

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-3-2589>
<https://elibrary.ru/EJHNSC>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Оценка протеолитической активности применяемых в сыроделии лактобацилл



Н. П. Сорокина*^{ORCID}, О. В. Лепилкина^{ORCID},
А. А. Бруцкая^{ORCID}, Е. В. Топникова^{ORCID}

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия^{ROR}, Углич, Россия

Поступила в редакцию: 14.05.2025
Принята после рецензирования: 17.06.2025
Принята к публикации: 01.07.2025

*Н. П. Сорокина: n.sorokina@fnscps.ru,
<http://orcid.org/0000-0002-1108-3695>
О. В. Лепилкина: <https://orcid.org/0000-0002-2375-3959>
А. А. Бруцкая: <http://orcid.org/0009-0005-4070-8227>
Е. В. Топникова: <http://orcid.org/0000-0003-0225-6870>

© Н. П. Сорокина, О. В. Лепилкина, А. А. Бруцкая,
Е. В. Топникова, 2025



Аннотация.

Увеличение производства сыров разных видов в России выявило необходимость использования дополнительных моновидовых заквасок разнонаправленного действия. Это определило актуальность расширения ассортимента дополнительных заквасок с заданными свойствами за счет создания новых моновидовых концентратов. Среди них особую роль играют культуры с высокой протеолитической активностью, способствующие интенсификации протеолиза, сокращению продолжительности созревания и улучшению органолептических показателей сыров. Цель работы – выявление штаммов мезофильных лактобацилл из коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института маслоделия и сыроделия (г. Углич, Россия) с высокой протеолитической активностью, перспективных для использования в сыроделии.

Исследовали штаммы лактобацилл *Lactiplantibacillus plantarum* 28 и 37, *Lactocaseibacillus casei* 738-11, *Lactocaseibacillus paracasei* K-6, *Lactocaseibacillus rhamnosus* П, *Limosilactobacillus fermentum* 39. Протеолитическую активность оценивали по количеству накапливаемого небелкового азота и буферной емкости водорастворимой фракции сыров.

По результатам культивирования в обезжиренном молоке отобраны два штамма с наибольшей протеолитической активностью: *L. rhamnosus* П и *L. paracasei* K-6, которые использовали в качестве дополнительных культур к основной производственной закваске при выработке сыров. Во время выработки и прессования сыров быстрее накапливалась биомасса *L. rhamnosus* П, а при созревании – *L. paracasei* K-6. Максимальное количество жизнеспособных клеток лактобацилл достигло 8,55 lg КОЕ/г в сырах с *L. rhamnosus* П и 8,94 lg КОЕ/г – с *L. paracasei* K-6. Отмечено более медленное вымирание *L. rhamnosus* П, а также их стимулирующее действие на развитие лактококков. Высокое содержание лактобацилл в сырах (более 10⁸ КОЕ/г) позволяет отнести их к пробиотическим молочным продуктам. В сырах с добавлением *L. paracasei* K-6 и *L. rhamnosus* П отмечалась тенденция к более активному протеолизу: в конце созревания прирост количества небелкового азота составил ~ 20 % относительно контрольных сыров без лактобацилл. При положительном влиянии обоих штаммов на органолептику сыров наиболее высокую оценку за вкус и запах получили сыры с культурой *L. paracasei* K-6, что согласуется с наибольшим изменением буферной емкости водорастворимой фракции этих сыров.

Рекомендовано использовать штаммы *L. paracasei* K-6 и *L. rhamnosus* П в составе моновидовых заквасок для повышения качества сыров и интенсификации производства.

Ключевые слова. Сыроделие, закваски, лактобациллы, протеолитическая активность, созревание, органолептические показатели

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по приоритетным направлениям научно-технологического развития (проект № 075-15-2024-483).

Для цитирования: Сорокина Н. П., Лепилкина О. В., Бруцкая А. Л., Топникова Е. В. Оценка протеолитической активности применяемых в сыроделии лактобацилл. Техника и технология пищевых производств. 2025. Т. 55. № 3. С. 540–551. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-3-2589>

Evaluating the Proteolytic Activity of Lactobacilli in Cheese Production



Ninel P. Sorokina^{*}, Olga V. Lepilkina^{ID},
Anastasiya L. Brutsкая^{ID}, Elena V. Topnikova^{ID}

All-Russian Scientific Research Institute of Butter and Cheesemaking^{OR}, Uglich, Russia

Received: 14.05.2025

Revised: 17.06.2025

Accepted: 01.07.2025

^{*}Ninel P. Sorokina: n.sorokina@fncps.ru,

<http://orcid.org/0000-0002-1108-3695>

Olga V. Lepilkina: <http://orcid.org/0000-0002-2375-3959>

Anastasiya L. Brutsкая: <http://orcid.org/0009-0005-4070-8227>

Elena V. Topnikova: <http://orcid.org/0000-0003-0225-6870>

© N.P. Sorokina, O.V. Lepilkina, A.L. Brutsкая, E.V. Topnikova, 2025



Abstract.

As the range of domestic cheeses has increased, Russian cheese industry needs new monospecific starters with multidirectional or targeted actions. Advanced monospecific concentrates with strong proteolytic properties boost proteolysis, reduce ripening time, and improve the sensory profile of the finished product. This article describes some strains of mesophilic lactobacilli with good prospects for commercial cheese production.

The lactobacilli strains were isolated from the collection of microorganisms of the All-Russian Scientific Research Institute of Butter and Cheese Production, Uglich, Russia. They included *Lactiplantibacillus plantarum* 28 and 37, *Lacticaseibacillus casei* 738-11, *Lacticaseibacillus paracasei* K-6, *Lacticaseibacillus rhamnosus* P, and *Limosilactobacillus fermentum* 39. The proteolytic profile was estimated by the amount of accumulated non-protein nitrogen and the buffer capacity of the water-soluble fraction. The skim-milk cultivation revealed two optimal strains with the highest proteolytic effect, i.e., *L. rhamnosus* P and *L. paracasei* K-6. They served as additional cultures to the main industrial starter.

L. rhamnosus P accumulated biomass faster during processing and pressing; *L. paracasei* K-6 developed more intensively during ripening. The highest count of viable lactobacilli cells reached 8.55 lg CFU/g in the cheese samples with *L. rhamnosus* P and 8.94 lg CFU/g in the samples with *L. paracasei* K-6. *L. rhamnosus* P died slower and demonstrated a stimulating effect on lactococci. The high content of lactobacilli in the experimental cheeses ($\geq 10^8$ CFU/g) made it possible to classify them as dairy probiotics. The samples with *L. paracasei* K-6 and *L. rhamnosus* P proved to be more active proteolytics. By the end of ripening, the experimental samples contained 20% more non-protein nitrogen than the control. The cheeses fortified with *L. paracasei* K-6 received the highest score for taste and aroma, which correlated with the greatest change in the buffer capacity of the water-soluble fraction.

L. paracasei K-6 and *L. rhamnosus* P in monospecific starters proved able to improve the quality of cheese and intensify its production.

Keywords. Cheese production, starters, lactobacilli, proteolytic activity, ripening, sensory properties

Funding. The research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as a major research project in a priority R&D area (grant No. 075-15-2024-483).

