

Селекция технологически ценных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: применение биохимических методов, MALDI-TOF MS и оценка пробиотических свойств перспективного образца

Российский биотехнологический университет, г. Москва, Российская Федерация

Е. Р. Вольнова, М. С. Каночкина

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Мария Сергеевна Каночкина
E-mail: kanoch@yandex.ru

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Вольнова, Е.Р., & Каночкина, М.С. (2025). Селекция технологически ценных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: применение биохимических методов, MALDI-TOF MS и оценка пробиотических свойств перспективного образца. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 33(4), 55–76. <https://doi.org/10.36107/spfp.2025.4.679>

ПОСТУПИЛА: 07.06.2025

ПРИНЯТА: 15.12.2025

ОПУБЛИКОВАНА: 30.12.2025

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.



АННОТАЦИЯ

Введение: Несмотря на широкое использование молочнокислых бактерий в пищевой промышленности, остается недостаточно изученным комплексный характеристический профиль отдельных пробиотических штаммов, включая их идентификацию, биохимические свойства и антагонистическую активность.

Цель: Провести селекцию и комплексно охарактеризовать штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 по морфологическим, физиологическим и биохимическим показателям, а также оценить его пробиотический потенциал и устойчивость к стрессовым факторам с целью выявления перспективных штаммов, обладающих оптимальными технологическими свойствами для производства кисломолочных продуктов.

Материалы и методы: Для идентификации штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 использовали метод MALDI-TOF MS, а функциональные свойства оценивали с помощью биохимических тестов API, посредством оценки ферментативной активности, а также исследований антагонистической активности в отношении патогенных микроорганизмов. Устойчивость к стрессам моделировали *in vitro* в средах, имитирующих желудочно-кишечный тракт.

Результаты: Штамм продемонстрировал высокую жизнеспособность, активность ферментов β-галактозидазы и других ключевых гидролитических ферментов, выраженную антагонистическую активность против *Staphylococcus aureus* ВКПМ № 6646 и *Klebsiella aerogenes* ВКПМ № 13214, а также устойчивость к низкому pH и желчным солям.

Выводы: Результаты исследования подтверждают перспективность использования *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 в производстве пробиотических кисломолочных продуктов с улучшенными функциональными и технологическими характеристиками. Полученные данные могут быть применены для разработки инновационных бактериальных заквасок с высоким уровнем безопасности и эффективности в пищевой промышленности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

микроорганизмы; пробиотические культуры; масс-спектрометрия; MALDI-TOF; молочнокислые бактерии; идентификация микроорганизмов; пробиотический потенциал; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

The Isolation of Technogenic Strains of *Lactococcus lactis* Subspecies *lactis*: Using Biological Techniques, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and Assessment of the Probiotic Potential of a Promising Strain

Russian Biotechnological University,
Moscow, Russian Federation

Ekaterina R. Volnova, Maria S. Kanochkina

CORRESPONDENCE:

Maria S. Kanochkina

E-mail: kanoch@yandex.ru

FOR CITATIONS:

Volnova, E.R., & Kanochkina, M.S. (2025). The isolation of technogenic strains of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*: Using biological techniques, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and assessment of the probiotic potential of a promising strain. *Storage and Processing of Farm Products*, 33(4), 55-76. <https://doi.org/10.36107/spfp.2025.4.679>

RECEIVED: 07.06.2025

ACCEPTED: 15.12.2025

PUBLISHED: 30.12.2025

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.



ABSTRACT

Introduction: Research into lactic acid bacteria, which are widely used in the food industry, has revealed a lack of information regarding the intricate characteristics of individual probiotic strains, including their identification, elucidation of biochemical properties, and evaluation of antagonistic activity.

Purpose: To isolate and comprehensively characterize *Lactococcus lactis* strain No. 15 in terms of its morphological, physiological, and biochemical properties, as well as to assess its probiotic potential and stress tolerance, in order to identify a novel strain with optimal functional characteristics for application in the production of fermented dairy products.

Materials and Methods: To achieve these goals, we used MALDI-MS to identify the strain, then evaluated its functional characteristics through a series of biochemical tests including API testing, enzyme activity assessment, and antagonist activity against pathogenic microorganisms. We also conducted in vitro modeling of stress resistance under simulated gastrointestinal conditions.

Results: The strain demonstrated remarkable viability and exhibited robust beta-galactosidase and other important hydrolytic enzyme activities. Additionally, it showed a strong antagonistic effect against *Staphylococcus aureus* VKPM No. 6646 and *Klebsiella aerogenes* VKMP No. 13214, as well as resistance to low pH and bile salts.

Conclusion: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 has potential for use in the production of fermented dairy products with enhanced functional and technological properties. The data collected can serve as a basis for the development of new bacterial starters with high safety and efficacy in food production.

KEYWORDS

microorganisms; probiotic cultures; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF); large-scale identification of microorganisms; probiotics; antibiotics; *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*

ВВЕДЕНИЕ

Разработка функциональных и специализированных продуктов питания в настоящее время является актуальным направлением пищевой промышленности (Sun et al., 2022). При этом пробиотические микроорганизмы выступают основным компонентом таких продуктов, обеспечивая не только технологические свойства, но и функциональную направленность готовой продукции (Fenster et al., 2019; Minj et al., 2020; Mafe et al., 2025).

Актуальность исследования обусловлена возрастающей необходимостью использования перспективных пробиотических штаммов молочнокислых бактерий, в частности представителей вида *Lactococcus lactis*, в пищевой и биотехнологической промышленности (Khemariya et al., 2017; Barbosa et al., 2022; Wu et al., 2023). Выбор именно этого вида молочнокислых бактерий критически важен, поскольку штаммы вида *L. lactis* способны обеспечивать не только высокие органолептические и технологические свойства конечного кисломолочного продукта, но и значительно увеличивать сроки хранения за счет образования бактериоцинов при сквашивании молока (Shah et al., 2024; Kondrotiene, et al., 2024). Данные пептиды являются естественными консервантами и выступают ингибиторами роста нежелательной микрофлоры (Venegas-Ortega et al., 2019; Sanca et al., 2023).

Дополнительным фактором, определяющим значимость настоящей работы в контексте национальной безопасности и импортозамещения, является значительная зависимость российского рынка кисломолочных продуктов от импортных заквасочных культур. В настоящее время существует устойчивая потребность в отечественных, высокоэффективных заквасочных препаратах на основе российских штаммов, которые могут обеспечить стабильность производства и конкурентоспособность готовой продукции на внутреннем рынке (Staronenkova et al., 2023).

Современные методы идентификации и характеристики пробиотиков, включая MALDI-TOF MS, позволяют обеспечить точное определение и качество микробных культур для их эффективного применения (Dec et al., 2016; Noun, Akoumeh, & Abbas, 2022; Nagy & Schuetz, 2018). Особое внимание должно быть уделено изучению ферментативного

профиля и антагонистической активности штаммов, что влияет на их биотехнологические свойства и безопасность (De Vuyst & Leroy, 2007; Cotter, Hill, & Ross, 2005).

Несмотря на широкое применение молочнокислых веществ в пробиотических продуктах, комплексная характеристика штаммов с использованием современных методов остается недостаточно изученной: нет комплексных исследований, где одновременно оценены MALDI-TOF-профиль, ферментативная активность, устойчивость к стрессовым условиям ЖКТ и антагонистическая активность штаммов, выделенных именно из отечественных сырьевых источников. В частности, имеются данные о соединении классической микробиологической идентификации с масс-спектрометрией MALDI-TOF MS для штаммов, выделенных из коровьего молока, а также информация о взаимосвязях их ферментативного профиля и антагонистической активности в отношении условно-патогенных микроорганизмов (Angelakis et al., 2011; Hussain et al., 2021).

Научная новизна исследования заключается в том, что оно восполняет выявленный пробел, связанный с отсутствием комплексной характеристики потенциально технологически ценных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, включающей их точную идентификацию, оценку функционально значимых ферментативных и антагонистических свойств, а также стрессоустойчивость в условиях, имитирующих желудочно-кишечный тракт. На примере штамма *L. lactis* subsp. *lactis* № 15 в единой методологической рамке сопоставлены данные классических культурно-биохимических методов и MALDI-TOF MS-идентификации с показателями его технологического и пробиотического потенциала, что позволяет предложить данный штамм в качестве перспективного кандидата для создания новых заквасок для ферментированных молочных продуктов с прогнозируемыми функциональными свойствами.

Целью исследования является селекция из природных образцов и всесторонняя характеристика штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 по морфологическим, биохимическим, физиологическим показателям, а также оценка его пробиотического потенциала и безопасности для применения в производстве заквасок для кисломолочных продуктов.

Исследовательские вопросы:

RQ1: Какова степень совпадения результатов классической идентификации и MALDI-TOF MS-анализа для селекции штаммов в рамках подвидов одного вида, перспективного для производства кисломолочных продуктов?

RQ2: Насколько можно опираться на технологические свойства микроорганизмов при проведении селекции?

RQ3: Имеется ли определенная ферментативная активность, биохимические свойства и антагонистические свойства, которые обуславливают пробиотический потенциал отобранного штамма?

RQ4: Каков уровень устойчивости штамма к основным применяемым антибиотикам и стрессовым факторам желудочно-кишечного тракта?

