жасалған ешкі сүті ірімшігінен бөлініп алынған жаңа сүтқышқылды бактериялардың таза штамдары пайдаланылды.

Лактобактериялар штамдарын дақылдау мақсатында бірнеше қоректік орталар қолданылды:

- майсыздандырылған стерильді сүт;
- MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) қоректік ортасы;
- CJM (cabbage juice medium): 1000 мл қырыққабат қайнатпасына ашытқы автолизаты – 10,0 г; пептон – 10,0 г; глюкоза – 20,0 г; CaCO₃ – 40,0 г; агар – 20,0 г [25];

- казеин протеолизін зерттеу үшін Эйкман сүтті агары: 700 мл дистилденген суға пептон – 10,0-20,0 г; NaCl – 5,0 г; глюкоза – 10,0 г; агар – 20,0 г; 300 мл стерильді майсыздандырылған сүт. Аталған қоректік ортада лактобактериялар дақылдары агар бетінде нүктелік тереңдетіп егілді. Жұмыс нәтижесі өсіп шыққан колония айналасындағы мөлдірлену аймағының диаметрімен өлшенді.

- желатин протеолизін зерттеу мақсатында ет пептонды желатин (ЕПЖ) қоректік ортасы: 1000 мл ет-пептонды сорпаға 15-20% көлемінде желатин қосылады. ЕПЖ қоректік ортасында зерттеу жұмыстары пробиркаларға 10 мл көлемінде құйылған және толықтай суыған жартылай қатты қоректік ортаға укол әдісімен микробиологиялық тұзақты пайдаланып егу арқылы жүргізілді. Лактобактериялардың протеолитикалық белсенділігі пробирка бойымен өсіп, тұнба түзу арқылы және жартылай қатты қоректік ортаны толықтай сұйылтуы арқылы бағаланды.

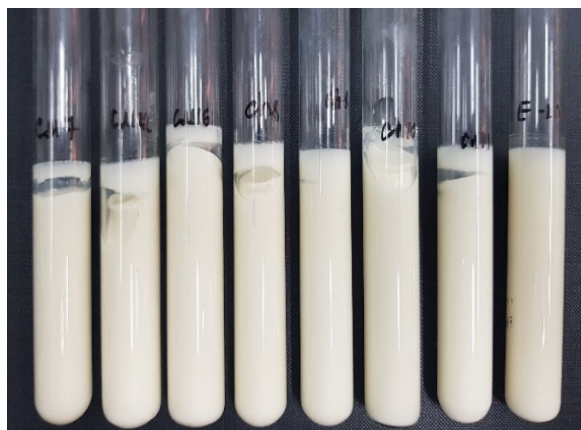
Сүтқышқылды микроорганизмдер MRS және CJM қоректік орталарында 37°C -та 24-36 сағат бойы дақылданды. Барлық зерттеу жұмыстары белсенді тәуліктік дақылдармен жүзеге асырылды. Зерттеу нәтижелері сырт көзбен және микроскопиялық әдістер арқылы анықталды. Стерильділікті тексеру мақсатында ЕПА (ет-пептонды агар) және ЕПС (ет-пептонды сорпа) қоректік орталары қолданылды. Дайын қоректік орталар автоклавта 30 минут бойы 1,5А қысымда стерилизацияланды. Лактобактерия клеткаларын егу және қайта егу жұмыстары, микроскоптау микробиологиялық дәстүрлі әдістермен жүргізілді.

Нәтижелер және оларды талдау

Сүт қышқылды бактериялар сүт қантын – лактозаны сүт қышқылына – лактатқа дейін айналдырып, ортаның рН мәнін төмендетеді, нәтижесінде казеиннің ұюына және қышқылға сезімтал микроорганизмдер өсуінің тежелуіне әсер етеді. Көптеген әдебиеттерде сүт қышқылды бактериялардың сүтті ұйыту уақытының ұзақтығын олардың белсенділігімен байланыстырылады [26].

Лактобактерияларды дұрыс идентификациялау жолында олардың морфологиялық - дақылдық қасиеттерін зерттеумен қатар, каталазалық және оксидазалық белсенділіктерін анықтаудың маңыздылығы жоғары, себебі аталған ерекшеліктер патогенді аэробты және факультативті анаэробты микроорганизмдерге тән деп есептелінеді. Жұмыста сүт қышқылды бактериялардың каталазалық және оксидазалық белсенділіктерін анықтау мақсатында арнайы тест препараттар пайдаланылды. Тест көрсеткіштері бойынша барлық дақылдардың каталазалық және оксидазалық белсенділіктері жоқ екендігі анықталды.

Лактобактериялардың сүтті ұйыту белсенділігін анықтау үшін егу материалдары майсыздандырылған стерильді сүтте дақылданды. Сүтті ұйыту қарқындылығы лабораториялық жағдайда жіті бақыланып отырды. Алынған нәтижелер бойынша *Lactococcus lactis subsp. lactis* SDCM 5123 CH-10, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 және *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 штамдарының сүтті ұйыту қарқындылығы *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1 штамына қарағанда әлдеқайда жоғары екендігі анықталды.