For citation: Sorokina NP, Lepilkina OV, Brutsкая AL, Topnikova EV. Evaluating the Proteolytic Activity of Lactobacilli in Cheese Production. Food Processing: Techniques and Technology. 2025;55(3):540–551. (In Russ.) <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-3-2589>

Введение

Производство пищевых продуктов, основанное на использовании молочнокислых микроорганизмов, неразрывно связано с разработкой новых биотехнологических подходов к производству заквасок. Это предусматривает выделение, изучение и использование новых производственно-ценных штаммов заквасочных культур и микробных консорциумов со специфическими биологическими и оптимизированными

технологическими свойствами. Правильный выбор заквасочных культур и характеристика каждого штамма являются наиболее важными факторами для получения продуктов с воспроизводимыми органолептическими и структурными свойствами [1].

Молочнокислые бактерии играют многогранную и разнообразную роль в процессе изготовления сыра. Они участвуют в метаболизме лактозы и цитратов, а также продуцируют липолитические и протеоли-

тические ферменты, воздействующие на молочный жир и белки. Помимо основной функции – выработки молочной кислоты, которая подавляет рост нежелательных микроорганизмов, эти бактерии способствуют созреванию сыра. Их ферменты участвуют в протеолизе, липолизе и преобразовании аминокислот в соединения, непосредственно влияющие на вкус и аромат конечного продукта. Кроме того, заквасочные культуры способствуют созданию устойчивой среды в сыре с точки зрения окислительно-восстановительного потенциала при заданном уровне соли и влаги, что обеспечивает необходимую активность сычужного фермента и рост вторичной микрофлоры [1, 2].

Многие молочнокислые бактерии в настоящее время признаны пробиотиками, т. к. играют важную роль в поддержании нормального функционирования кишечника и стимулировании иммунной системы человека. Чаще всего они принадлежат к родам *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [1].

При изготовлении сыров заквасочные микроорганизмы применяются в виде поливидовых многоштаммовых заквасок и монокультур. Закваски в виде монокультур используются в основном как вспомогательные культуры с целью ускорения процесса созревания и получения желаемого вкуса [1]. Наиболее важными культурами, входящими в состав заквасок для сыроделия, являются молочнокислые бактерии родов *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Leuconostoc*. В США и странах Евросоюза наряду с ними используются представители родов *Pediococcus* и *Oenococcus* [1, 2].

На стадии созревания сыров доминирует протеолиз, который является одной из наиболее сложных ферментативных реакций, происходящих в ферментированных молочных продуктах. Молочнокислые бактерии обладают очень сложной системой протеиназы / пептидазы, которая состоит из трех компонентов: протеиназы, пептидазы и специфических транспортных белков [3–5]. Протеиназы, связанные с клеточной стенкой, иницируют первичный протеолиз вместе с сычужным ферментом – деградацию казеина до высокомолекулярных пептидов, которые подвергаются дальнейшему расщеплению внутриклеточными пептидазами до низкомолекулярных пептидов и аминокислот – вторичному протеолизу. Транспортные системы лактобактерий осуществляют перенос аминокислот и пептидов через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану. На пептидазный транспорт оказывает влияние активная кислотность среды, концентрация растворенного кислорода, наличие в среде пептидов и аминокислот. Механизмы поддержания уровня регуляторных белков или их удаления через клеточный протеолиз определяют органолептические свойства готового продукта [5, 6].

Таким образом, если в первичном протеолизе главная роль принадлежит сычужному ферменту, а молочнокислым бактериям отводится вспомогательная роль, то во вторичном протеолизе ведущая роль отводится

молочнокислым бактериям, которые составляют основную часть микробиома любого вида сыра.

На ранних стадиях созревания сыров в протеолитических процессах участвуют главным образом лактококки, в частности *Lactococcus lactis* и *Lactococcus cremoris*, являющиеся основными заквасочными культурами. Они содержат множество внутриклеточных пептидаз (амидопептидазы, дипептидазы, трипептидазы), гидролизующих образованные вне клетки пептиды на аминокислоты [6]. Лактококки начинают процесс деградации казеина, но их ферментативная способность довольно ограничена и уменьшается по мере созревания сыра. В связи с этим лактококки придают сыру начальные вкусовые характеристики [7]. Для получения высококачественных сыров с выраженным сырным вкусом и ароматом обычно требуется привлечение дополнительных ферментов (протеаз и липаз) или микроорганизмов других видов.

Лактобациллы обладают более высокой протеолитической активностью по сравнению с лактококками. Протеиназы лактобацилл способны метаболизировать широкий спектр казеинов, особенно α_{s1} -, β - и κ -казеин. Внутриклеточные пептидазы молочнокислых палочек продолжают процесс протеолиза, который начали лактококки, и активно участвуют в расщеплении казеина на мелкие пептиды и аминокислоты, влияющие на вкусовой букет и консистенцию зрелого сыра [8, 9]. Протеиназы клеточной стенки лактобацилл являются ключевыми ферментами в их протеолитической системе. Мезофильные и термофильные виды лактобацилл играют важную роль на поздних стадиях созревания сыра и ответственны за более глубокий протеолиз [10]. Их ферментативная активность способствует созданию более сложных вкусов, особенно в твердых сырах [6].

В большинстве сыров, изготовленных как из сырого, так и из пастеризованного молока, обнаруживаются молочнокислые палочки не заквасочного происхождения [11, 12]. Это так называемые автохтонные микроорганизмы молока-сырья, выдерживающие используемую при производстве сыров кратковременную пастеризацию при 72–76 °C в течение 20–25 с [13]. Клетки лактобацилл инактивируются, но в процессе выработки сыров восстанавливаются. Поскольку максимальная температура роста мезофильных палочек составляет 40–45 °C, их развитие после второго нагревания до температуры не выше 42 °C не только не тормозится, но может и продолжаться. Температурный диапазон роста мезофильных лактобацилл в целом составляет от 8 до 45 °C [14], поэтому они способны развиваться как в процессе выработки, так и при созревании сыров.

Концентрация клеток молочнокислых палочек в сырах переменна и зависит от многих факторов: наличия термостойких культур в сыром молоке, санитарно-гигиенического состояния на молочных фермах и на сыродельных заводах [15]. Видовой и штаммовый диапазон автохтонных бактерий, попадающих

в сыр, и оказываемое ими влияние на качество сыров нестабильны и непредсказуемы. Производимый ими эффект может быть как положительным, так и отрицательным. Например, высокая протеолитическая активность автохтонной микрофлоры приводит к быстрому созреванию сыра, но может негативно сказаться на его текстуре, делая продукт слишком мягким или ломким.

Во многих странах растет интерес к автохтонной микрофлоре традиционных оригинальных сыров из сырого молока. Это связано со стремлением повысить стабильность качества и безопасности сыров при сохранении их индивидуальности и узнаваемости. Такие сыры можно считать национальным достоянием. Положительное влияние на качество и безопасность сыров автохтонных молочнокислых палочек, отобранных по технологически значимым свойствам (в том числе по протеолитической активности), доказано в различных исследованиях [16–18]. Во всех случаях отмечается углубление и интенсификация протеолиза при использовании автохтонных лактобацилл как дополнительных культур.

Так, использование автохтонных штаммов лактококка, термофильного стрептококка в качестве основной закваски и молочнокислой палочки *Lactobacillus rhamnosus* BT68 в качестве дополнительной культуры при производстве итальянского традиционного горного сыра Mountain cheese привело к ускорению молочнокислого процесса, снижению содержания энтеробактерий и улучшению общей органолептической оценки продукта по сравнению с контрольным сыром без этих бактерий [18].