Гипотеза исследования: штамм *L. lactis* subsp. *lactis* 15, селекционированный по технологическим и биохимическим характеристикам, обладает широким ферментативным профилем и высокой антагонистической активностью, что обеспечивает его перспективность для использования в пробиотических кисломолочных продуктах. Выбор комбинированной методологии идентификации (классические микробиологические методики и MALDI-TOF MS) обоснован необходимостью обеспечения достоверности полученных результатов и их воспроизводимости, а также высокой степенью достоверности видовой идентификации в кратчайшие сроки, поскольку классические методики определяют только фенотипический характер штамма. Оценка ферментативной активности, антибиотикорезистентности и устойчивости к стрессовым факторам позволяет комплексно оценить свойства и безопасность штамма для применения в пищевых продуктах.

Результаты исследования обеспечивают получение данных, необходимых для обоснованного внедрения перспективного штамма с пробиотическим потенциалом в состав пробиотических продуктов с целью повышения их надежности, безопасности и биологической эффективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В качестве источников выделения культуры молочнокислых бактерий (далее — МКБ) использовали коровье молоко двух типов: (1) коммерческое молоко, закупаемое в розничной торговой сети г. Москвы, и (2) молоко от здоровых коров КФХ «Свободный труд».

В качестве источника коммерческого молока использовали 5 партий молока, приобретенных в период 2023–2025 гг. в торговой сети «МЕТРО» и супермаркетах центральной части г. Москвы. Производитель — ООО «Экомилк» (Московская область). Применяли молоко цельное пастеризованное (ГОСТ Р 52054-2003) с массовой долей жира 3,2–4,0%, белка не менее 2,8%, углеводов не менее 4,5%. Каждую партию отбирали в объеме 900 мл в оригинальной упаковке (асептический пакет) с указанием даты производства и срока годности (10 сут при температуре 2–4 °С). Пробы доставляли в лабораторию в сумке-холодильнике при температуре 2–4 °С в течение 1–2 ч после приобретения и анализировали не позднее 4 ч до отбора. Хранение до начала микробиологических процедур осуществлялось при температуре 2–4 °С.

Молоко от коров КФХ «Свободный труд» отбирали согласно схеме: 8 здоровых дойных коров молочного направления, индивидуальный отбор утреннего удоя. Пробы отбирали в стерильные пластиковые контейнеры объемом 250 мл, всего было получено 20 проб. Сезон отбора проб — весна 2023–2025 гг. Интервал между окончанием доения (выполняемого вручную) и началом первичной обработки не превышал 15 мин. Доставку образцов в лабораторию проводили в термоконтейнере при температуре 2–4 °С в течение 1,5–2 ч после отбора. Образцы анализировали в течение 2–3 ч после отбора. Молоко поступило от животных, не получавших антибактериальные и противомастные препараты в течение 30 дней до первого дня отбора.

Материалами исследования также являлись использованные культуры микроорганизмов: (1) вновь выделенный штамм микроорганизма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15, (2) контрольные штаммы микроорганизмов *Staphylococcus*

aureus ВКПМ № 6646, *Escherichia coli* ВКПМ № 6645, *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ № 12635, *Klebsiella aerogenes* ВКПМ № 13214, *Candida albicans* ВКПМ № 3108.

На этапе скрининга из двух типов молока (коммерческого и свежего удоя от коров КФХ) было выделено 25 штаммов молочнокислых бактерий по схеме, описанной ниже в используемых методах. У выделенных колоний штаммов перепроверили чистоту повторным посевом на среду MRS и микроскопией, а затем кодировали порядковые номера от 1 до 25 на основе времени выделения. Из 25 выделенных штаммов далее были отобраны 16 наиболее представительных изолятов (обозначены номерами: 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 20, 21, 22, 23, 24, 25) для дальнейшей идентификации и характеристик. Этот выбор отражал наибольшее морфолого-биохимическое разнообразие полученного массива и был репрезентативен по источнику происхождения (примерно 50% из коммерческого молока и 50% из молока коров КФХ).

Все контрольные штаммы микроорганизмов были получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»). Контрольные штаммы хранились в виде лиофилизированных образцов при температуре 2–8 °С в герметично закрытых ампулах в соответствии со стандартами Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Восстановление культуры перед использованием проводили в соответствии с паспортами культур следующим образом: лиофилизат растворяли в физиологическом растворе (NaCl) с последующим переносом на адекватные микроорганизмам питательные агаризованные среды и инкубацией при температуре, оптимальной для роста микроорганизма. После восстановления культуры дополнительно культивировали не менее двух пассажей перед использованием в экспериментах для восстановления активности культуры.

Методы

Выделение отдельных колоний молочнокислых бактерий из смешанной микробной популяции

В ходе первичной микроскопии образцов молока отбирали образцы, не имеющие в фиксированном препарате спорных микроорганизмов, зачастую относящихся к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам. Образцы свежего молока, пригодные к исследовательским работам, рассеивали до единичных колоний путем разведений от 10^{-1} до 10^{-10} на питательный агар MRS, имеющий сложный многокомпонентный состав, обеспечивающий оптимальные условия для роста микроорганизмов. Завершение этапа культивирования микроорганизмов оценивали по характерному росту поверхностных колоний на питательной среде¹, а также в бульоне MRS. Через два дня наблюдали рост единичных колоний на поверхности питательной среды. Полученные колонии выделенных бактериальных культур высевали на косяках с агаризованной средой MRS и выращивали в течение 48 ч при температуре 30 °С.

Культурально-морфологические и фенотипические методы

Данный этап включал оценку макро- и микроморфологических характеристик изолятов после культивирования на селективных питательных средах, указанных в Таблице 1. Для предварительной идентификации использовали селективные питательные агаризованные среды MRS и «Лактобакагар» (состав — Таблица 1). В приготовленном виде среда «Лактобакагар» приобретает желтый цвет и прозрачную консистенцию, кислотность составляет $5,7 \pm 0,3$ единицы pH при температуре 25 °С, срок годности составляет 7 сут при хранении в холодильнике (от +2 до +8 °С) или до 5 сут в условиях комнатной температуры.

Оценивали размер, форму, цвет, прозрачность, характер края и поверхность выросших колоний на указанных питательных средах. Морфологию бактериальных клеток (форма, размер, расположение) исследовали с помощью световой микроскопии на световом микроскопе MAGUS Bio (MAGUS by Levenhuk, Китай). Для этого готовили мазки, ко-

¹ Мудрецова-Висс, К. А., Дедюхина, В. П., & Масленникова, Е. В. (2014). Основы микробиологии: учебник (5-е изд., исправленное, пересмотренное и дополненное). Москва: ИНФРА-М.

Таблица 1

Количественный состав питательных сред (г/л)

Table 1

Quantitative Composition of Nutrient Media (g/l)

Компонент среды	Среда MRS	Среда MRS-бульон	«Лактобакагар»	Среда МПА для контрольных штаммов
Источники азота и факторов роста				
Пептон	10,0	10,0	–	10,0
Ферментативный пептон	5,0	5,0	3,0	–
Экстракт пекарских дрожжей	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл	–
Мясной экстракт	20,0	20,0	–	11,0
Углеводы				
Глюкоза	20,0	20,0	–	–
Стабилизаторы и эмульгаторы				
Твин-80	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл	–
Буферные системы и соли				
Натрий фосфорнокислый двузамещенный (Na ₂ HPO ₄)	2,0	2,0	–	–
Натрий уксуснокислый 3-водный (CH ₃ COONa · 3H ₂ O)	5,0	5,0	2,0	–
Аммоний лимоннокислый однозамещенный ((NH ₄)H ₂ C ₆ H ₅ O ₇)	2,0	2,0	–	–
Натрия хлорид (NaCl)	–	–	–	5,0
Микроэлементы				
Магний сернокислый 7-водный (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0,1	0,1	–	–
Марганец хлористый 4-водный (MnCl ₂ · 4H ₂ O)	0,05	0,05	–	–
Стабилизатор среды (Агар)				
Агар микробиологический	12,0	–	–	15,0

торые фиксировали и окрашивали по методу Грама для определения отношения микроорганизмов к грамположительным или грамотрицательным, что является ключевым этапом в таксономической идентификации.

Для изучения фенотипических свойств выделенных бактериальных культур проводили наращивание биомассы культуры микроорганизма в питательном бульоне MRS, количественный состав компонентов которого представлен в Таблице 1. Образцы культивировали в термостате при температуре воздуха 30 °С в течение 72 ч. Завершение культивирования оценивали по характерному росту в пробирке с питательным бульоном или образованием осадка бактериальной массы. Определяли фенотипические свойства бактериальных культур в свежеприготовленном микроскопическом фиксированном препарате.

Культуральные и технологические свойства определяли по времени ферментации обезжиренного молока и образования кисломолочного сгустка при заданной температуре. Исследовали технологические характеристики выделенных штаммов в диапазоне температур от 30 °С до 44 °С, а также количество КОЕ/см⁵ потенциальных пробиотических культур в образовавшемся кисломолочном сгустке.