Сурет 1 – Лактобактериялардың сүтті ұйытуы

Жұмыста *Lactococcus lactis subsp. lactis* SDCM 5123 CH-10, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 және *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 штамдары сүтте өсу барысында, дақылданудың 16-18 сағатында концистенциясы өте тығыз, сарысусыз біртекті ұйытқы түзді (1-сурет).

Ірімшік өндірісі үшін қолданылатын ұйытқы құрамына кіретін перспективті сүтқышқылды бактериялардың негізі қасиеттерінің бірі – протеолитикалық белсенділігі. Протеолитикалық белсенділікті зерттеу үшін казеин және желатин протеолизі процестері қарастырылды. Сүт қосылған агарлы Эйкман қоректік ортасына зерттелініп отырған штамдарды нүктелік тереңдетіп егу жұмыстары жүргізілді. Петри табақшаларын 48 сағат бойы 37 °C температурада дақылдап, уақыт өткен соң мөлдірлену аймағының диаметрі өлшенді (1-кесте).

Кесте 1 Сүтқышқылды бактерияларының казеинді протеолиздеуі

№	Штамдар	Сүтті агарлы орта
		Мөлдірлену аймағының диаметрі, мм
1	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> S5K8 CM-14	12,0±0,2
2	<i>Streptococcus macedonicus</i> LAB 617 CM-16	10,0±0,5
3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CHE37 Ch-1	19,0±0,5
4	<i>Lactococcus lactis</i> 1881 Ch-8	12,0±0,5
5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> SDCM 5123 CH-10	10,0±0,5
Ескерту: «сандар» - айқындалу аймағының диаметрі		

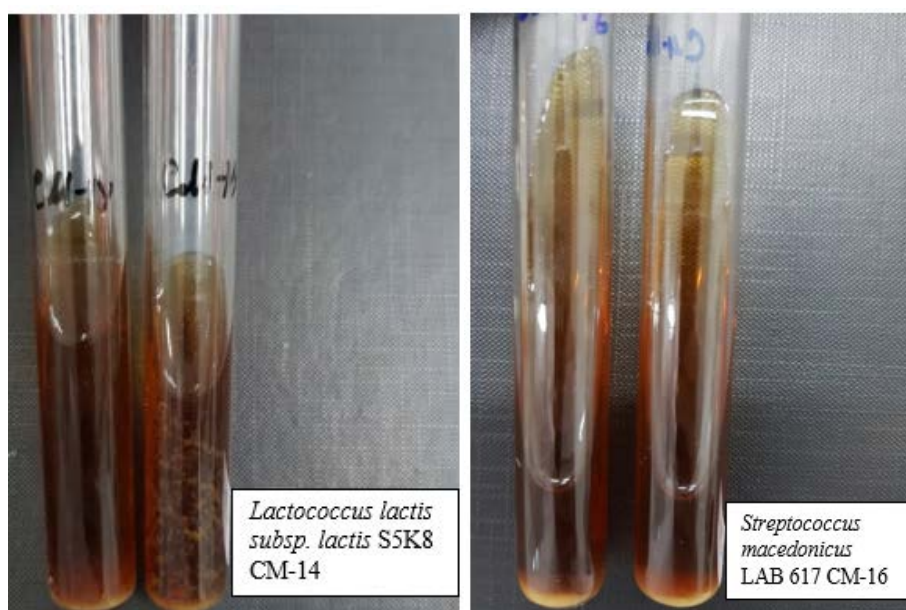
Жұмыс барысында барлық штамдар казеинді протеолиздеуге қабілетті екендігі анықталды. Жоғары протеолитикалық белсенділікке ие штамдар: *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8 екендігі белгілі болды, протеолитикалық белсенділіктің жоғары көрсеткіші, сәйкесінше – бацилдерде гидролиздеу аймағы 19,0±0,5 мм, коктарда - 12,0±0,2 мм екендігі анықталды.

Суретте сүтті агарлы Эйкман қоректік ортасында нүктелік тереңдету әдісімен дақылданған лактобактерия колониясының айналасындағы мөлдірлену аймағы айқын бейнеленген (2- сурет).



Сурет 2 – Казеин протеолизі

Лактобактериялардың протеолитикалық белсенділігін анықтаудың келесі әдісі дақылдардың желатинді ыдырату қабілеттігін зерттеу. Бұл мақсатта лактобактерия штамдары ЕПЖ қоректік ортасында дақылданды. 48 сағат бойы 37⁰С температурада өсіргеннен кейін ет-пептонды желатин ортасына укол әдісімен егілген лактобактериялардың: *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 штамдары желатинді жақсы ыдырату қасиетіне ие екендігі ортаның өзгерісі арқылы анықталды (3-сурет).



Сурет 3 – Желатин протеолизі

Суретте жартылай қатты ет-пептонды желатин қоректік ортасында лактобактериялардың өсу ерекшеліктері бейнеленген. *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 штамдары жартылай қатты ет пептонды желатин қоректік ортасын толықтай сұйылтумен қатар, пробирка бойымен және тұнба түзу арқылы өсуге қабілетті екендігін байқатты. Нәтижесінде аталған екі штамм желатин протеолизін жүргізе алатындығы белгілі болды.