Добавление автохтонных мезофильных молочнокислых палочек *Lacticaseibacillus casei* и *Lactiplantibacillus plantarum*, выделенных из традиционного итальянского сыра Pecorino Crotonese из сырого молока и отобранных по ферментативной активности, положительно повлияло на содержание свободных аминокислот и общее качество сыра по сравнению с контрольным вариантом. Концентрация клеток добавленных культур лактобацилл в сырах в течение 120 дней созревания варьировалась на уровне от 7,55 до 7,94 log КОЕ/г [16].

В результате изучения технологических характеристик местных культур молочнокислых бактерий, выделенных из итальянских и бразильских сыров, выявлена высокая активность аминопептидаз N и X у штаммов *L. lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* и *L. rhamnosus*. Nicosia *et al.* заключили, что это свойство лактобацилл может улучшить вкус сыров и, возможно, снизить количество горьких пептидов, которые образуются в результате действия молокосвертывающих ферментов при первичном протеолитическом [17].

В Российской Федерации сыры изготавливают из пастеризованного молока, но и они могут быть хорошим источником для выделения производственных штаммов молочнокислых палочек. В этом случае естественному отбору под влиянием технологических факторов и условий в пищевой матрице,

таких как pH, температура, активность воды, подвергаются не заквасочные лактобациллы.

Выделение автохтонных бактерий из сыров высокого качества и изучение их свойств для понимания возможности использования в составе заквасок является признанной практикой микробиологии сыроделия. В коллекции микроорганизмов Экспериментальной биофабрики Всероссийского научно-исследовательского института маслоделия и сыроделия (ВНИИМС) в настоящее время имеется 42 автохтонные культуры мезофильных молочнокислых палочек, выделенных ранее из высококачественных сыров, изготовленных из сырого и пастеризованного молока без использования молочнокислых палочек заквасочной микрофлоры. Но только 5 из них нашли применение в составе моновидовых дополнительных заквасок молочнокислых палочек: 2 штамма *L. plantarum* и 3 штамма *L. casei*. Эти же виды лактобацилл включены в состав некоторых поливидовых заквасок для сыров. В качестве дополнительной закваски культуры для подавления развития маслянокислых бактерий рекомендуется использовать *L. plantarum*, *L. casei* – для интенсификации созревания полутвердых сыров, а также при изготовлении рассольных сыров.

За счет зарубежных поставок видовой спектр дополнительных культур лактобацилл для российского сыроделия значительно увеличился [19, 20]. Это говорит о востребованности при производстве сыров дополнительных моновидовых культур разнонаправленного действия.

Из-за острой необходимости перехода на использование в пищевой промышленности ингредиентов российского производства и резкого роста производства сыров разных видов, выпускаемых в РФ [21] актуально расширение ассортимента российских дополнительных заквасок с заданными свойствами за счет создания новых моновидовых концентратов.

Цель исследования – выявить штаммы мезофильных молочнокислых палочек из коллекции микроорганизмов ВНИИМС, обладающих высокой протеолитической активностью, с потенциалом использования в составе моновидовых концентратов, целенаправленно влияющих на протеолитические процессы при созревании сыров для повышения их качества и интенсификации производства.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являются культуры мезофильных молочнокислых палочек из коллекции Экспериментальной биофабрики Всероссийского научно-исследовательского института маслоделия и сыроделия (ВНИИМС): *Lactiplantibacillus plantarum* штаммы 28 и 37, *Lacticaseibacillus casei* штамм 738-11, *Lacticaseibacillus paracasei* штамм K-6, *Lacticaseibacillus rhamnosus* штамм П, *Limosilactobacillus fermentum* штамм 39. Культуры лактобацилл были выделены ранее из сыров высокого качества, изготовленных из сырого

или пастеризованного молока без использования бактериальных заквасок с молочнокислыми палочками.

Биохимическую активность и сравнительную идентификацию культур мезофильных лактобацилл осуществляли с использованием тест-системы типа API-50CHL (bioMérieux, Франция) в соответствии с инструкцией к тест-системе с использованием доступа к электронной интернет-базе данных APIWEB для интерпретации результатов, полученных на стрипах API (bioMérieux, Франция).

Подготовку молочнокислых палочек к исследованию проводили в стерильном обезжиренном молоке в течение 24 ± 1 ч при температуре 37 ± 1 °C. Протеолитическую активность указанных культур оценивали по количеству растворимых небелковых азотистых веществ, образующихся в результате протеолиза белков восстановленного обезжиренного молока. Для этого сухое обезжиренное молоко восстанавливали дистиллированной водой с расчетом получения 10 % сухих веществ и стерилизовали при температуре 121 ± 1 °C с выдержкой в течение 10 мин. В подготовленное молоко вносили по 1 % 24-часовой культуры молочнокислых палочек, культивировали при температуре 37 ± 1 °C в течение 24 ± 1 ч, затем выдерживали в течение 30 суток при температуре 11 ± 1 °C, соответствующей температурным условиям созревания полутвердых сыров.

Количество растворимых небелковых азотистых веществ определяли сразу после культивирования при температуре 37 ± 1 °C (0 суток), через 15 и 30 суток выдержки при температуре 11 ± 1 °C. В пробы сквашенного молока вносили трихлоруксусную кислоту концентрацией 5 % для осаждения всех белков, разделяли смеси на осадок и надосадочную фракцию центрифугированием при 5000 об/мин. В надосадочной фракции определяли массовую долю небелкового азота методом Кьельдаля. Для дальнейших исследований отбирали культуры, в результате действия которых образовалось наибольшее количество небелковых азотистых соединений, что являлось признаком наибольшей протеолитической активности.

Эффективность действия отобранных штаммов молочнокислых палочек проверяли на сырах, изготовленных в экспериментально-технологическом цехе ВНИИМС по технологической схеме производства полутвердого сыра Российский с низкой температурой второго нагревания, формуемого насыпью, с массовой долей жира в сухом веществе 50 %. Выработки проводили из коровьего молока-сырья хозяйств Ярославской области (ООО «АгриВолга», Россия). Молоко контролировали как по общим критериям качества, так и по специфическим критериям сыропригодности стандартизованными методами (титруемая кислотность, плотность, группа чистоты, массовая доля жира, массовая доля белка, количество спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий, КМАФАнМ, количество соматических клеток, ингибирующие ве-

щества, сычужная проба). Пастеризацию молока проводили при температуре 73 ± 1 °C с выдержкой в течение 20–25 с. Посолку отпрессованных сыров проводили в рассоле. Созревание сыров проходило при температуре 11 ± 1 °C в течение 60 суток.

При изготовлении контрольных сыров использовали основную производственную закваску (из концентрированной поливидовой закваски БК-Углич-№4, ВНИИМС, г. Углич), имеющей в составе *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. При производстве опытных сыров, кроме основной поливидовой закваски БК-Углич-№4, дополнительно вносили культуры молочнокислых палочек, отобранные по признаку высокой протеолитической активности. Доза основной закваски составляла 0,8 %, дополнительных культур – 0,1 %.