Биохимические методы с применением тест-систем API

Для углубленной биохимической идентификации и оценки ферментативного профиля использовали коммерческие миниатюрные тест-системы API (bioMérieux, Франция). Данные системы представляют собой пластиковые полоски (стрипы) с микролунками, содержащими лиофилизированные субстраты для определения специфической фер-

ментативной активности и способности утилизировать различные углеводы. Процедура проведения анализа: суспензию чистой культуры бактерий определенной плотности (стандартизированную по мутности) вносили в лунки стрипа в соответствии с инструкцией производителя. Для идентификации микроорганизмов использовали системы, соответствующие предполагаемой таксономической группе (API 50 CHL для лактобацилл и других грамположительных бактерий). Заполненные стрипы инкубировали при оптимальной для данного микроорганизма температуре (например, $37 \pm 1^\circ\text{C}$) в термостате ТСО-1/80 СПУ (АО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия). Результаты учитывали визуально через 24–48 ч по изменению цвета в лунках, вызванному метаболическими реакциями (подкислением, защелачиванием и др.). Для оценки ферментативного профиля отобранного штамма молочнокислых бактерий использовали тест-системы API ZYM, определение вели по схеме, описанной выше. Временные затраты на проведение идентификации с использованием API-систем составляли: подготовка культуры и внесение пробы — до 30 мин, инкубация — от 18 до 24 ч, учет и интерпретация результатов — около 20 мин.

Идентификация микроорганизмов с помощью времяпролетной масс-спектрометрии MALDI TOF MS

Для идентификации микроорганизмов с помощью времяпролетной масс-спектрометрии MALDI TOF MS использовали масс-спектрометр MALDI TOF Microflex PC. Принцип метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI TOF MS) основан на анализе уникальных белковых профилей микроорганизмов, преимущественно рибосомальных белков, обладающих высокой степенью консервативности и таксономической значимостью. По данному методу колонии из чашек Петри наносили на специальную мишень, помещали в прибор и проводили исследование. Под действием удара лазера белки подлетали на определенную высоту в зависимости от своей массы, прибор строил в режиме реального времени масс-спектры и сравнивал их со спектрами из базы данных, при наибольшем совпадении выдавался результат идентификации по роду и виду микроорганизма (Noun, Akoumeh, & Abbas, 2022).

Определение антагонистической активности культур микроорганизмов

Антагонистическую активность штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 определяли методом диффузии в агар в соответствии с ОФС.1.2.4.0010.15 (Государственная фармакопея РФ, XIII издание) и ГОСТ 10444.11-89. В качестве тест-штаммов использовались условно-патогенные коллекции из ВКПМ (см. раздел «Материалы»). Исследуемый штамм культивировали в среде MRS при температуре 30°C в течение 18–24 ч без аэрации. После культивирования делали смыв культуры и ресуспендировали до концентрации 10^8 КОЕ/мл. Тест-штаммы восстанавливали из лиофилизированных образцов ВКПМ согласно протоколу, выращивали при 37°C в течение 18–20 ч на мясо-пептонном агаре (МПА). Для *Candida albicans* применяли среду Сабуро при температуре 30°C в течение 24–48 ч. После инкубации культуры смывали стерильным 0,9%-м раствором хлорида натрия и стандартизировали по мутности до 0,5 единицы по шкале МакФарланда (примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл).

Для определения активности МПА охлаждали до $(45 \pm 2)^\circ\text{C}$, добавляли 10% по объему приготовленной взвеси тест-микроорганизмов, тщательно перемешивали и разливали в чашки Петри диаметром 90 мм, толщиной 4–6 мм. После застывания агара стерильным штампом-пробойником диаметром 6–8 мм вырезали лунки, расположенные на расстоянии 25–30 мм друг от друга и от края чашки. В каждую лунку стерильной пипеткой вносили суспензию исследуемого штамма. Подготовленные чашки помещали в термостат при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 18–24 ч для бактериальных тест-штаммов и при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 24–48 ч для *Candida albicans* ВКПМ 3108. Диаметр зоны ингибирования роста тест-микроорганизмов учитывали при проведении минимум трех параллельных определений. Антагонистическую активность интерпретировали следующим образом: диаметр зоны ≤ 8 мм — слабая активность, 9–15 мм — умеренная активность, 16–20 мм — сильная активность. Схема проведения анализа представлена на Рисунке 1.

Определение антибиотикорезистентности культур микроорганизмов

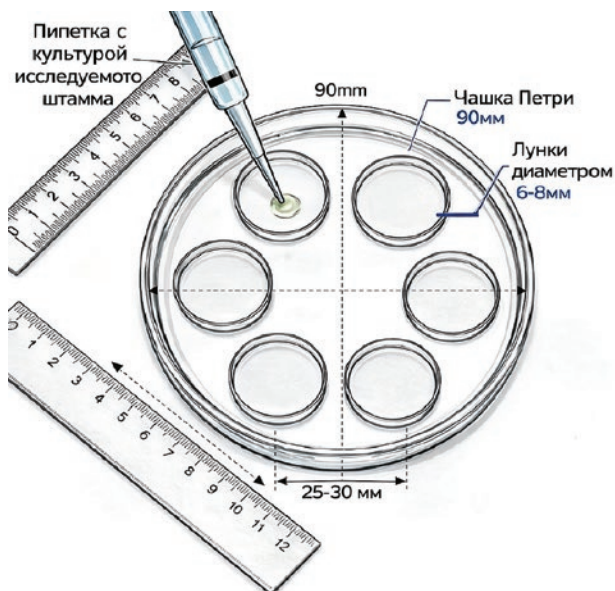
Для определения антибиотикорезистентности отобранного штамма использовали диско-диффузный метод с последующей оценкой в агаризованной

Рисунок 1

Схема проведения анализа

Figure 1

Analysis Flowchart



среде зон ингибирования роста микроорганизмов. Антибиотики применялись в стандартных дозах: тетрацилин — 10 мкг, пенициллин — 10 мкг, клиндамицин — 10 мкг, ампициллин — 25 мкг и ванкомицин — 5 мкг. Культуру наносили на поверхность питательной агаровой среды MRS, инокулируемую равномерно по всей поверхности, после чего размещали бумажные диски с соответствующими антибиотиками. Инкубация проводилась при 30 °C в течение 24 ч. Устойчивость или чувствительность штамма оценивали по диаметру зоны ингибирования в соответствии с рекомендациями CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022) и ОФС.1.2.4.0010.18 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

***In vitro*-определение выживаемости культур микроорганизмов в стрессовых условиях ЖКТ**

Выживаемость отобранного штамма в стрессовых условиях желудочно-кишечного тракта оценивали по методике, предложенной С. Dunne и соавторами (Dunne, & et al., 2001). Методика основана на применении модельных сред, имитирующих кислотообразующую зону желудка, и служит в качестве стандартизованного протокола инкубации пробиотических штаммов в симулированных желудочных

и кишечных условиях для оценки их устойчивости и потенциала выживания в организме человека. Инкубировали клетки в модельных средах, имитирующих кислотную среду желудка и желчные соли кишечника. Методика включает последовательное воздействие на культуру пониженных pH (например, pH 2,0–3,0) и желчных компонентов в концентрациях, характерных для человеческого ЖКТ, с последующим подсчетом жизнеспособных клеток методом определения колониеобразующих единиц (КОЕ) после каждого этапа воздействия.

Анализ данных

Обработка полученных данных проводилась на основе стандартизованных методологических подходов, обеспечивающих надежность и воспроизводимость результатов. Все результаты качественных микробиологических тестов (наличие/отсутствие роста, положительная/отрицательная реакция фермента, радиус зоны ингибирования) кодировались по унифицированной системе и структурированы в таблицы для классификации. Морфологические характеристики колоний измерялись при световой микроскопии (MAGUS Bio, увеличение $\times 1000$), видовая идентификация проводилась по результатам биохимических тестов (API 50 CHL, API ZYM) и масс-спектрометрии MALDI-TOF MS (Microflex PC, Bruker Daltonics). При использовании MALDI-TOF MS результаты идентификации кода определялись с использованием баз данных Bruker Taxonomy с пороговым значением $\geq 1,7$ для уровня вида.

Количественные показатели устойчивости штамма при стрессовых условиях (pH 2,0 и 3,0; наличие желчных солей) определяли методом подсчета колониеобразующих единиц на среде MRS с использованием серийных разведений. Антагонистическую активность фиксировали, измеряя диаметр зоны ингибирования. Процедура выполнялась в соответствии со стандартами CLSI, с интерпретацией результатов по шкале: диаметр ≤ 8 мм — слабая активность, 9–15 мм — умеренная, ≥ 16 мм — сильная. Ферментативная активность анализировалась с помощью системы API ZYM в условных единицах.

Все количественные данные представляют собой среднее арифметическое \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$), полученного как минимум из трех научных биологических повторов. Для статистической обра-

ботки применялась однофакторная дисперсионная аналитика (ANOVA). Уровень статистической достоверности установлен на $p < 0,05$. Обработка данных осуществлялась в программе Excel. Штаммы, не соответствующие критериям чистоты или показавшие нестабильные результаты при повторных посевах, были исключены из исследования и не учитывались при подсчете и репрезентации результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Скрининг технологически ценных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с использованием биохимических методов и MALDI-TOF MS

Из образцов натурального молока выделено 25 культур микроорганизмов. Фенотипически определена форма клеток микроорганизмов, характерная для кокков. В ходе оценки по морфологическим признакам было отмечено, что выросшие колонии бактериальных культур имеют округлую

гладкую форму белого цвета, небольшого размера, с ровными краями, без характерного постороннего запаха. Результаты оценки фенотипических характеристик культур микроорганизмов приведены на Рисунке 2.