Қорытынды

Зерттеу жұмысы барысында табиғи сүт өнімдерінен бөлініп алынған лактобактериялардың протеолитикалық қасиеттері зерттелді. Бұл мақсатта казеин мен желатинді протеолиздеу қарқындылығы анықталды. Нәтиже бойынша барлық штамдар казеинді протеолиздеуге қабілетті екендігі зерттелінді. Жоғары белсенділікке ие штамдар: *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1 - $19,0 \pm 0,5$ мм, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 және *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8 дақылдарында - $12,0 \pm 0,2$ мм мөлшерінде мөлдірлену аймағы анықталды. Сонымен қатар, желатинді протеолиздеу қарқындылығы жоғары штамдар *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 және *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 штамдары екендігі белгілі болды.

Сүт казеині мен желатинді протеолиздеу белсенділігін анықтау мәліметтері бойынша протеолитикалық белсенділігі жоғары сүтқышқылды бактериялар штамдары функционалды бағыттағы ірімшік өндірісі үшін ұйытқы дақылдары құрамына қосуға пайдаланылады.

Әдебиеттер:

1 Almena-Aliste M., Mietton B. Cheese classification, characterization, and categorization: A global perspective. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2 (1): 2003-2012. (<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012>)

2 Afshari R., Pillidge C.J., Dias D.A., Osborn A.M., Gill H. Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2020, 60 (1): 33-47. (<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>)

3 Vacca G.M., Stocco G., Dettori M.L., Summer A., Cipolat-Gotet C., Bittante G., Pazzola M. Cheese yield, cheesemaking efficiency, and daily production of 6 breeds of goats. *Journal of dairy science*, 2018, 101 (9): 7817-7832. (<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14450>)

4 Суюнчев О.А., Вобликова Т.В. Особенности технологии сыров из козьего молока. *Переработка молока*, 2007, 11: 44-46. (<https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-proizvodstva-syrov-iz-koziego-moloka>)

5 Nam J.H., Cho Y.S., Rackerby B., Goddik L., Park S.H. Shifts of microbiota during cheese production: impact on production and quality. *Applied microbiology and biotechnology*. 2021, 105 (6): 2307-2318. (<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11201-5>)

6 Tunick M.H., Van Hekken D.L. Dairy Products and Health: Recent Insights. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63 (43): 9381-9388. (<https://doi.org/10.1021/jf5042454>)

7 Силаева В.М., Сахаров С.Д. Нормализация молока по жиру и ее значимость для сыроделия. *Переработка молока*. 2007, 10: 6-8. (<http://www.milkbranch.ru/magazine/archive/viewdoc/2007/10/821.html>)

8 Тултабаева Т.Ч., Чоманов У.Ч., Амирова Ж.Т. Производство мягких комбинированных сыров с растительными добавками. *Известия ВУЗов Кыргызстана*. 2010, 3: 22-23. (<http://www.science-journal.kg/ru/journal/2/archive/7898>)

9 Johnson M.E. A 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of dairy science*, 2017, 100 (12): 9952-9965. (<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12979>)

10 Blaya J., Barzideh Z., LaPointe G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of dairy science*, 2018, 101 (4): 3611-3629. (<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>)

11 Katechaki E., Panas P., Rapti K., Kandilogiannakis L., Koutinas A.A. Production of hard-type cheese using free or immobilized freeze-dried kefir cells as a starter culture. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, 56 (13): 5316-5323. (<https://doi.org/10.1021/jf703585y>)

12 Тултабаева Т.Ч., Чоманов У.Ч. Термодинамические и реологические характеристики комбинированных мягких сыров. 2011, 2: 103-110. (<http://www.vestnik.nauka.kz/wp-11content/uploads/2011/06/13pdf>)

13 Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford Tom P., Ross R Paul, Fitzgerald G.F., Cotter Paul D. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology reviews*, 2013, 37: 664-698. (<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>)

14 Oyeniran A., Ibrahim S.A., Gyawali R., Tahergorabi R., Zimmerman T., Krastanov A. A modified reinforced clostridial medium for the isolation and enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp.*