На этом этапе объектами исследования были нормализованная молочная смесь для выработки сыра и изготовленные из нее контрольные и опытные сыры в процессе созревания в течение 60 суток. В нормализованной смеси определяли массовую долю жира кислотным методом по ГОСТ 5867-2023 «Молоко и молочные продукты. Методы определения жира».

В процессе созревания через каждые 15 суток в сырах определяли:

- количество жизнеспособных клеток лактококков посевом на агар с гидролизированным молоком и молочнокислых палочек – посевом на подкисленную среду MRS согласно ГОСТ 33951-2016 «Молоко и молочные продукты. Методы определения молочнокислых микроорганизмов»;
- массовую долю небелкового азота методом Кьельдаля по аттестованной методике измерений (ФР.1.31.2022.42669);
- буферную емкость водорастворимой фракции сыров по аттестованной методике измерений (ФР.1.31.2023.47248).

Органолептическую оценку сыров проводили в возрасте 45 и 60 суток по ГОСТ 33630-2015 «Сыры и сыры плавленые. Методы контроля органолептических показателей» комиссией, состоящей из пяти человек с квалификацией «отобранный эксперт-дегустатор».

Исследования проводили в трехкратной повторности. Для визуализации и статистической обработки результатов использовали программу «Microsoft Excel 2010». Для оценки статистически значимых различий между исследуемыми вариантами применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Для проведения парного сравнения выборок использовали апостериорные критерии Тьюки. Статистически значимый результат оценивали при $p \leq 0,05$.

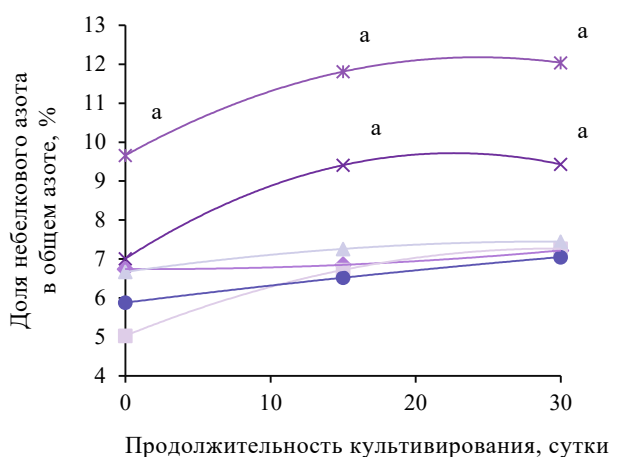
Результаты и их обсуждение

Исследование по оценке биохимической активности лактобацилл показало, что все штаммы способны сбраживать глюкозу, галактозу, лактозу, мальтозу,

фруктозу, трегалозу, рибозу, маннит, сорбит, салицин. И только штамм *Lacticaseibacillus rhamnosus* П ферментировал рамнозу. Результаты идентификации лактобацилл, полученные из электронной интернет-базы данных APIWEB для интерпретации результатов исследований биохимической активности, подтвердили видовую принадлежность культур с индексом достоверности 99,7 % штамма *Lacticaseibacillus paracasei* К-6 и 99,9 % всех остальных культур.

Результаты исследования изменения количества растворимого небелкового азота (в % к общему азоту) в восстановленном обезжиренном молоке при культивировании в нем исследуемых культур мезофильных молочнокислых палочек представлены на рисунке 1.

Полученные результаты свидетельствуют о различной протеолитической активности исследованных штаммов лактобацилл. Различия наблюдаются сразу по окончании культивирования при оптимальной температуре в течение 24 ± 1 ч (0 суток). Наиболее активное накопление небелкового азота в этот период произошло в пробе молока с культурой *L. rhamnosus* П. К началу выдержки при 11 ± 1 °С доля небелкового азота в общем азоте была высокой (9,5 %) и продолжала активно увеличиваться в течение следующих 15 суток:



а – данные, имеющие существенные различия ($p < 0,05$)

- ◆ *Lacticaseibacillus plantarum* 28
- *Lacticaseibacillus plantarum* 37
- ▲ *Lacticaseibacillus casei* 738-11
- × *Lacticaseibacillus paracasei* К-6
- ✱ *Lacticaseibacillus rhamnosus* П
- *Limosilactobacillus fermentum* 39

Рисунок 1. Изменение количества растворимого небелкового азота в обезжиренном молоке при культивировании лактобацилл (зависимости построены по средним значениям, отклонения от среднего составляют 5–10 отн.%)

Figure 1. Amounts of soluble non-protein nitrogen in skim milk during lactobacilli cultivation: mean values, 5–10% deviation

прирост составил 2,5 %. В промежутке выдержки от 15 до 30 суток накопление растворимого небелкового азота проходило очень медленно, оставшись на уровне 12 %.

В пробе молока с культурой *L. paracasei* К-6 произошла некоторая задержка в накоплении небелкового азота на первой стадии культивирования при температуре 37 °С. К началу выдержки при 11 ± 1 °С этот показатель находился на уровне 7 % и через 30 суток увеличился до 9,5 % с таким же характером изменения, как и у штамма *L. rhamnosus* П.

Культуры *Lactiplantibacillus plantarum* 28 и *Lacticaseibacillus casei* 738-11 при таком же стартовом количестве небелкового азота, как и у штамма *L. paracasei* К-6 (~7 %), показали очень низкую протеолитическую активность после 30 суточной выдержки при температуре 11 ± 1 °С, продемонстрировав этим сильную зависимость от температурных условий культивирования. За 30 суток при температуре культивирования 11 ± 1 °С прирост доли небелкового азота в общем азоте в пробах молока с этими штаммами составил менее 1 %.

В пробах молока со штаммами *Lactiplantibacillus plantarum* 37 и *Limosilactobacillus fermentum* 39 при стартовых значениях небелкового азота в диапазоне от 5 до 6 % при выдержке в тех же условиях количество небелкового азота в общем азоте увеличилось всего на 1–2 %.

Исследованные штаммы мезофильных молочнокислых палочек обладали разной протеолитической активностью как в процессе их культивирования при оптимальной температуре 37 ± 1 °С, так и при температуре, соответствующей температурным условиям созревания полутвердых сыров – 11 ± 1 °С. Наибольшую протеолитическую активность проявили культуры *L. rhamnosus* П и *L. paracasei* К-6, которые были отобраны для дальнейших исследований в качестве дополнительных культур при выработке сыров.

Высокая протеолитическая активность культур *L. rhamnosus* и *L. paracasei* выявлена и другими исследователями [17, 22]. Однако данные об уровне протеолитической активности молочнокислых палочек в публикациях различных авторов существенно различаются, что объясняется использованием различных методов при проведении исследований и свидетельствует о штаммовом характере этого свойства. Так, при изучении 137 культур молочнокислых бактерий, выделенных из различных ферментированных молочных продуктов, американские ученые выявили наличие протеолитической активности у 61,3 % исследованных штаммов. Но высокая протеолитическая активность была установлена только у 7 штаммов: одного штамма *L. casei*, двух штаммов *L. paracasei*, двух штаммов *L. plantarum* и двух культур педиококков [23].

Отобранные штаммы (*L. rhamnosus* П и К-6) использовали в качестве дополнительных культур к основной производственной закваске, изготовленной из БК-Углич-№4, с целью установления их влияния

на процесс созревания и органолептические показатели формируемых насыпью сыров с низкой температурой второго нагревания.