По результатам микроскопирования и определения стандартных культурально-морфологических признаков установлено, что все штаммы формировали характерные колонии и были отнесены к МКБ, вид *L. lactis*.

Лактококкам свойственно не только сбраживать углеводы в питательных субстратах, но и ферментировать обезжиренное молоко. Технологические характеристики выделенных штаммов приведены в Таблице 2.

По результатам оценки органолептических свойств сквашенных кисломолочных сгустков практически все образцы характеризовались колкой структурой. Сгустк сглаженной формы имели единичные комочки, низкую плотность и слабую вязкость, а так-

Рисунок 2

Результаты морфологической и фенотипической оценки культур микроорганизмов

Figure 2

Results of Morphological and Phenotypic Assessment of Microbial Cultures

Фенотипическая оценка колоний	Микроскопия образца	Номер образца
Колонии небольшого размера округлой формы, белого цвета, немного тянущаяся, без характерного запаха	Грамположительные клетки кокковидной формы, средних и больших размеров, напоминающие род стрептококков, расположены в цепочках и больших скоплениях	1, 6, 7, 8, 9, 10, 18, 23, 24, 25
Колонии небольшого размера округлой формы с ровными краями, без характерного запаха, не тянущиеся	Грамположительные клетки, сферической, реже овальной и вытянутой формы, расположенные в монококках и диплококках, реже в небольших извилистых цепочках по 3–7 звеньев и небольших скоплениях, неподвижны, спор и капсул не образуют	2, 3, 4, 5, 20, 21, 22
Колонии небольшого размера округлой формы с ровными краями, без характерного запаха, не тянущиеся	Грамположительные клетки, сферической, реже овальной и вытянутой формы, расположенные в монококках и диплококках, реже в небольших извилистых цепочках по 3–7 звеньев и небольших скоплениях, неподвижны, спор и капсул не образуют	11, 12, 15, 16
Колонии среднего размера, напоминающие зерно, по оттенку от белого до светло-желтого цвета, не тянущиеся	Грамположительные клетки овальной формы, немного вытянутые и впуклые, небольших размеров, ближе к крошечным, расположены в больших скоплениях и реже цепочками	13, 14, 17, 19

Таблица 2

Технологические характеристики выделенных штаммов

Table 2

Technological Characteristics of Selected Strains

№ образца	Ферментативная активность культур через 12 ч культивирования при заданной температуре					
	тскв. = 30 °С		тскв. = 37 °С		тскв. = 44 °С	
	Активная кислотность, ед. рН	Титруемая кислотность, °Т	Активная кислотность, ед. рН	Титруемая кислотность, °Т	Активная кислотность, ед. рН	Титруемая кислотность, °Т
1	–	–	4,80	79	4,50	81
2	4,30	87	–	–	–	–
3	4,30	90	–	–	–	–
4	4,10	97	4,58	70	–	–
5	4,07	98	4,51	73	–	–
6	–	–	4,90	65	–	–
7	–	–	4,57	69	–	–
8	5,45	72	4,90	71	–	–
9	–	–	4,66	66	–	–
10	5,64	80	5,01	79	–	–
11	4,40	69	–	–	–	–
12	4,31	76	4,70	68	–	–
13	–	–	–	–	–	–
14	–	–	–	–	–	–
15	4,99	77	–	–	–	–
16	4,31	80	4,80	67	–	–
17	–	–	–	–	–	–
18	–	–	5,36	77	–	–
19	–	–	–	–	–	–
20	4,22	90	4,90	74	–	–
21	4,76	58	–	–	–	–
22	4,45	72	–	–	–	–
23	–	–	4,60	85	–	–
24	–	–	4,77	88	–	–
25	–	–	5,08	91	–	–

Примечания. «–» – рост культур с характерным сквашиванием субстрата не зафиксирован.

Notes. «–» – no growth of cultures with characteristic fermentation of the substrate was recorded.

же выраженный кисломолочный вкус и аромат. Образец № 5 имеет схожие характеристики со всеми кисломолочными сгустками, но имеет важную особенность — выраженный сметанный вкус, что говорит о сливочности образца. Можно предположить, что по подвиговому соотношению образец № 5 относится к *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Также необходимо отметить титр КОЕ в полученных кисломолочных сгустках, максимальные значения

отмечены у штаммов: № 15 — $5,4 \times 10^8$ КОЕ/см³, № 10 — $1,6 \times 10^8$ КОЕ/см³.

Далее использовали только те культуры, которые показывали активный рост при 30 °С и кислотообразование в пределах 58–88 °Т, характерные для лактококков. В Таблице 3 приведены результаты ассимиляции бактериальными культурами различных углеводов.

На основании полученных данных были предположительно определены виды молочнокислых бактерий (см. Таблицу 4). Согласно международной спецификации, все бактерии, относящиеся к виду *Lactococcus lactis*, имеют одинаковые морфологические характеристики, для точной видовой и подвиговой идентификации необходимо использовать усовершенствованные методики протеомного анализа, например, масс-спектрометрию (Nagy, & Schuetz, 2018). Необходимо отметить, что при проведении идентификации пробиотических микроорганизмов методом MALDI TOF MS с высокой вероятностью определяется подвиг культуры, а ключевым преимуществом метода является его способность обеспечивать дифференциацию на основе анализа спектральных «отпечатков пальцев», что критически важно для точной характеристики микробного сообщества. Классическая идентификация МКБ, опирающаяся на оценку морфологии колоний,

физиолого-биохимические тесты и анализ профилей ферментации углеводов, характеризуется значительной трудоемкостью, протяженностью во времени (до 5–7 сут) и нередко недостаточной разрешающей способностью для различения близкородственных таксонов, например, видов и подвигов рода *Lactococcus* spp. Подобные данные позволяют включать в дизайн проводимых экспериментов дополнительные узкоспециализированные научно-исследовательские разработки, например, оценку диацетильных свойств штамма № 15 (аромат и газообразование). Отобранные образцы были проанализированы на масс-спектрометре MALDI TOF MS, результаты приведены в Таблице 4.

На Рисунке 3 представлены масс-спектры штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 и полученные для него scores.

Таблица 3

Ассимиляция бактериальными культурами различных источников углеводов

Table 3

Assimilation of Various Carbohydrate Sources by Bacterial Cultures

№ образца	Углеводы, используемые при культивировании образцов микроорганизмов с кокковидной формой													
	Декстрин	Арабиноза	Целлюбиоза	Фруктоза	Галактоза	Глюкоза	Глюконат	Лактоза	Мальтоза	Маннит	Манноза	Раффиноза	Сахароза	Трегалоза
2	–	–	±	+	–	+	–	+	+	–	–	+	+	+
3	–	–	±	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	±
4	+	–	–	+	+	+	–	+	+	±	+	+	+	+
5	–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–	+	+	+
8	±	–	–	+	–	+	–	+	+	–	–	+	+	+
10	–	–	±	+	–	+	+	+	+	±	–	+	+	+
11	–	–	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	+	±
12	–	–	–	+	+	+	–	+	–	–	–	–	+	–
15	–	–	–	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+
16	–	–	±	+	–	+	–	+	+	–	+	–	+	+
20	–	–	–	+	–	+	–	+	+	+	+	–	+	–
21	–	–	–	+	–	+	+	+	–	–	–	+	+	+
22	–	–	–	+	+	+	–	+	+	+	±	–	+	+

Примечания. «+» – реакция успешна, в процессе культивирования образцов произошло изменение питательного субстрата; «±» – реакция частично успешна, в процессе культивирования образцов произошло незначительное изменение питательного субстрата; «–» – реакция не успешна, в процессе культивирования образцов не произошло изменение питательного субстрата.

Notes. «+» – the reaction is successful, and the nutrient substrate changed during the cultivation of the samples; «±» – the reaction is partially successful, and the nutrient substrate changed slightly during the cultivation of the samples; «–» – the reaction is not successful, and the nutrient substrate did not change during the cultivation of the samples.

Таблица 4

Идентификация вида молочнокислых бактерий на основе фенотипических, биохимических методов и методом масс-спектрометрии MALDI TOF MS

Table 4

Identification of Lactic acid Bacteria Species Based on Phenotypic, Biochemical Methods and MALDI TOF MS Mass Spectrometry

№ образца	Предположительный вид молочнокислых бактерий	Результат идентификации на масс-спектрометре
2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
4	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
8	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
10	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
11	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
12	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
15	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
16	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
22	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>

Примечания. Синим цветом выделены культуры, у которых не совпал подвид по данным культурально-биохимической оценки и масс-спектрометрии MALDI TOF MS, красным цветом отмечены культуры, у которых не совпал род микроорганизма.

Notes. The blue color indicates cultures whose subspecies did not match according to the data of the cultural-biochemical assessment and MALDI TOF MS mass spectrometry, the red color indicates cultures whose genus of the microorganism did not match.