- bulgaricus in a mixed culture. *Journal of dairy science*, 2020, 103(6): 5030-5042. (<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17894>)
- 15 Nagaoka S. Yogurt Production. *Methods in molecular biology*, 2019, 1887: 45-54. (https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_5)
- 16 Garcia-Cano I, Rocha-Mendoza D., Ortega-Anaya J., Wang K., Kosmerl E., Jimenez-Flores R. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103:5243-5257. (<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6>)
- 17 Ouiddir M., Bettache G., Leyva Salas M., Pawtowski A., Donot C., Brahimi S., Mabrouk K., Coton E., Mounier J. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food Microbiology*, 2019, 82: 160-170. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.020>)
- 18 Hayek S.A., Gyawali R., Aljaloud S.O., Krastanov A., Ibrahim S.A. Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of Dairy Research*, 2019, 86 (4):490-502. (<https://doi.org/10.1017/S002202991900075X>)
- 19 Kang W., Pan L., Peng C., Dong L., Cao S., Cheng H., Wang Y., Zhang C., Gu R., Wang J., Zhou H. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(11): 9980-9991. (<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18704>)
- 20 Camara S.P., Dapkevicius A., Riquelme C., Elias R.B., Silva C., Malcata F.X., Dapkevicius M. Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. *Food Science and Technology International*, 2019, 25(4): 303-317. (<https://doi.org/10.1177/1082013218823129>)
- 21 Grujovic M.Z., Mladenovic K.G., Nikodijevic D.D., Comic L.R. Autochthonous lactic acid bacteria-presentation of potential probiotics application. *Biotechnology letters*, 2019, 41(11): 1319-1331. (<https://doi.org/10.1007/s10529-019-02729-8>)
- 22 Gomand F., Borges F., Burgain J., Guerin J., Revol-Junelles A.M., Gaiani C. Food Matrix Design for Effective Lactic Acid Bacteria Delivery. *Annual review of food science and technology*, 2019, 10: 285-310. (<https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121140>)
- 23 Behare P.V., Mazhar S., Pennone V., McAuliffe O. Evaluation of lactic acid bacteria strains isolated from fructose-rich environments for their mannitol-production and milk-gelation abilities. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103 (12): 11138-11151. (<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19120>)
- 24 Головин М. А., Ганина В. И., Машенцева Н. Г. Холестеринредуцирующие пробиотические бактерии в молочной продукции. *Молочная промышленность*. 2014. 5:46–47. (<https://earthpapers.net/razrabotka-probioticheskoy-kompozitsii-s-vysokoy-sposobnostyu-k-reduktsii-holesterina>)
- 25 Eun J. J., Dae W. M., Joon S. O., Jin S. M., Hyunbin S., Kwang Y. K., Nam S. H. Development of cabbage juice medium for industrial production of leuconostoc mesenteroides starter. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2017, 28;27(12):2112-2118. (<https://doi.org/10.4014/jmb.1708.08050>).
- 26 Гусев М. В., Минеева Л. А. Молочнокислые бактерии. *Микробиология*, 2004, 4:15-19. (<https://www.at.alleng.org/d/bio/bio092.htm>)

Г.Қ. АБАЙ^{1*}, Р.Ж. БЕРЖАНОВА², У.Ч. ЧОМАНОВ¹, Ш. ХАРСА³,
А.А. САРТАЕВА⁴, Н.К. ДИНАНОВА²

¹Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности, Алматы, Казахстан

²Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

³Измирский Технологический Институт, Измир, Турция

⁴Казахский национальный женский педагогический университет, Алматы, Казахстан

*e-mail: abay.gk@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРА

Аннотация

В области пищевой биотехнологии сыр известен как молочный продукт с высокой биологической и нутрицевтической ценностью. Благодаря высокой биодоступности организмом, пользуется большим спросом у потребителей. В целях уточнения полезных свойств в настоящее время в производстве сыра большое значение имеет отбор по уровням активностей культур лактобактерий, входящих в состав закваски. Актуальность исследования морфолого-культуральных и протеолитических свойств штаммов лактобактерий, входящих в состав культуры закваски, обусловлена непосредственным влиянием этих штаммов на органолептические свойства и биологическую ценность конечного продукта. Лактобактерии в составе закваски должны служить для нормализации микробиома желудочно – кишечного тракта, тем самым обеспечивая функциональность конечного продукта (сыра). В статье представлены результаты исследования морфолого-культуральных и протеолитических свойств штаммов лактобактерий, входящих в состав бактериальной закваски, используемой при производстве сыров функциональной направленности. Выявлено, что все объекты исследования могут участвовать в протеолизе казеина. Активными штаммами, показавшими высокие результаты, являются *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1 - 19,0±0,5 мм, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 и *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, зона просветления у последних - 12,0±0,2 мм. В протеолизе желатина могут участвовать лишь два штамма - *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 и *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16. По итогам работы имеются все основания полагать, что штаммы молочнокислых бактерий с высокой протеолитической активностью могут войти в состав закваски, используемой для производства сыров функционального назначения.

Ключевые слова: лактобактерии, протеолиз казеина, протеолиз желатина.

IRSTI:34.27.17

G.K. ABAY^{1*}, R.Zh. BERZHANOVA², U.Ch. CHOMANOV¹, S. HARSA³,
A.A. SARTAYEVA⁴, N.K. DINANOVA²

¹Kazakh Research Institute of Processing and Food Industry, Almaty, Kazakhstan

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

³Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey

⁴Kazakh National Women's Teacher Training University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: abay.gk@mail.ru

INVESTIGATION OF PROTEOLYTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA USED IN CHEESE PRODUCTION

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.07

Abstract

In the field of food biotechnology, cheese is known as a dairy product with high biological and nutraceutical value. Due to the high bioavailability of the body, it is in great demand among consumers. In

order to clarify the useful properties, currently in the production of cheese, it is of great importance to select the activity levels of lactobacillus cultures that are part of the starter culture. The relevance of the study of morphological, cultural and proteolytic properties of lactobacillus strains that are part of the starter culture is due to the direct influence of these strains on the organoleptic properties and biological value of the final product. Lactic acid bacteria in the starter culture should serve to normalize the microbiome of the gastrointestinal tract, thereby ensuring the functionality of the final product (cheese). The article presents the results of a study of the morphological, cultural and proteolytic properties of lactobacillus strains that are part of the bacterial starter culture used in the production of functional cheeses. It was revealed that all the objects of the study can participate in the proteolysis of casein. Active strains that have shown high results are *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1 - 19.0 ± 0.5 mm, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 and *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, the zone of enlightenment in the latter - 12.0 ± 0.2 mm. Only two strains can participate in gelatin proteolysis - *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 и *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16. According to the results of the work, there is every reason to believe that strains of lactic acid bacteria with high proteolytic activity can be part of the starter culture used for the production of functional cheeses.