Исследование по оценке влияния лактобацилл на процесс созревания сыров. При развитии в процессе выработки и созревания сыров сложных консорциумов микроорганизмов взаимоотношения между различными видами и штаммами имеют разный характер – симбиотический, антагонистический, индифферентный. В экосистеме, которую представляет собой сыр, микроорганизмы могут взаимодействовать напрямую посредством физического контакта, кворумного сенсора, симбиоза, паразитизма, хищничества и ингибирования [24].

Положительные взаимодействия между ассоциированными микроорганизмами имеют решающее значение для достижения улучшенных процессов ферментации и преобразования субстрата при производстве ферментированных продуктов питания [25]. Однако взаимодействия в совместных культурах молочнокислых бактерий изучены мало, за исключением хорошо охарактеризованной совместной культуры, используемой для производства йогурта. Вместе с тем известно, что молочнокислые бактерии являются многофункциональными микроорганизмами, которые демонстрируют значительный потенциал для создания положительных взаимодействий между собой [26]. Напротив, возникновение антагонистического взаимодействия между компонентами закваски может негативно отразиться на качестве и безопасности сыров. В связи с этим было исследовано развитие лактококков, обеспечивающих необходимый уровень молочнокислого брожения, и лактобацилл в процессе выработки и созревания сыров из нормализованной молочной смеси, полученной путем нормализации молока-сырья обезжиренным молоком до соотношения жир:белок и ее пастеризации при принятых в сыроделии режимах.

Исходное молоко-сырье характеризовалось следующими показателями: титруемая кислотность – 16,0–17,0 °Т; плотность – 1028,8–1029,3 кг/м³; группа чистоты 1 класса; массовая доля жира – 4,24–4,35 %; массовая доля белка – 3,21–3,27 %; количество спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий – 2,5–6,0 НВЧ спор/см³; КМАФАнМ – $2,3 \times 10^4$ – $8,4 \times 10^4$ КОЕ/см³; количество соматических клеток – 357–395 тыс. клет./см³; ингибирующие вещества отсутствовали; сычужная проба 1 класса.

Наблюдения за процессом свертывания нормализованных смесей для изготовления контрольных и опытных образцов сыров не выявили значимых различий по продолжительности процесса, характеристикам плотности сгустка, внешнему виду и физико-химическим показателям образуемой при его разрезании сыворотки, а также уровню pH сыров после прессы.

На рисунке 2 представлена динамика развития жизнеспособных клеток лактококков в процессе выработки и созревания сыров.

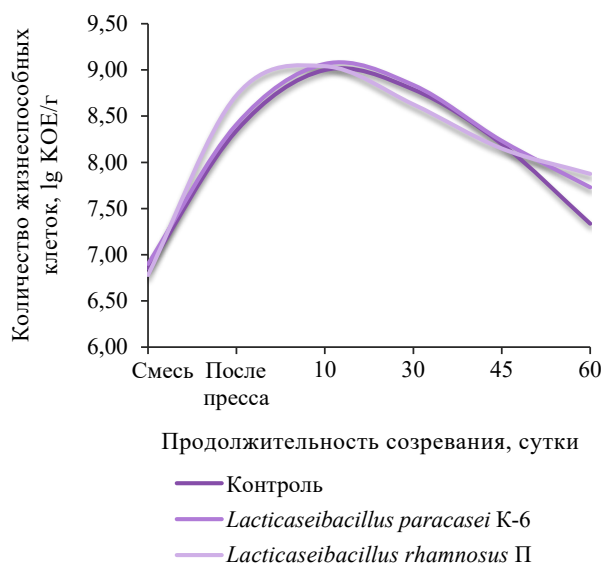


Рисунок 2. Динамика развития лактококков в сырах (зависимости построены по средним значениям, отклонения от среднего составляют 5–10 отн.%)

Figure 2. Lactococci development in cheeses: mean values, 5–10% deviation

В сырах, изготовленных с дополнительной культурой *L. rhamnosus* П, после прессы количество жизнеспособных клеток лактококков было в 2,4 раза больше, чем в контрольном варианте, изготовленном с закваской из БК-Углич-№4 без внесения дополнительных культур.

Это может быть следствием стимулирующего воздействия молочнокислых палочек *L. rhamnosus* П на размножение лактококков в процессе выработки и пресования сыров. Возможно, что это обусловлено более высокой протеолитической активностью, обнаруженной у данного штамма при его развитии в молоке, поскольку известно о наличии сложных питательных потребностей у культур лактококков. Молочным лактококкам, в отличие от растительных, для роста требуется несколько аминокислот: изолейцин, лейцин, валин, гистидин, а иногда аргинин, метионин, пролин и / или глутамин [27], которые они должны получать в свободном виде из молока. Свободных аминокислот и других форм азотистых соединений в молоке недостаточно, поэтому расщепление белков протеолитическими ферментами культуры *L. rhamnosus* П при их совместном развитии могло привести к удовлетворению этих потребностей и стимулированию их размножения.

Максимальное содержание лактококков отмечено во всех вариантах в 10–15 суточном возрасте: от 460 млн КОЕ/г ($\lg = 8,66$) до 1175 млн КОЕ/г ($\lg = 9,07$). Выявлена более высокая интенсивность вымирания лактококков в контрольном сыре после 45 суток созревания, в результате чего концентрация их клеток в 60 суточном возрасте была ниже на 0,52 $\lg$ КОЕ/г по сравнению с опытными сырами,

выработанными с дополнительными культурами молочнокислых палочек.

На рисунке 3 представлены результаты развития лактобацилл в опытных сырах с дополнительными культурами. В контрольном сыре без внесения дополнительных культур посевом на среду МРС контролировали рост молочнокислых палочек не заквасочного происхождения. В смеси для выработки сыра их исходное количество составило от 13 до 20 КОЕ/г. На протяжении всего периода созревания количество этих микроорганизмов увеличилось на 2 порядка и не превысило 5×10^3 КОЕ/г (данные на рис. 3 не представлены).

Исследованные культуры молочнокислых палочек развивались в сырах с разной интенсивностью. В процессе выработки и прессования быстрее накапливалась бактериальная масса штамма *L. rhamnosus* П, количество жизнеспособных клеток которого к концу прессования увеличилось в 6 раз, а количество клеток штамма *L. paracasei* К-6 – только в 2,3 раза.

За первые 10 суток созревания сыров характер развития палочек изменился: штамм *L. rhamnosus* П размножался медленнее – число его клеток возросло на 1,61 lg КОЕ/г, в то время как содержание клеток *L. paracasei* К-6 увеличилось на 2,24 lg КОЕ/г. Таким образом, концентрация жизнеспособных клеток *L. paracasei* К-6 в 10 суточном сыре превысила содержание клеток штамма *L. rhamnosus* П на 0,32 lg КОЕ/г. После 45 суток созревания в сырах обоих вариантов начиналось медленное вымирание молочнокислых палочек, при этом штамм *L. paracasei* К-6 вымирал более интенсивно. Число его клеток снизилось на 0,50 lg КОЕ/г за последующие 15 суток созревания,

а количество клеток штамма *L. rhamnosus* П уменьшилось незначительно – всего на 0,013 lg КОЕ/г.