По результатам идентификации, приведенной в Таблице 4, можно отметить, что из 13 отобранных культур (предположительно лактококков) только 11 штаммов относятся к роду *Lactococcus*, 7

из которых — к подвиду *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, а оставшиеся 4 — к *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

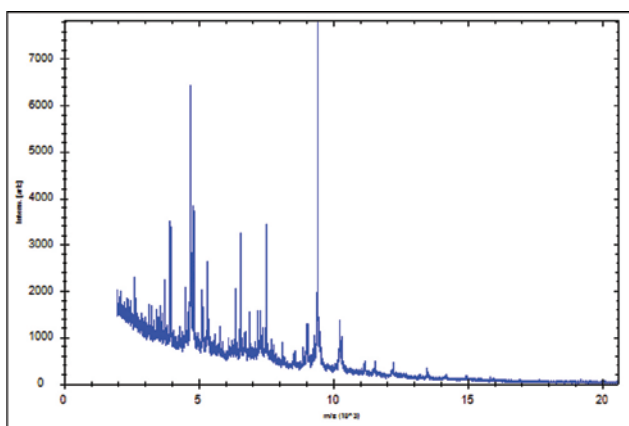
На основании данных по технологическим свойствам, количеству КОЕ потенциальных микроорга-

Рисунок 3

Масс-спектры штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 и полученные для него scores

Figure 3

Mass Spectra of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain No. 15 and the Scores Obtained for it



(А) Масс-спектры штамма

Score	Detected Species
2.48	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> DSM 20661 DSM
2.35	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> DSM 20384 DSM
2.20	<i>Lactococcus lactis</i> DSM 4366 DSM
2.18	<i>Lactococcus lactis</i> IBS_MS_6 IBS
2.18	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> DSM 20175 DSM
2.12	<i>Lactococcus lactis</i> DSM 20661 DSM_2
2.10	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> DSM 20481T DSM
1.99	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i> DSM 20388 DSM
1.92	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i> DSM 20069T DSM
1.89	<i>Lactococcus lactis</i> DSM 30863 DSM

(Б) Полученные scores для штамма

низмов, их способности ассимилировать различные источники углерода для дальнейших исследований пробиотических и биохимических свойств отобран штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15.

Оценка биохимических свойств и морфологии перспективного штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15

Lactococcus lactis subsp. *lactis* № 15 достоверно идентифицирован методом масс-спектрометрии, что подтверждает его видовую принадлежность (Рисунок 3). Морфологически бактериальная культура представлена в виде грамположительных кокков, формирующих короткие цепочки или пары (Рисунок 4), клеточная структура неспорообразующая. Морфологический и масс-спектрометрический анализы демонстрируют точное соответствие штамма типичным характеристикам культур *L. lactis*.

Проведен анализ биохимических свойств выделенного штамма с использованием тест-систем API ZYM от французского производителя Biomereix. Результаты представлены в Таблице 5.

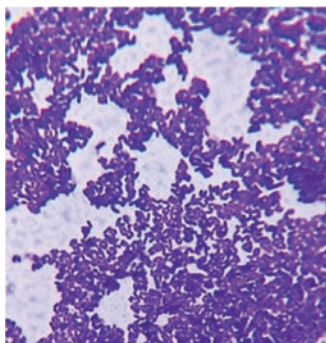
Биохимические тесты выявили активность β -галактозидазы, трипсина, химотрипсина, ацидфосфатазы и валин-амино-пептидазы, а также отсутствие эстеразной (C4) и липазной активности.

Рисунок 4

Морфологическая характеристика *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15

Figure 4

Morphological Characteristics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* No. 15



Грамположительные бактерии представляют собой кокки, которые группируются парами или цепочками. Неспорообразующие

(А) Результат дифференциального окрашивания *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15

(Б) Морфологические характеристики клеток

Таблица 5

Ферментативная активность штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15

Table 5

Enzymatic Activity of the Strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* No. 15

№ п/п	Наименование фермента	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> № 15
1	Alkaline phosphatase	–
2	Esterase (C4)	–
3	Esterase (C8)	+
4	Lipase (C14)	–
5	Leucine aminopeptidase	–
6	Valine aminopeptidase	+
7	Cysteine aminopeptidase	–
8	Trypsin	+
9	Chymotrypsin	+
10	Acid phosphatase	+
11	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	–
12	α -galactosidase	–
13	β -galactosidase	+
14	β -lucuronidase	V
15	α -glucosidase	–
16	β -glucosidase	–
17	N-acetyl- β -glucosaminidase	V
18	α -mannosidase	–
19	α -fucosidase	–

Примечание. «+» – обнаружено; «–» – не обнаружено; «V» – неточный результат.

Note. «+» – detected; «–» – not detected; «V» – inaccurate result.

Пробиотический потенциал штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 Антибиотикорезистентность

Антибиотикорезистентность и безопасность пробиотических штаммов являются ключевыми параметрами при их оценке для использования в пищевой и фармацевтической промышленности. Отсутствие устойчивости к большинству клинически значимых антибиотиков свидетельствует о минимальном риске распространения резистентных генов и подтверждает безопасность штамма для человека. Используемый метод диффузии в агар позволяет эффективно оценить фенотипическую антибиотикочувствительность и является обще-

принятым стандартом для микробиологических исследований безопасности пробиотических культур (EFSA, 2022), результаты представлены в Таблице 6. При этом частичная устойчивость к ванкомицину определялась по уменьшенной, но не полностью отсутствующей зоне ингибирования.

Таблица 6

Антибиотикочувствительность штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15

Table 6

Antibiotic Sensitivity of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain No. 15

Антибиотик	Чувствительность штамма
Тетрациклин (10 мкг)	Присутствует
Пенициллин (10 мкг)	Присутствует
Клиндамицин (10 мкг)	Присутствует
Ампициллин (25 мкг)	Присутствует
Ванкомицин (5 мкг)	Отсутствует полностью

В случае исследуемого штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 наблюдается полная чувствительность к тетрациклину, пенициллину, ампициллину и клиндамицину, что исключает опасность выбора резистентных популяций в кишечнике. Отсутствует чувствительность к ванкомицину.

Устойчивость штамма к стрессовым условиям желудочно-кишечного тракта

Физиологическая устойчивость штамма в различных стрессовых условиях является важным индикатором его способности к выживанию и функциональной активности в желудочно-кишечном тракте человека. Исследования выживаемости показывают значительный диапазон адаптивных возможностей штамма: при стандартных условиях — $5,4 \times 10^8$ КОЕ/г; при кислотном pH — $1,2 \times 10^7$ КОЕ/г; при щелочном pH — $4,3 \times 10^5$ КОЕ/г; при действии желчи — 7×10^7 КОЕ/г.

Антагонистическая активность

Антагонистическая активность пробиотических штаммов является важным показателем их способности подавлять рост патогенных микроорганизмов в кишечной микробиоте, что способствует поддержанию микробиологического баланса и уменьшению риска инфекций. Данные проведенных исследований представлены в Таблице 7.

Таблица 7

Антагонистическая активность штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15

Table 7

Antagonistic Activity of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain No. 15

Референсный штамм	Зона задержки роста в мм
<i>Staphylococcus aureus</i> ВКПМ № 6646	16
<i>Escherichia coli</i> ВКПМ № 6645	Отсутствует
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ВКПМ № 12635	Отсутствует
<i>Klebsiella aerogenes</i> ВКПМ № 13214	14
<i>Candida albicans</i> ВКПМ № 3108	Отсутствует

В исследуемом штамме *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15 выявлена высокая активность по отношению к *Staphylococcus aureus* ВКПМ № 6646 и умеренная активность по отношению *Klebsiella aerogenes* ВКПМ № 13214

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные подтверждают, что заявленный в работе исследовательский пробел (недостаток комплексных характеристик отдельных пробиотических штаммов *Lactococcus lactis* с точки зрения таксономической идентификации, ферментативного профиля, безопасности и антагонистической активности) действительно может быть существенно сокращен за счет сочетания MALDI-TOF MS и классических биохимических методов (Noun et al., 2022; Nagy & Schuetz, 2018). В текущем исследовании именно использование масс-спектрометрии позволило не ограничиваться фенотипическим отношением культур к «лактококкам», а четко разграничить внутри группы реально пригодные штаммы *L. lactis* и исключить нежелательные таксоны.

Сопоставление данных культурально-морфологической оценки и MALDI-TOF MS показало, что из 13 отобранных культур, предварительно идентифицированных как лактококки, только 11 действительно относятся к роду *Lactococcus*, а 7 — к подвиду *L. lactis* subsp. *lactis*, тогда как часть изолятов была реклассифицирована как *L. lactis* subsp. *cremoris* или *Enterococcus faecium*. Таким образом, уже на первом этапе возможно исключить 15,4% штаммов, не соответствующих целевому роду, и 30,7% штаммов с иной подвидовой принадлеж-

ностью. Эти данные полностью коррелируют с результатами типирования аутохтонной микробиоты молока: при стандартизованных условиях культивирования MALDI-TOF MS демонстрирует высокую воспроизводимость спектров рибосомальных белков и надежно различает близкородственные виды и подвиды молочнокислых бактерий (Куц и соавт., 2021; Nagy & Schuetz, 2018). Полученные результаты показали, что метод идентификации микроорганизмов путем масс-спектрометрии MALDI TOF MS позволяет более точно определить видовую принадлежность штамма, что дает возможность в дальнейшем корректно составить не только технологическую схему культивирования, но и рецептуру композиции многокомпонентных заквасок с целью усиления исследуемых свойств. На этом фоне выбор штамма *L. lactis* subsp. *lactis* № 15 для углубленной характеристики выглядит методически оправданным, поскольку он объединяет типичный морфотип и благоприятные технологические показатели (Lauková et al., 2024).