Keywords: lactobacillus, casein proteolysis, gelatin proteolysis.

Cheese is a product of enzymatic coagulation of protein produced from milk. The high nutritional value of cheese is explained by the fact that it contains a large amount of protein and essential amino acids [1-3]. Due to the fact that most of the proteins and other nitrogen compounds it contains are in a dissolved state, cheese is easily absorbed and digested by the human body. The dry matter of cheese contains 20 – 55% fat, 1.5 – 3.5% mineral salts, volatile fatty acids, carbonyl compounds, vitamins, calcium, phosphorus, trace elements and enzymes, the energy value fluctuates between 2500-4000 kcal per 1 kg of product, depending on the amount of fat and protein in it [4,5].

By consuming 100 g of cheese, the body can be supplied with a daily amount of calcium. Due to the lack of this trace element, there is a high risk of damage to the apparatus of the musculoskeletal system, bones and teeth in the body. At the same time, a significant amount of vitamin D is found in cheese. Vitamin D ensures the absorption of calcium. As a result of insufficient calcium absorption, the body can go into a deficit state [7, 8]. Therefore, on the way to providing the body with a vitamin and mineral complex, the production of functional cheese and its inclusion in the daily balanced diet of food are of great importance.

In the process of cheese production, many complex biochemical and microbiological processes are carried out. Currently, thanks to the rapid development of Food Biotechnology, the variety of cheeses produced is expanding. The maturation and formation of each type of cheese depends on the quantitative and qualitative characteristics of the microflora, which is included in the initial composition used in production [9-11].

Propionic acid bacteria of various strains and types of lactic acid bacteria (lactococcus, streptococcus, lactobacillus) are used as the main microflora necessary for the production of cheese. Lactic acid bacteria carry out the transformation of the main components of milk-lactose, proteins and fats into taste, aromatic and biologically active substances, and also inhibit the growth of technically harmful microorganisms. The basis for the formation of an industry collection of microorganisms is the isolation of a pure culture of lactic acid bacteria on the way to clotting. The search for competitive bacterial clot cultures, production and preparation of bacterial clot and concentrates are intensively carried out in domestic and foreign research organizations [12-14].

Bacterial clotting cultures form organoleptic and structural-mechanical properties of fermented food products due to the formation of lactic acid, low protein and fat breakdown and slow breakdown, and have proteolytic properties [15-19].

Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria play an important role in supplying cells with nitrogen and amino acids, because the need for these compounds by lactic acid bacteria cells is at a high level. The main function of proteolytic enzymes is to hydrolyze proteins to the form of components so that they can be absorbed by bacterial cells. The proteolytic system of lactic acid

bacteria is formed by proteinase, which is associated with the cell wall, a special system that functions for the transport of peptides and amino acids, and various cytoplasmic peptidases [20].

In recent years, there has been a growing interest in studying the proteolytic activity of lactic acid bacteria in terms of obtaining and using bioactive peptides from food raw materials through a balanced diet. The attention of many scientists is focused on the study of immunomodulatory, antihypertensive and hypocholesterolemic activity of bioactive peptide compounds formed as a result of proteolytic activity of lactic acid bacteria [21-24]. Since the properties of the wort directly depend on the activity of individual strains included in its composition, it is necessary to include industrially valuable strains in the wort composition, and most importantly, strains with high proteolytic activity. An urgent and promising direction in Food Biotechnology is the production of domestic competitive lactic acid bacteria, which have high biochemical activity and biotechnological properties, are used in the production of functional food products.

The purpose of the work is to assess the proteolytic activity of new functionally– active strains of lactic acid bacteria used in the production of cheese.

Materials and methods of research

Pure strains of fresh lactic acid bacteria isolated from natural cow's, goat's milk and homemade goat's milk cheese were used as objects of research in the work.

Several Culture Media have been used for the purpose of culturing *Lactobacillus* strains:

- skimmed sterile milk;
- MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) nutrient medium;
- CJM (cabbage juice medium): yeast autolysate per 1000 ml of cabbage decoction – 10.0 g; peptone – 10.0 g; glucose – 20.0 g; Saso3 - 40.0 g; agar – 20.0 g [25];
- Aikman's milk agar for the study of casein proteolysis: peptone – 10.0-20.0 g per 700 ml of distilled water; NaCl – 5.0 g; glucose – 10.0 g; agar – 20.0 g; 300 ml of sterile skim milk. In this nutrient medium, lactic acid bacteria crops were sown with point deepening on the surface of the agar. The result of the work was measured by the diameter of the opacity zone around the sprouted colony.

-meat peptone gelatin (MPG) nutrient medium for the study of gelatin proteolysis: gelatin in a volume of 15-20% is added to 1000 ml of meat-peptone broth. Research work on the nutrient medium of the EPP was carried out by inoculation using a microbiological trap by injection method on a semi-solid nutrient medium, poured into test tubes in a volume of 10 ml and completely cooled. The proteolytic activity of lactic acid bacteria was assessed by growing along the test tube, forming a precipitate and completely diluting the semi-solid culture medium.