Польскими исследователями установлена несколько более высокая интенсивность вымирания лактобацилл при изготовлении полутвердого сыра Эдам с культурами *Lactobacillus acidophilus* NCFM и *Lactobacillus rhamnosus* HN001. Согласно их данным, максимальное количество клеток молочнокислых палочек достигло 8,3 lg КОЕ/г, а к концу созревания снизилось примерно на 1 lg КОЕ/г и составило ~ 7,0 lg КОЕ/г [28]. Это количество клеток лактобацилл ниже, чем в исследованных нами сырах на 1 порядок.

Высокое содержание жизнеспособных клеток лактобацилл видов *L. paracasei* и *L. rhamnosus* в зрелом сыре свидетельствует о том, что сыр может служить довольно надежным источником пробиотических лактобацилл, поскольку они относятся к широко используемым видам пробиотических молочнокислых бактерий наряду с *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri* [29]. При этом нормативное содержание молочнокислых бактерий в пробиотических молочных продуктах должно составлять не менее 10^7 КОЕ/г, в экспериментальных сырах оно превышает 10^8 КОЕ/г. Употребление 20 г сыра может обеспечить поступление в организм более 1 млрд полезных бактерий. Следовательно, несомненный интерес представляет изучение пробиотических свойств исследованных, а также других коллекционных штаммов молочнокислых палочек для улучшения органолептических показателей сыров с одновременным повышением их пробиотических свойств.

Протеазы мезофильных молочнокислых бактерий в основном активны в отношении пептидов, уже присутствующих в сыре в больших количествах в результате начального протеолиза казеина, вызванного молокосвертывающим ферментом [30]. В связи с этим оценку протеолитической активности лактобактерий целесообразно проводить по количеству образующихся растворимых низкомолекулярных продуктов протеолиза. Особое значение при этом имеют небелковые азотистые вещества, присутствие которых свидетельствует о глубине и, следовательно, активности протеолиза в сыре.

На рисунке 4 представлено изменение количества небелковых азотистых веществ при созревании контрольного сыра, изготовленного только с основной закваской, и опытных сыров с добавленными к основной закваске культурами *L. paracasei* К-6 и *L. rhamnosus* П.

На протяжении всего исследованного периода созревания сыров всех вариантов количество небелковых азотистых веществ увеличивалось: в первые 30 суток – наиболее интенсивно, затем – с замедлением. После 30 суток созревания наметилась явная тенденция к более активному протеолизу в сырах с добавлением культур *L. paracasei* К-6 и *L. rhamnosus* П по сравнению с контрольным сыром. В конце созревания эта разница увеличилась еще более значительно.

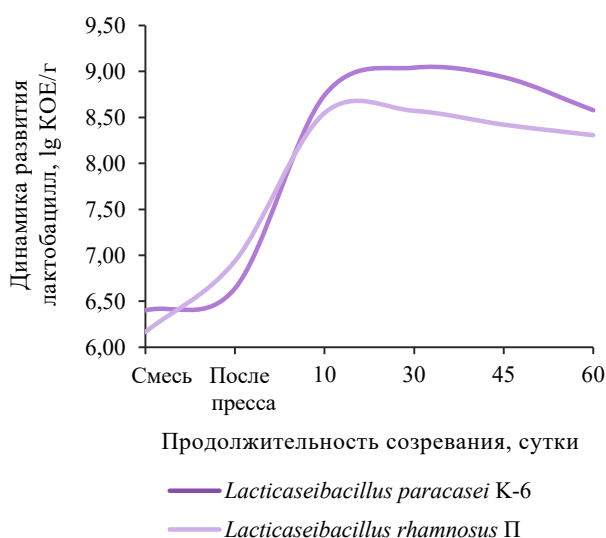


Рисунок 3. Динамика развития лактобацилл в сырах (зависимости построены по средним значениям, отклонения от среднего составляют 5–10 отн.%)

Figure 3. Lactobacilli development in cheeses: mean values, 5–10% deviation

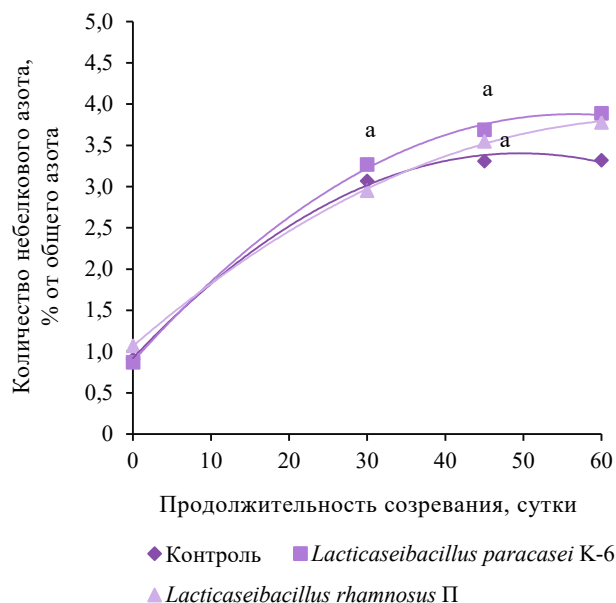


Рисунок 4. Изменение количества небелковых азотистых соединений в сырах (зависимости построены по средним значениям, отклонения от среднего составляют 5–10 отн.%), а – данные, имеющие существенные различия с контрольными образцами сыра ($p < 0,05$)

Figure 4. Amounts of non-protein nitrogen compounds in cheeses: mean values, 5–10% deviation

При созревании сыров изменялась буферная емкость водорастворимой фракции. Этот показатель также используется для оценки процесса созревания сыра. Но в отличие от количества растворимого небелкового азота, которое связано только с протеолизом, буферная емкость водорастворимой фракции характеризует накопление комплекса веществ, образующихся при созревании сыра не только в результате протеолиза, но и в результате появления других кислых соединений. Помимо растворимых белков и небелковых азотистых соединений, она обусловлена присутствием в сыре различных органических кислот, в основном молочной кислоты и ее солей, а также гидрофосфатов, цитратов, карбонатов, диоксида углерода и других химических соединений. В совокупности с растворимыми азотистыми соединениями эти вещества составляют буферную систему, сохраняющую определенную величину pH как при добавлении небольшого количества щелочи, так и при разведении. Таким образом, величина буферной емкости характеризует процесс созревания сыра по совокупности образующихся веществ. Вещества, переходящие в водорастворимую форму при созревании сыра, играют важную роль в формировании его органолептических характеристик.

На рисунке 5 показано изменение буферной емкости сыров, изготовленных с дополнительными культурами *L. rhamnosus* П и *L. paracasei* К-6, в сравнении

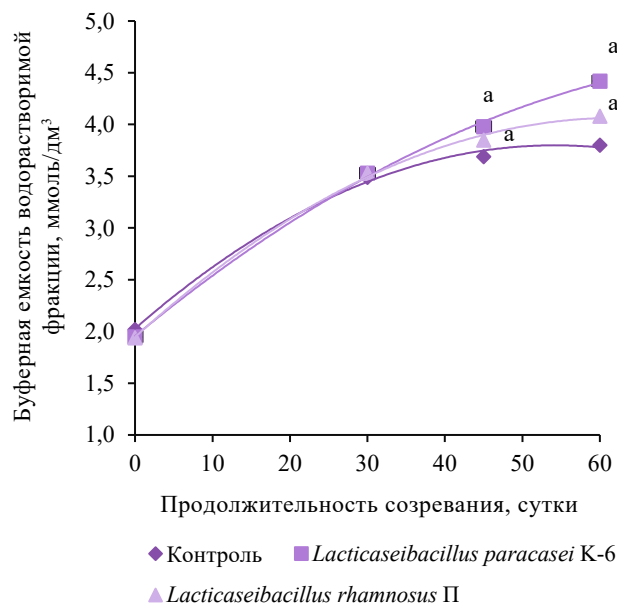


Рисунок 5. Изменение буферной емкости водорастворимой фракции сыров (зависимости построены по средним значениям, отклонения от среднего составляют 5–10 отн.%), а – данные, имеющие существенные различия с контрольными образцами сыра ($p < 0,05$)

Figure 5. Buffer capacities of water-soluble fraction in cheeses: mean values, 5–10% deviation

с контролем – сыром, который изготовили с использованием основной закваски.