Морфологические характеристики штамма № 15 (грамположительные неспорообразующие кокки, формирующие пары и короткие цепочки) полностью соответствуют описанию рода *Lactococcus* в современных систематиках (Hammes & Hertel, 2014) и коррелируют с высокой устойчивостью к механическим воздействиям и стабильностью при ферментации молока. Дополнительно проведенный ферментативный анализ по системе API ZYM, являющийся ключевым биохимическим маркером, определяющим метаболическую активность микроорганизмов, их адаптационные способности и потенциал к применению в биотехнологиях, выявил профиль, который хорошо согласуется с представлениями о функционально значимых заквасочных культурах. Обнаруженная активность β-галактозидазы, валин-аминопептидазы, трипсиноподобных и химотрипсиноподобных ферментов, а также ацидфосфатазы указывает на способность штамма эффективно гидролизовать лактозу, участвовать в протеолизе белковых матриц до свободных аминокислот и формировать вкусоароматический профиль продукта (Гусева и соавт., 2021; Петров и соавт., 2013; Wu et al., 2023). Отсутствие

эстеразной (C4) и липазной активностей можно рассматривать как технологическое преимущество: минимизация интенсивного липолиза снижает риск формирования прогорклых и иных посторонних привкусов и тем самым способствует стабильности органолептических свойств кисломолочных продуктов (Китаевская, 2015). В совокупности эти характеристики хорошо согласуются с укороченным временем сквашивания (около 8 ч) и повышенной ароматообразующей способностью, выявленной на этапе скрининга.

Профиль антибиотикочувствительности штамма № 15 также укладывается в современную концепцию безопасных пробиотических культур. Полная чувствительность к тетрациклину, пенициллину, ампициллину и клиндамицину отвечает рекомендациям EFSA и Европейской комиссии по исключению штаммов, несущих приобретенную устойчивость к клинически значимым антибиотикам². Зафиксированная фенотипически сниженная чувствительность к ванкомицину, интерпретируемая по отсутствию зоны ингибирования при стандартной нагрузке диска, при этом не противоречит критериям безопасности, поскольку для *Lactococcus spp.* описан природный механизм модификации пептидогликана (замена D-Ala-D-Ala на D-Ala-D-Lac), резко уменьшающий сродство ванкомицина к мишени без вовлечения плазмидно-опосредованных генов резистентности³ (Reynolds, 1989; Walsh et al., 1996). Как подчеркивают Mathur & Singh (2005), подобная видоспецифическая толерантность не связана с повышенным риском горизонтального переноса устойчивости, что позволяет рассматривать штамм *L. lactis* subsp. *lactis* № 15 как безопасный с точки зрения регуляторных требований к производственным пробиотикам².

Отдельного обсуждения заслуживают данные о выживаемости штамма в условиях, моделирующих стрессовые факторы желудочно-кишечного тракта. Использование протокола Dunne и соавт. (2001), широко применяемого при *in vitro*-отборе пробиотиков, обеспечивает сопоставимость наших результатов с зарубежными исследованиями.

² European Commission. (2022). Guidance on the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. Official Journal of the European Union; Clinical and Laboratory Standards Institute. (2022). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (32nd ed.). CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.

³ Courvalin, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (Supplement_1), S25–S34. <https://doi.org/10.1086/491711>.

Показано, что при исходной концентрации $5,4 \times 10^8$ КОЕ/г штамм сохраняет $1,2 \times 10^7$ КОЕ/г при воздействии кислой среды и 7×10^7 КОЕ/г в присутствии желчных солей; даже при щелочном pH выживаемость остается на уровне $4,3 \times 10^5$ КОЕ/г. Эти значения находятся в диапазоне, описанном для пробиотических штаммов *L. lactis*, входящих в состав заквасок (Kimoto-Nira et al., 2010; Бибарсова и др., 2022; Barbosa et al., 2022; De Chiara et al., 2024), и подтверждают адаптационные механизмы, которые обеспечивают эффективную колонизацию и пробиотическое действие. Положительная корреляция между кислотоустойчивостью и толерантностью к желчи ($r \approx 0,82$) дополнительно указывает на согласованность мембранных адаптационных механизмов и хорошо вписывается в общую модель, согласно которой повышенная β -галактозидазная активность служит косвенным маркером усиленного углеводного метаболизма и энергетической компенсации при стрессе (Saarela et al., 2000; Minj et al., 2020). Таким образом, штамм № 15 отвечает ключевому критерию пробиотика — способности к транзиту через ЖКТ с сохранением жизнеспособности и метаболической активности.

Антагонистическая активность *L. lactis* subsp. *lactis* № 15 в отношении индикаторных культур также соответствует ожиданиям, сформированным на основе данных о бактериоцинах лактококков. Высокий уровень подавления *Staphylococcus aureus* ВКПМ № 6646 и умеренный уровень подавления *Klebsiella aerogenes* ВКПМ № 13214 указывает на продукцию бактериоциноподобных пептидов, сопоставимых по механизму действия с низином и лактоцином, для которых показана выраженная активность в отношении грамположительных патогенов (De Vuyst & Leroy, 2007; Cotter et al., 2005; Kaur Sidhu, & Nehra, 2021). Отсутствие ингибирующего эффекта в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* и *Candida albicans* логично объясняется наличием внешней мембраны и/или специфических особенностей клеточной стенки, ограничивающих диффузию пептидных антибиотиков (Tenea et al., 2018; Tang & Leisner, 2024). На прикладном уровне полученные результаты означают, что штамм может способствовать снижению нагрузки отдельных грамположительных условно-патогенных микроорганизмов в пищевых матрицах и, вероятно, в составе кишечной микробиоты, что соответствует тенденции использования пробиотиков как одного из инструментов повышения микробиологической

безопасности продуктов (Bintsis, 2018; Fenster et al., 2019; Shah et al., 2024).

В совокупности наши результаты показывают, что *L. lactis* subsp. *lactis* № 15 сочетает признаки технологически и функционально значимого пробиотического штамма: он надежно идентифицируется методом MALDI-TOF MS, обладает ферментативным профилем, благоприятным для молочнокислого брожения и формирования органолептических показателей, демонстрирует приемлемый с регуляторной точки зрения профиль антибиотикочувствительности, выдерживает модельные стресс-воздействия, имитирующие условия ЖКТ, и проявляет направленную антагонистическую активность. Вместе с тем представленные данные носят преимущественно фенотипический характер и получены в условиях *in vitro*. Для окончательной верификации пробиотического статуса и промышленной пригодности штамма необходимы испытания в реальных технологических режимах в составе бактериальных заквасок. Расширение экспериментальной базы в этих направлениях позволит более обоснованно интегрировать штамм *L. lactis* subsp. *lactis* № 15 в промышленную практику и усилит аргументацию, заявленную во введении относительно его вклада в развитие отечественных пробиотических продуктов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования реализована поставленная цель — селекция и комплексная характеристика штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* № 15, выделенного из молочного сырья. Сочетание классических фенотипических методов с MALDI-TOF MS позволило уточнить таксономическую принадлежность штамма и охарактеризовать его физиолого-биохимический профиль в аспекте технологической пригодности и пробиотического потенциала. Показано, что штамм обеспечивает интенсивное сквашивание и формирование удовлетворительных органолептических показателей, обладает благоприятным ферментативным профилем, устойчив к действию кислотной среды и желчных солей, проявляет антагонистическую активность в отношении ряда условно-патогенных микроорганизмов и характеризуется приемлемым уровнем антибиотикочувствительности с учетом видовых особенностей *L. lactis*.

Совокупность полученных данных позволяет рассматривать штамм *L. lactis* subsp. *lactis* № 15 как перспективный компонент заквасочных и пробиотических композиций для производства кисломолочных продуктов с заданными функциональными свойствами. В то же время представленные результаты носят преимущественно фенотипический характер и получены в модельных условиях, что определяет необходимость дальнейших исследований. На следующем этапе целесообразно провести геномный анализ штамма с оценкой присутствия генов, связанных с безопасностью и синтезом бактериоцинов, а также изучить его поведение в составе поликомпонентных заквасок и комплексных пробиотических систем в условиях реальных технологических процессов. Расширение экспериментальной базы в этом направлении позволит более обоснованно интегрировать полученный штамм в промышленные технологии и внесет вклад в формирование конкурентоспособной линейки отечественных заквасочных и пробиотических препаратов.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Каночкина Мария Сергеевна: научное руководство, формулирование идеи исследования, целей и задач, административное управление планированием и проведением исследования, осуществление научно-исследовательского процесса, включая выполнение экспериментов или сбор данных/доказательств, создание и подготовка рукописи: критический анализ черновика рукописи, внесение замечаний и исправлений членами исследовательской группы, в том числе на этапах до и после публикации.