Lactic acid microorganisms were cultured in MRS and CJM culture media at 37°C for 24-36 hours. All research work was carried out with active diurnal crops. The results of the study were determined visually and by microscopic methods. In order to test sterility, MPA (meat-peptone agar) and MPB (meat-peptone broth) culture media were used. The finished culture media were sterilized in an autoclave for 30 minutes at a pressure of 1.5 A. Inoculation and re-grafting of *Lactobacillus* cells, microscopy was carried out using traditional microbiological methods.

Results and discussion

Lactic acid bacteria convert milk sugar – lactose to lactic acid – lactate, lowering the pH value of the medium, resulting in casein clotting and inhibition of the growth of acid-sensitive microorganisms. In many literature, the duration of milk clotting time by lactic acid bacteria is correlated with their activity [26].

On the way to correct identification of lactic acid bacteria, along with the study of their morphological and crop properties, it is important to identify catalase and oxidase activity, since these features are considered characteristic of pathogenic aerobic and facultative anaerobic microorganisms. In order to determine the catalase and oxidase activity of lactic acid bacteria, special test preparations were used in the work. According to the test indicators, it was found that not all crops have catalase and oxidase activity.

In order to determine the activity of milk clotting of lactic acid bacteria, sowing materials were cultured in skimmed sterile milk. The intensity of milk clotting was closely monitored in laboratory conditions. According to the results obtained, *Lactococcus lactis subsp. lactis* SDCM 5123 CH-10, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 and *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 it was found that the milk clotting intensity of the strains was much higher than that of the *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 CH-1 strain.

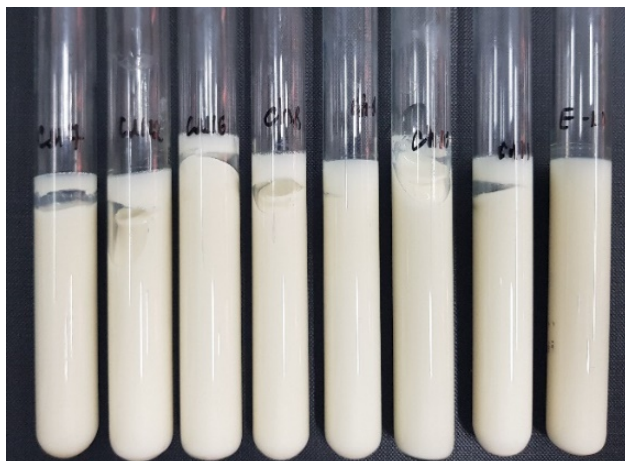


Figure 1 - Milk clotting by lactic acid bacteria

Lactococcus lactis subsp. lactis SDCM 5123 CH-10, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 and *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14 in the course of growth in milk, at 16-18 hours of cultivation, formed a very dense, whey-free homogeneous clot (Figure 1).

One of the main properties of promising lactic acid bacteria, which are part of the preparation used for cheese production, is proteolytic activity. For the study of proteolytic activity, the processes of casein and gelatin proteolysis were considered. Point-depth grafting of the studied strains on the agaric eikman nutrient medium with milk was carried out. Petri dishes were cultured at 37 °C for 48 hours, and after the time, the diameter of the opacity zone was measured (Table 1).

Table 1. Casein proteolysis of lactic acid bacteria

№	Strains	Milk agaric medium
		Opacity area diameter, mm
1	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> S5K8 CM-14	12,0±0,2
2	<i>Streptococcus macedonicus</i> LAB 617 CM-16	10,0±0,5
3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CHE37 Ch-1	19,0±0,5
4	<i>Lactococcus lactis</i> 1881 Ch-8	12,0±0,5
5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> SDCM 5123 CH-10	10,0±0,5
Note: " numbers " - the diameter of the detection zone		

In the course of the work, it was found that all strains are capable of proteolytic casein strains with high proteolytic activity: *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1, *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, a high indicator of proteolytic activity, respectively – in bacils, the hydrolysis zone is 19.0±0.5 mm, in cocs - 12.0±0.2 mm.

The figure clearly shows the opacity zone around the colony of lactic acid bacteria, cultured by point deepening in the milk agaric eikman nutrient medium (Figure 2).

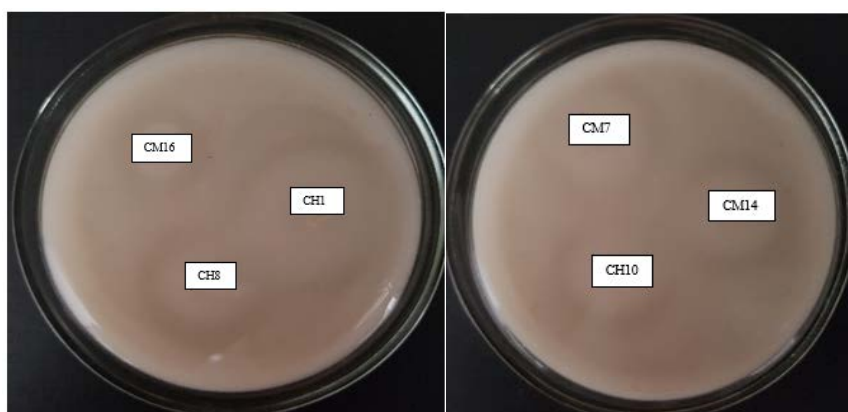


Figure 2 - Casein proteolysis

The next method for determining the proteolytic activity of lactic acid bacteria is the study of the ability of crops to break down gelatin. For this purpose, strains of lactic acid bacteria were cultured in the nutrient medium of the EPC. Lactic acid bacteria injected into a meat-peptone gelatin medium after 48 hours of cultivation at a temperature of 37⁰C. the fact that strains *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 have good gelatin decomposition properties was determined by a change in the medium (Figure 3).