Полученные данные повторяют тенденцию изменения количества небелковых азотистых соединений, обозначенную на рисунке 4. Буферная емкость водорастворимой фракции всех исследованных вариантов сыров увеличивалась по мере их созревания. В течение первых 30 суток различий между контрольным и опытными сырами практически не наблюдалось. В последующий период созревания наименьшие изменения величины буферной емкости произошли в контрольном сыре, наибольшие – в сыре с дополнительной культурой *L. paracasei* К-6. Сыры с дополнительной культурой *L. rhamnosus* П к концу созревания по величине буферной емкости заняли промежуточное положение между контролем и сыром с *L. paracasei* К-6.

Полученные результаты согласуются с результатами органолептической оценки вкуса и запаха сыров, представленными в таблице. В соответствии с ними самую высокую оценку за вкус и запах в 60 суточном возрасте (стадия кондиционной зрелости) получили сыры, изготовленные с дополнительной культурой *L. paracasei* К-6. По сравнению с контролем и сырами с *L. rhamnosus* П на фоне их выраженного сырного вкуса и аромата экспертами отмечены яркие сливочные ноты и гармоничный букет.

Таблица. Характеристика вкуса и запаха сыров

Table. Sensory evaluation of cheeses: taste and aroma

Вариант	45 суток созревания		60 суток созревания	
	Характеристика	Балл	Характеристика	Балл
Контроль	Выраженный сырный вкус, но слабый аромат, кисловатый	39,0 ± 0	Выраженный сырный вкус и аромат, кисловатый	40,0 ± 0,7
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> К-6	Выраженный сырный вкус и аромат, кисловатый (сливочные ноты, гармоничный букет)	39,5 ± 0,3	Выраженный сырный вкус (яркие сливочные ноты, гармоничный букет)	42,0 ± 0,7
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> П	Выраженный сырный вкус и аромат (сливочные ноты)	40,5 ± 0,3	Выраженный сырный вкус и аромат, кисловатый (сливочные ноты)	41,3 ± 0,4

Органолептическая оценка сыров подтвердила положительное влияние мезофильных лактобацилл *L. paracasei* К-6 и *L. rhamnosus* П на вкус и аромат сыров при добавлении их к основной закваске. Оно отмечалось уже через 45 суток созревания (за несколько дней до стадии кондиционного зрелости, которая составляет 60 суток). Если в контрольном сыре в это время был отмечен слабый сырный аромат, то в опытных сырах он был уже хорошо выражен. Во вкусе опытных сыров дегустаторами были отмечены выраженные сливочные ноты, которые в контрольном сыре не были зафиксированы и в стадии кондиционной зрелости. Кроме того, эксперты единогласно подчеркнули долгое приятное послевкусие при дегустационной оценке опытных сыров. Достоверных различий в консистенции, рисунке и цвете сыров установлено не было.

Выводы

Проведенные исследования показали штаммовый характер протеолитической активности исследованных коллекционных культур мезофильных лактобацилл. При культивировании в молоке при оптимальной температуре 37 ± 1 °C и при температуре, соответствующей условиям созревания полутвердых сыров – 11 ± 1 °C, из шести исследованных культур лактобацилл наибольшую протеолитическую активность проявили штаммы *Lacticaseibacillus rhamnosus* П и *Lacticaseibacillus paracasei* К-6.

В сырах, изготовленных с внесением *L. rhamnosus* П и *L. paracasei* К-6 в качестве дополнительных культур к основной закваске БК-Углич-№4, состоящей из лактококков и лейконостокков, прирост количества небелкового азота к концу созревания составил ~20 % относительно этого показателя в контрольных сырах без дополнительных культур.

Во время выработки и прессования сыров быстрее накапливалась биомасса штамма *L. rhamnosus* П, а при последующем созревании более интенсивно развивалась культура *L. paracasei* К-6. Максимальная концентрация жизнеспособных клеток достигла 8,55 lg КОЕ/г в сырах с *L. rhamnosus* П и 8,94 lg КОЕ/г – с *L. paracasei* К-6. Отмечено более медленное вымирание культуры *L. rhamnosus* П, а также ее стимулирующее действие на развитие лактококков при изготовлении сыров.

Высокое содержание молочнокислых бактерий в экспериментальных сырах (более 10^8 КОЕ/г) позволяет отнести их к полезным для здоровья пробиотическим молочным продуктам, т. к. оно существенно превышает установленную норму (не менее 10^7 КОЕ/г).

Исследованные дополнительные культуры лактобацилл имели положительное влияние на вкус и аромат сыров. Наиболее высокую оценку за вкус и запах получили сыры с дополнительной культурой *L. paracasei* К-6, что согласуется с наибольшим изменением величины буферной емкости водорастворимой фракции этих сыров.

Полученные результаты позволяют рекомендовать использование штаммов мезофильных молочнокислых палочек *L. paracasei* К-6 и *L. rhamnosus* П в составе моновидовых дополнительных заквасок, целенаправленно влияющих на протеолитические процессы при созревании сыров, для повышения их качества и интенсификации производства.

Перспективным направлением продолжения исследований является изучение пробиотических свойств штаммов *L. paracasei* К-6 и *L. rhamnosus* П и других коллекционных культур молочнокислых палочек для использования в сыроделии с целью улучшения качества и повышения пробиотических свойств сыров.

Критерии авторства

Н. П. Сорокина – организация и руководство проведением исследования, анализ литературы и результатов экспериментов, написание статьи; О. В. Лепилкина – анализ литературы и результатов экспериментов, написание статьи; А. Л. Бруцкая – проведение экспериментов, обработка результатов; Е. В. Топникова – участие в проведении исследований и анализе результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов в отношении исследования, авторства и / или публикации данной статьи.

Contribution

N.P. Sorokina organized and supervised the research, wrote the review, analyzed the experimental results, and drafted the manuscript; O.V. Lepilkina wrote the review,

analyzed the experimental results, and drafted the manuscript; A.L. Brutsкая conducted the experiments and processed the results; E.V. Topnikova participated in the experimental research and analyzed the results.

Conflict of interest

The authors declared no potential conflict of interest regarding the research, authorship, and / or publication of this article.