ЛИТЕРАТУРА

- Бибарсова, А. А., Семенова, Е. Ф., Золкина, Н. Г., Моисеева, И. Я., Степанова, А. П., & Ловцова, Л. Б. (2022). *Штамм бактерий Lactococcus lactis subsp. cremoris 36 RCAM 05396, используемый при производстве кисломолочных диетических продуктов* (патент РФ № RU2780155C1). Пензенский государственный университет. <https://patents.google.com/patent/RU2780155C1/ru>
- Грицкевич, Е. Р., Бученков, И. Э., & Иконникова, Н. В. (2017). *Лабораторный практикум по микробиологии*. Минск: ИВЦ Минфина.
- Гусева, Т. Б., Солдатова, С. Ю., & Караньян, О. М. (2021). Органолептическая оценка молочных консервов: особенности проведения и интерпретации результатов. *Товаровед продовольственных товаров*, (10), 726–729. <https://doi.org/10.33920/igt-01-2110-01>
- Китаевская С.В. (2015). Изучение способности молочнокислых бактерий продуцировать липолитические ферменты. *Вестник Казанского технологического университета*, 18(18), 256–258.

Вольнова Екатерина Романовна: формулирование идеи исследования, целей и задач, административное управление планированием и проведением исследования, создание и подготовка результатов исследования: визуализация результатов исследования и полученных данных, создание и подготовка рукописи: критический анализ черновика рукописи, внесение замечаний и исправлений членами исследовательской группы, в том числе на этапах до и после публикации.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Ekaterina Romanovna Volnova: supervision, formulation or evolution of overarching research goals and aims, management and coordination responsibility for the research activity planning and execution, conducting a research and investigation process, specifically performing the experiments, or data/evidence collection, preparation, creation and/or presentation of the published work by those from the original research group, specifically critical review, commentary or revision - including pre- or post-publication stages

Maria Sergeevna Kanochkina: formulation or evolution of overarching research goals and aims, management and coordination responsibility for the research activity planning and execution, preparation, creation and/or presentation of the published work, specifically visualization/data presentation, preparation, creation and/or presentation of the published work by those from the original research group, specifically critical review, commentary or revision - including pre- or post-publication stages.

- Куш, И. В., Баиров, А. Л., & Удавлиев, Д. И. (2021). Современные методы выделения и идентификации микроорганизмов в пищевых продуктах. *Ветеринарная патология*, 4(78), 49–56. <https://doi.org/10.25690/VETPAT.2021.91.53.002>
- Петров, А. Н., Матвеевко, А. С., & Стрижко, М. Н. (2013). Исследование штаммов микроорганизмов, обладающих β -галактозидазной активностью, и их анализ. *Техника и технология пищевых производств*, (1), 16–20.
- Angelakis, E., Million, M., Henry, M. and Raoult, D. (2011), Rapid and Accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Food Science*, 76, M568–M572. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02369.x>
- Barbosa, J. P., Trindade, D. P. A., Martins, E. M. F., & Tette, P. A. S. (2022). Lactic acid bacteria isolated from fruits: A review on methods for evaluation of probiotic potential. *Journal of Food and Nutrition Research*, 10(10), 711–726. <https://doi.org/10.12691/jfnr-10-10-9>
- Bintsis T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4), 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- De Chiara, I., Marasco, R., Della Gala, M., Fusco, A., Donnarumma, G., & Muscariello, L. (2024). Probiotic properties of *Lactococcus lactis* Strains isolated from natural whey starter cultures. *Foods*, 13(6), 957. <https://doi.org/10.3390/foods13060957>
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Wernicki A. (2016). 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiology* 16, 105(2016). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0732-5>
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194–199. <https://doi.org/10.1159/000104752>
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., & Collins, J. K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 386S–392S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.386s>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Maradona, M. P., Querol, A., Sijtsma, L., Suarez, J. E., Sundh, I., Vlak, J., Barizzzone, F., Hempen, M., Correia, S., & Herman, L. (2022). Update of the list of QPS-recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 16: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2022. *EFSA Journal*, 20(7), e07408. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7408>
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., & Ouwehand, A. C. (2019). The Production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030083>
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2014). The genera *Lactococcus* and *Pediococcus*. In M. Dworkin (Ed.), *The Prokaryotes* (pp. 177–237). Springer.
- Hussain, N., Tariq, M., Saris, P.E.J., & Zaidi, A. (2021) Evaluation of the probiotic and postbiotic potential of lactic acid bacteria from artisanal dairy products against pathogens. *Journal of Infection in Developing Countries*, 15, 102–112. <https://doi.org/10.3855/jidc.13404>
- Kaur Sidhu, P., & Nehra, K. (2021). *Bacteriocins of lactic acid bacteria as potent antimicrobial peptides against food pathogens*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95747>
- Khemariya, P., Singh, S., Nath, G., & Gulati, A. K. (2017). Probiotic *Lactococcus lactis*: A review. *Turkish Journal of Agriculture — Food Science and Technology*, 5(6), 556–562. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i6.556-562.690>
- Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Sasaki, K., Kobayashi, M., & Mizumachi, K. (2010). Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions

- simulated gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 226–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.033>
- Kondrotiene, K., Zavistanaviciute, P., Aksomaitiene, J., Novoslavskij, A., & Malakauskas, M. (2024). *Lactococcus lactis* in dairy fermentation-health-promoting and probiotic properties. *Fermentation*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010016>
- Lauková, A., Maďar, M., Zábolyová, N., Troscianczyk, A., & Pogány Simonová, M. (2024). Fortification of goat milk yogurts with encapsulated postbiotic active *Lactococci*. *Life*, 14(9), 1147. <https://doi.org/10.3390/life14091147>
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
- Mafe, A.N., Iruoghene Edo, G., Akpogheli, P.O., Gaaz, T., S., Yousif E., Zainulabdeen K., Isoje E. F., Igbuku U. A., Opiti R. A., Garba Y., Essaghah A. E. A., Ahmed D. S., Umar H. (2025). Probiotics and food bioactives: Unraveling their impact on gut microbiome, inflammation, and metabolic health. *Probiotics & Antimicrob Proteins*, 17, 1851–1892. <https://doi.org/10.1007/s12602-025-10452-2>
- Minj, J., Chandra, P., Paul, C., & Sharma, R. K. (2020). Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: Current applications and research perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(13), 2207–2224. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1774496>
- Nagy, E., & Schuetz, A. (2018). Advancing MALDI-TOF MS applications in anaerobic bacteriology. *Anaerobe*, 54, 189–190. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.010>
- Noun, M., Akoumeh, R., & Abbas, I. (2022). Cell and tissue imaging by TOF-SIMS and MALDI-TOF: An overview for biological and pharmaceutical analysis. *Microscopy and Microanalysis*, 28(1), 1–26. <https://doi.org/10.1017/S1431927621013593>
- Reynolds, P. E. (1989). Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 8(11), 943–950. <https://doi.org/10.1007/BF01967563>
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00375-8)
- Sanca, F. M. M., Blanco, I. R., Dias, M., Moreno, A. M., Martins, S. M. M. K., Stephano, M. A., Mendes, M. A., Mendonça, C. M. N., Pereira, W. A., Azevedo, P. O. S., Gierus, M., & Oliveira, R. P. S. (2023). Antimicrobial activity of peptides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on swine pathogens. *Animals*, 13(15), 2442. <https://doi.org/10.3390/ani13152442>
- Shah, A. B., Baiseitova, A., Zahoor, M., Ahmad, I., Ikram, M., Bakhsh, A., Shah M. A., Ali I., Idress M., Ullah R., Al-Zharani, M. (2024). Probiotic significance of *Lactobacillus* strains: A comprehensive review on health impacts, research gaps, and future prospects. *Gut Microbes*, 16(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2431643>
- Staronenkova, M.A., Chikhalina, T.V., & Namsaraev, Z.B. (2023). Russian market of enzyme preparations and microorganisms for the food industry. *Nanotechnol Russia*, 18, 475–479. <https://doi.org/10.1134/S2635167623700349>
- Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Lin, M. (2022). Research progress of fermented functional foods and protein factory-microbial fermentation technology. *Fermentation*, 8(12), 688. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120688>
- Tang, T., & Leisner, J. (2024). Bacteriocin antagonistic potentials of *Lactococcus cremoris* and *Lactococcus lactis* isolates from different habitats. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10361-w>
- Tenea, G. N., Hurtado, P., & Ortega, C. (2018). Inhibitory effect of substances produced by native *Lactococcus lactis* strains of tropical fruits towards food pathogens. *Preventive Nutrition and Food Science*, 23(3), 260–268. <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.3.260>
- Venegas-Ortega, M.G., Flores-Gallegos, A.C., Martínez-Hernández, J.L., Aguilar, C.N. and Nevárez-Moorillón, G.V. (2019). Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria:

- A sustainable approach for healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12455>
- Walsh, C. T., Fisher, S. L., Park, I. S., Prahalad, M., & Wu, Z. (1996). Bacterial resistance to vancomycin: Five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *Chemistry & Biology*, 3(1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(96\)90079-4](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(96)90079-4)
- Wu, F., Xie, X., Du, T., Jiang, X., Miao, W., & Wang, T. (2023). *Lactococcus lactis*, a bacterium with probiotic functions and pathogenicity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(12), 325. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03771-5>