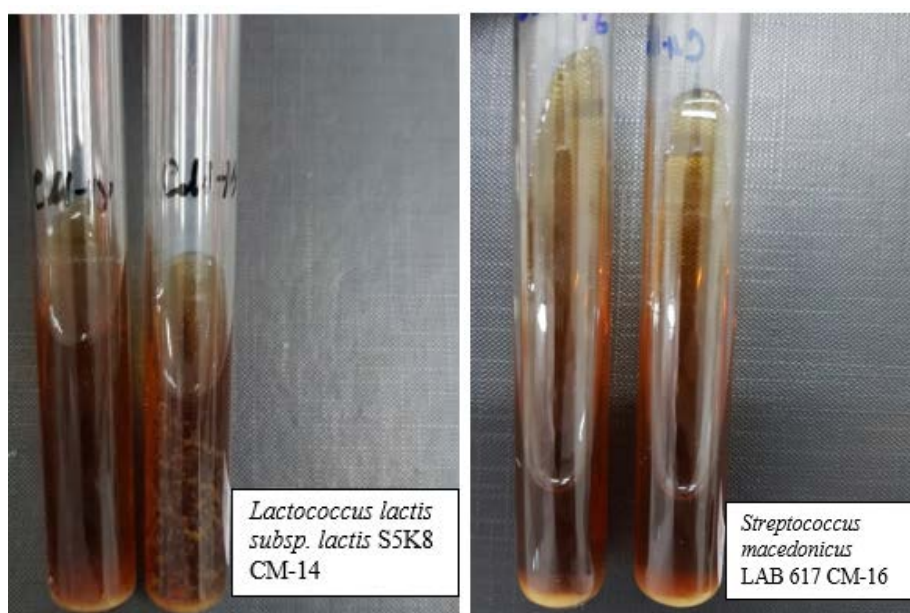


Figure 3 - Gelatin proteolysis

The picture shows the features of the growth of lactic acid bacteria in a semi-solid meat-peptone gelatin nutrient medium. *Lactococcus lactis subsp. lactis* S5K8 CM-14, *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 were observed to be able to grow along a test tube and through the formation of sediment, in addition to completely diluting the nutrient medium of semi-hard meat peptone gelatin. As a result, it turned out that the two mentioned strains can carry out gelatin proteolysis.

Conclusion

In the course of the research work, the proteolytic properties of lactic acid bacteria isolated from natural dairy products were studied. For this purpose, the intensity of proteolysis of casein and gelatin was determined. As a result, it was studied that all strains are capable of proteolysis of

casein. Strains with high activity: *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37 Ch-1-19.0±0.5 mm, *Lactococcus lactis* subsp. *in cultures of lactis* S5K8 CM-14 and *Lactococcus lactis* 1881 Ch-8, an area of opacity was determined in the amount of - 12.0±0.2 mm. In addition, strains with high gelatin proteolysis intensity are *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S5K8 CM-14 and *Streptococcus macedonicus* LAB 617 CM-16 strains.

According to the data on the determination of the proteolysis activity of milk casein and gelatin, strains of lactic acid bacteria with high proteolytic activity are used for inclusion in the composition of yeast cultures for the production of cheese of functional orientation.

References:

- 1 Almena-Aliste M., Mietton B. Cheese classification, characterization, and categorization: A global perspective. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2 (1): 2003-2012. (<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012>)
- 2 Afshari R., Pillidge C.J., Dias D.A., Osborn A.M., Gill H. Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2020, 60 (1): 33-47. (<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>)
- 3 Vacca G.M., Stocco G., Dettori M.L., Summer A., Cipolat-Gotet C., Bittante G., Pazzola M. Cheese yield, cheesemaking efficiency, and daily production of 6 breeds of goats. *Journal of dairy science*, 2018, 101 (9): 7817-7832. (<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14450>)
- 4 Suyunchev O.A., Voblikova T.V. Osobennosti tekhnologii syrov iz koz'ego moloka, Pererabotka moloka, 11, 44-46 (2007). (<https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-proizvodstva-syrov-iz-koziego-moloka>)
- 5 Nam J.H., Cho Y.S., Rackerby B., Goddik L., Park S.H. Shifts of microbiota during cheese production: impact on production and quality. *Applied microbiology and biotechnology*. 2021, 105 (6): 2307-2318. (<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11201-5>)
- 6 Tunick M.H., Van Hekken D.L. Dairy Products and Health: Recent Insights. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63 (43): 9381-9388. (<https://doi.org/10.1021/jf5042454>)
- 7 Silaeva V.M., Saharov S.D. Normalizaciya moloka po zhiru i ee znachimost' dlya syrodeliya. Milk processing, 10, 6-8 (2007). (<http://www.milkbranch.ru/magazine/archive/viewdoc/2007/10/821.html>)
- 8 Tultabaeva T.Ch., Chomanov U., Muhtarhanova R. Myagkij syr iz koz'ego moloka obogashchennyj rastitel'nym belkom, kompleks - kak faktor razvitiya nacional'noj ekonomiki Respubliki Kazahstan: Materialy mezhdunarodnoj nauchno- prakticheskoy konferencii, Semey, 425-427 (2004). (<http://www.science-journal.kg/ru/journal/2/archive/7898>)
- 9 Johnson M.E. A 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of dairy science*, 2017, 100 (12): 9952-9965. (<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12979>)
- 10 Blaya J., Barzideh Z., LaPointe G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of dairy science*, 2018. 101 (4): 3611-3629. (<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>)
- 11 Katechaki E., Panas P., Rapti K., Kandilogiannakis L., Koutinas A.A. Production of hard-type cheese using free or immobilized freeze-dried kefir cells as a starter culture. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, 56 (13): 5316-5323. (<https://doi.org/10.1021/jf703585y>)
- 12 Tultabaeva T.Ch., Chomanov U.Ch. Kombinirovannyj myagkij syr, Agropromyshlennyj kompleks - kak faktor razvitiya nacional'noj ekonomiki Respubliki Kazahstan: Materialy mezhdunarodnoj nauchno- prakticheskoy konferencii, Semey, 418-420 (2004). (<http://www.vestnik.nauka.kz/wp-11content/uploads/2011/06/13pdf>)
- 13 Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford Tom P., Ross R Paul, Fitzgerald G.F., Cotter Paul D. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology reviews*, 2013, 37: 664-698. (<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>)
- 14 Oyeniran A., Ibrahim S.A., Gyawali R., Tahergorabi R., Zimmerman T., Krastanov A. A modified reinforced clostridial medium for the isolation and enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in a mixed culture. *Journal of dairy science*, 2020, 103(6): 5030-5042. (<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17894>)
- 15 Nagaoka S. Yogurt Production. *Methods in molecular biology*, 2019, 1887: 45-54. (https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_5)
- 16 Garcia-Cano I, Rocha-Mendoza D., Ortega-Anaya J., Wang K., Kosmerl E., Jimenez-Flores R. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and

antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103:5243-5257. (<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6>)

17 Ouiddir M., Bettache G., Leyva Salas M., Pawtowski A., Donot C., Brahimi S., Mabrouk K., Coton E., Mounier J. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food Microbiology*, 2019, 82: 160-170. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.020>)

18 Hayek S.A., Gyawali R., Aljaloud S.O., Krastanov A., Ibrahim S.A. Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of Dairy Research*, 2019, 86 (4):490-502. (<https://doi.org/10.1017/S002202991900075X>)

19 Kang W., Pan L., Peng C., Dong L., Cao S., Cheng H., Wang Y., Zhang C., Gu R., Wang J., Zhou H. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(11): 9980-9991. (<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18704>)

20 Camara S.P., Dapkevicius A., Riquelme C., Elias R.B., Silva C., Malcata F.X., Dapkevicius M. Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. *Food Science and Technology International*, 2019, 25(4): 303-317. (<https://doi.org/10.1177/1082013218823129>)

21 Grujovic M.Z., Mladenovic K.G., Nikodijevic D.D., Comic L.R. Autochthonous lactic acid bacteria-presentation of potential probiotics application. *Biotechnology letters*, 2019, 41(11): 1319-1331. (<https://doi.org/10.1007/s10529-019-02729-8>)

22 Gomand F., Borges F., Burgain J., Guerin J., Revol-Junelles A.M., Gaiani C. Food Matrix Design for Effective Lactic Acid Bacteria Delivery. *Annual review of food science and technology*, 2019. 10: 285-310. (<https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121140>)

23 Behare P.V., Mazhar S., Pennone V., McAuliffe O. Evaluation of lactic acid bacteria strains isolated from fructose-rich environments for their mannitol-production and milk-gelation abilities. *Journal of Dairy Science*, 2020. 103 (12): 11138-11151. (<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19120>)

24 Golovin M. A., Ganina V. I., Mashenceva N. G. Holesterinreduciruyushchie probioticheskie bakterii v molochnoj produkcii. *Molochnaya promyshlennost'*. 2014. 5:46-47. (<https://earthpapers.net/razrabotka-probioticheskoy-kompozitsii-s-vysokoy-sposobnostyu-k-reduktsii-holesterina>)

25 Eun J. J., Dae W. M., Joon S. O., Jin S. M., Hyunbin S., Kwang Y. K., Nam S. H. Development of cabbage juice medium for industrial production of leuconostoc mesenteroides starter. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2017, 28;27(12):2112-2118. (<https://doi.org/10.4014/jmb.1708.08050>)

26 Gusev M. V., Mineeva L. A. Molochnokislye bakterii, *Mikrobiologiya*, 4, 15-19 (2004). (<https://www.at.alleng.org/d/bio/bio092.htm>)