Список литературы / References

1. Coelho MC, Malcata FX, Silva CCG. Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: From starter cultures to probiotic functions. *Foods*. 2022;11(15):2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>
2. Функ И. А., Отт Е. Ф., Орлова Т. Н., Дорофеев Р. В., Шевченко К. Е. Лактобациллы и их применение в биотехнологии. Молочная промышленность. 2020. № 6. С. 19–21. [Funk IA, Ott EF, Orlova TN, Dorofeev RV, Shevchenko KE. Lactobacilli and their use in biotechnology. Dairy industry. 2020;(6):19–21. (In Russ.)] <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-06-19-20>
3. Лепилкина О. В., Григорьева А. И. Ферментативный протеолиз при преобразовании молока в сыр. Пищевые системы. 2023. Т. 6. № 1. С. 36–45. [Lepilkina OV, Grigorieva AI. Enzymatic proteolysis during the conversion of milk into cheese. Food systems. 2023;6(1):36–45. (In Russ.)] <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45>
4. Китаевская С. В., Пономарев В. Я., Решетник О. А. Оценка протеолитической активности новых штаммов лактобацилл с криорезистентными свойствами. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. № 1. С. 76–86. [Kitaevskaya SV, Ponomarev VY, Reshetnik OA. Evaluation of the proteolytic activity of new cryoresistant lactobacillus strains. Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2022;12(1):76–86. (In Russ.)] <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-1-76-86>
5. Альхатиб К. М., Данильчук Т. Н. Использование протеолитических свойств биомассы молочнокислых микроорганизмов для создания новых продуктов питания. Health, Food & Biotechnology. 2022. Т. 4. № 4. С. 65–77. [Alkhateeb KM, Danilchuk TN. Using the proteolytic properties of the biomass of lactic acid microorganisms to create new food products. Health, Food & Biotechnology. 2022;4(4):65–77. (In Russ.)] <https://doi.org/10.36107/hfb.2022.i4.s160>
6. Kieliszek M, Pobiega K, Piwowarek K, Kot AM. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*. 2021;26(7):1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>
7. Gänzle MG. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*. 2015;2:106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
8. Kurbanova M, Voroshilin R, Kozlova O, Atuchin V. Effect of lactobacteria on bioactive peptides and their sequence identification in mature cheese. *Microorganisms*. 2022;10(10):2068. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102068>
9. Afshari R, Pillidge CJ, Dias DA, Osborn AM, 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>
10. Choi J, Han HU. Microbial proteases in fermentation. In: Ray RC, Montet D, editors. Fermented foods, part II. Technological interventions. Boca Raton: CRC Press; 2015. pp. 103–121.
11. Abarquero D, Duque C, Bodelón R, López I, Muñoz J, et al. Autochthonous cultures to improve the quality of PGI Castellano cheese: Impact on proteolysis, microstructure and texture during ripening. *Food Research International*. 2024;186:114306. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114306>
12. Choi J, Lee SI, Rackerby B, Frojen R, Goddik L, et al. Assessment of overall microbial community shift during Cheddar cheese production from raw milk to aging. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020;104(14):6249–6260. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10651-7>
13. Wilbey RA. Heat treatment of foods. Principles of pasteurization. In: Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). London: Academic Press; 2014. pp. 169–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00159-2>
14. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(4):2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
15. Gobbetti M, de Angelis M, di Cagno R, Mancini L, Fox PF. Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/Adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*. 2015;45(2):167–178. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.016>
16. de Pasquale I, di Cagno R, Buchin S, de Angeli SM, Gobbetti M. Use of autochthonous mesophilic lactic acid bacteria as starter cultures for making Pecorino Crotonese cheese: Effect on compositional, microbiological and biochemical attributes. *Food Research International*. 2019;116:1344–1356. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.024>
17. Nicosia FD, Pino A, Maciel GLR, Sanfilippo RR, Caggia C, et al. Technological characterization of lactic acid bacteria strains for potential use in cheese manufacture. *Foods*. 2023;12(6):1154. <https://doi.org/10.3390/foods12061154>

18. Carafa I, Stocco G, Franceschi P, Summer A, Tuohy KM, *et al.* Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter and non-starter cultures for the production of Traditional Mountain cheese. *Food Research International*. 2019;115:209–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.069>
19. Карычев Р, Елисеева Т. Бактериальные культуры «Crealat» и натуральные ферменты «Crearen» – ваш успех в производстве сыров. Сыроделие и маслоделие. 2018. № 9. С. 28–29. [Karychev R, Eliseeva T. Bacterial cultures “Crealat” and natural enzymes “Crearen” – Your success in cheese production. *Cheese- and buttermaking*. 2018;(9):28–29. (In Russ.)]
20. Кашина Е. Д. Возможности расширения горизонтов. Сыроделие и маслоделие. 2020. № 3. С. 33–35. [Kashina ED. Opportunities for expanding horizons. *Cheese- and buttermaking*. 2020;(3):33–35. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/UBJJKG>
21. Мордвинова В. А. Актуальные вопросы ассортиментной политики сыродельного предприятия. Сыроделие и маслоделие. 2021. № 5. С. 8–9. [Mordvinova VA. Actual questions of assortment policy of a cheese making enterprise. *Cheese- and butter-making*. 2021;(5):8–9. (In Russ.)] <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2021-5-8-9>
22. Araújo-Rodrigues H, dos Santos MTPG, Ruiz-Moyano S, Tavaría FK, Martins APL, *et al.* Technological and protective performance of LAB isolated from Serpa PDO cheese: Towards selection and development of an autochthonous starter culture. *LWT*. 2021;150:112079. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112079>
23. García-Cano I, Rocha-Mendoza D, Ortega-Anaya J, Wang K, Kosmerl E, *et al.* 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>
24. Wang Y, Zhang C, Liu F, Jin Z, Xia X. Ecological succession and functional characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023;63(22):5841–5855. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2025035>
25. Yang S, Bai M, Kwok L-Y, Sun Z. The intricate symbiotic relationship between lactic acid bacterial starters in the milk fermentation ecosystem. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2025;65(4):728–745. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2280706>
26. Canon F, Nidelet T, Guédon E, Thierry A, Gagnaire V. Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria co-cultures. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:2088. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02088>
27. Gaudy P, Yamamoto Y, Jensen PR, Hammer K, Lechardeur D, *et al.* Genetics of Lactococci. *ASM Journals. Microbiology Spectrum*. 2019;7(4):1–25. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0035-2018>
28. Aljewicz M, Cichosz G, Nalepa B, Kowalska M. Influence of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on proteolysis patterns of Edam cheese. *Food Technology and Biotechnology*. 2014;52(4):439–447. <https://doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3659>
29. Загайнова А. В., Федец З. Е., Панькова М. Н., Новожилов К. А., Грицюк О. В. и др. Лактобациллы как составная часть микробиоты кишечника и их значение в физиологическом состоянии человека. Российский журнал экологической и восстановительной медицины. 2022. № 4. С. 12–25. [Zagaynova AV, Fedets ZE, Pan'kova MN, Novozhilov KA, Gritsyuk OV, *et al.* Lactobacillies as a component of the intestinal microbiota and their significance in the physiological state of humans. *Russian Journal of Environmental and Rehabilitation Medicine*. 2022;(4):12–25. (In Russ.)]
30. Glück C, Stressler T, Fischer L. Heat-stable microbial peptidases associated with the microbiota of raw milk. In: Kelly AL, Larsen LB, editors. *Agents of Change. Enzymes in Milk and Dairy Products*. Cham: Springer Cham; 2021. pp. 269–290.