REFERENCES

- Bibarsova, A. A., Semenova, E. F., Zolkina, N. G., Moiseeva, I. Ya., Stepanova, A. P., & Lovtsova, L.B. (2022). *Strain of bacteria Lactococcus lactis subsp. cremoris 36 RCAM05396 used in the production of fermented milk dietary products* (Patent No. RU2780155C1). Penza State University. <https://patents.google.com/patent/RU2780155C1/ru>. (In Russ.)
- Guseva, T. B., Soldatova, S. Yu., & Karanyan, O. M. (2021). Organoleptic evaluation of canned milk products: Features of conducting and interpreting results. *Tovaroved Prodovol'stvennykh Tovarov*, (10), 726–729. <https://doi.org/10.33920/igt-01-2110-01>. (In Russ.)
- Kitaevskaia, S. V. (2015). Study of the ability of lactic acid bacteria to produce lipolytic enzymes. *Bulletin of Kazan Technological University*, 18(18), 256–258. (In Russ.)
- Kushch, I. V., Bairov, A. L., & Udavliev, D. I. (2021). Modern methods of isolation and identification of microorganisms in food products. *Veterinary pathology*, 4(78), 49–56. (In Russ.) <https://doi.org/10.25690/VETPAT.2021.91.53.002>.
- Petrov, A. N., Matveenko, A. S., & Strizhko, M. N. (2013). Study of microorganism strains with β -galactosidase activity and their analysis. *Technique and Technology of Food Production*, (1), 16–20. (In Russ.)
- Angelakis, E., Million, M., Henry, M. and Raoult, D. (2011), Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Food Science*, 76, M568-M572. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02369.x>
- Barbosa, J. P., Trindade, D. P. A., Martins, E. M. F., & Tette, P. A. S. (2022). Lactic acid bacteria isolated from fruits: A review on methods for evaluation of probiotic potential. *Journal of Food and Nutrition Research*, 10(10), 711–726. <https://doi.org/10.12691/jfnr-10-10-9>.
- Bintsis T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4), 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- De Chiara, I., Marasco, R., Della Gala, M., Fusco, A., Donnarumma, G., & Muscariello, L. (2024). Probiotic properties of *Lactococcus lactis* Strains isolated from natural whey starter cultures. *Foods*, 13(6), 957. <https://doi.org/10.3390/foods13060957>
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Wernicki A. (2016). 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiology*, 16, 105. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0732-5>
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194–199. <https://doi.org/10.1159/000104752>
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., & Collins, J. K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 386S–392S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.386s>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S.,

- Fernández Escámez, P. S., Maradona, M. P., Querol, A., Sijtsma, L., Suarez, J. E., Sundh, I., Vlak, J., Barizzone, F., Hempten, M., Correia, S., & Herman, L. (2022). Update of the list of QPS-recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 16: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2022. *EFSA Journal*, 20(7), e07408. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7408>
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., & Ouwehand, A. C. (2019). The Production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030083>
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2014). The genera *Lactococcus* and *Pediococcus*. In M. Dworkin (Ed.), *The Prokaryotes* (pp. 177–237). Springer.
- Hussain, N., Tariq, M., Saris, P.E.J., & Zaidi, A. (2021) Evaluation of the probiotic and postbiotic potential of lactic acid bacteria from artisanal dairy products against pathogens. *Journal of Infection in Developing Countries*, 15, 102–112. <https://doi.org/10.3855/jidc.13404>
- Kaur Sidhu, P., & Nehra, K. (2021). *Bacteriocins of lactic acid bacteria as potent antimicrobial peptides against food pathogens*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95747>
- Khemariya, P., Singh, S., Nath, G., & Gulati, A. K. (2017). Probiotic *Lactococcus lactis*: A review. *Turkish Journal of Agriculture — Food Science and Technology*, 5(6), 556–562. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i6.556-562.690>
- Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Sasaki, K., Kobayashi, M., & Mizumachi, K. (2010). Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 226–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.033>
- Kondrotiene, K., Zavistanaviciute, P., Aksomaitiene, J., Novoslavskij, A., & Malakauskas, M. (2024). *Lactococcus lactis* in dairy fermentation-health-promoting and probiotic properties. *Fermentation*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010016>
- Lauková, A., Maďar, M., Zábolyová, N., Trościanczyk, A., & Pogány Simonová, M. (2024). Fortification of goat milk yogurts with encapsulated postbiotic active *Lactococci*. *Life*, 14(9), 1147. <https://doi.org/10.3390/life14091147>
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
- Mafe, A.N., Iruoghene Edo, G., Akpogheli, P.O., Gaaz, T., S., Yousif E., Zainulabdeen K., Isoje E. F., Igbuku U. A., Opiti R. A., Garba Y., Essaghah A. E. A., Ahmed D. S., & Umar H. (2025). Probiotics and food bioactives: Unraveling their impact on gut microbiome, inflammation, and metabolic health. *Probiotics & Antimicrob Proteins*, 17, 1851–1892. <https://doi.org/10.1007/s12602-025-10452-2>
- Minj, J., Chandra, P., Paul, C., & Sharma, R. K. (2020). Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: Current applications and research perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(13), 2207–2224. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1774496>
- Nagy, E., & Schuetz, A. (2018). Advancing MALDI-TOF MS applications in anaerobic bacteriology. *Anaerobe*, 54, 189–190. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.010>
- Noun, M., Akoumeh, R., & Abbas, I. (2022). Cell and tissue imaging by TOF-SIMS and MALDI-TOF: An overview for biological and pharmaceutical analysis. *Microscopy and Microanalysis*, 28(1), 1–26. <https://doi.org/10.1017/S1431927621013593>
- Reynolds, P. E. (1989). Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 8(11), 943–950. <https://doi.org/10.1007/BF01967563>
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00375-8)
- Sanca, F. M. M., Blanco, I. R., Dias, M., Moreno, A. M., Martins, S. M. M. K., Stephano, M. A., Mendes, M. A., Mendonça, C. M. N., Pereira, W. A., Azevedo, P. O. S., Gierus, M., & Oliveira, R. P. S.

- (2023). Antimicrobial activity of peptides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on swine pathogens. *Animals*, 13(15), 2442. <https://doi.org/10.3390/ani13152442>
- Shah, A. B., Baiseitova, A., Zahoor, M., Ahmad, I., Ikram, M., Bakhsh, A., Shah M. A., Ali I., Idress M., Ullah R., Al-Zharani, M. (2024). Probiotic significance of Lactobacillus strains: A comprehensive review on health impacts, research gaps, and future prospects. *Gut Microbes*, 16(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2431643>
- Staronenkova, M.A., Chikhalina, T.V., & Namsaraev, Z.B. (2023). Russian market of enzyme preparations and microorganisms for the food industry. *Nanotechnol Russia*, 18, 475–479. <https://doi.org/10.1134/S2635167623700349>.
- Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Lin, M. (2022). Research progress of fermented functional foods and protein factory-microbial fermentation technology. *Fermentation*, 8(12), 688. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120688>
- Tang, T., & Leisner, J. (2024). Bacteriocin antagonistic potentials of *Lactococcus cremoris* and *Lactococcus lactis* isolates from different habitats. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10361-w>
- Tenea, G. N., Hurtado, P., & Ortega, C. (2018). Inhibitory effect of substances produced by native lactococcus lactis strains of tropical fruits towards food pathogens. *Preventive Nutrition and Food Science*, 23(3), 260–268. <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.3.260>
- Venegas-Ortega, M.G., Flores-Gallegos, A.C., Martínez-Hernández, J.L., Aguilar, C.N. and Nevárez-Moorillón, G.V. (2019). Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: A sustainable approach for healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12455>
- Walsh, C. T., Fisher, S. L., Park, I. S., Prahalad, M., & Wu, Z. (1996). Bacterial resistance to vancomycin: Five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *Chemistry & Biology*, 3(1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(96\)90079-4](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(96)90079-4)
- Wu, F., Xie, X., Du, T., Jiang, X., Miao, W., & Wang, T. (2023). *Lactococcus lactis*, a bacterium with probiotic functions and pathogenicity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(12), 325. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03771-5>

ОБ АВТОРАХ

Каночкина Мария Сергеевна, кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза Российского биотехнологического университета (РОСБИОТЕХ) (125080, Российская Федерация, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11), ORCID: <https://orcid.org/000-0001-6077-5957>, Researcher ID: PLC-7976-2026, SPIN-код: 2584-6474, kanoch@yandex.ru

Вольнова Екатерина Романовна, кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза Российского биотехнологического университета (РОСБИОТЕХ) (125080, Российская Федерация, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0015-446X>, Scopus ID: 57210195443, Researcher ID: ABW-2963-2022, SPIN-код: 6202-0966, volnovaer@mgupp.ru

ABOUT THE AUTHORS

Maria Sergeevna Kanochkina, Cand. Sci. (Technology), Associate Professor, Department of Biotechnology and Technology of Bioorganic Synthesis Products, Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH) (11 Volokolamsk Highway, Moscow, 125080, Russian Federation), ORCID: <https://orcid.org/000-0001-6077-5957>, Researcher ID: PLC-7976-202, SPIN-код: 2584-6474, kanoch@yandex.ru

Ekaterina Romanovna Volnova, Cand. Sci. (Technology), Associate Professor, Department of Biotechnology and Technology of Bioorganic Synthesis Products, Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH) (11 Volokolamsk Highway, Moscow, 125080, Russian Federation), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0015-446X>, Scopus ID: 57210195443, Researcher ID: ABW-2963-2022, SPIN-код: 6202-0966, volnovaer@mgupp.ru