

Разработка биотехнологии кисломолочного продукта с *Lactobacillus reuteri* LR1 и исследование его функциональных свойств в эксперименте *in vitro* и *in vivo*

- [Семенихина Вера Филатовна](#)
- [Рожкова Ирина Владимировна](#)
- [Бегунова Анна Васильевна](#)
- [Федорова Татьяна Васильевна](#)
- [Ширшова Татьяна Ивановна](#)

Резюме

*В статье представлены данные о разработке биотехнологии кисломолочного продукта с использованием пробиотического штамма *Lactobacillus reuteri* LR1 в монокультуре на молоке и молоке с добавлением ростовых веществ, а также на молоке при совместном культивировании с закваской, состоящей из *Lactobacillus helveticus* NK1 и *Streptococcus thermophilus* (ХТС). Установлены биотехнологические параметры кисломолочного продукта, обеспечивающие необходимое количество клеток *L. reuteri* LR1: доза закваски ХТС 3-4%, доза закваски *L. reuteri* LR1 6%, температура сквашивания 37 ± 1 °С, продолжительность сквашивания 6 ч. Установлено, что при внесении в молоко дрожжевого экстракта как стимулятора роста количество клеток *L. reuteri* LR1 при развитии в монокультуре через 8 ч культивирования достигает $5,9 \times 10^8$ КОЕ/см³, в то время как без него - $1,6 \times 10^7$ КОЕ/см³. Разработанный продукт обладает выраженной антагонистической активностью по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам - *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae*. Степень выживания исходной численности тест-культур при совместном культивировании с продуктом по сравнению с развитием чистой тест-культуры на 1-е сутки изменялась в диапазоне от 36 до 46%, а на 2-е сутки - от 8 до 20%. Исследования по определению функциональных свойств разработанного кисломолочного продукта проводили в условиях однофакторного эксперимента на белых крысах линии Вистар (с исходной массой тела 160 ± 10 г, $n=10$ в каждой группе) и показали его эффективность в плане нормализации состава микробиоты и ряда показателей липидного обмена. Показано, что исследуемый кисломолочный продукт при введении в рацион (5 мл/сут *per os*) в течение 30 сут не вызывает отклонений в состоянии здоровья и поведении лабораторных животных *spf*-категории. У животных всех групп (интакт, контроль и опыт) содержание лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов и их распределение по популяциям находились в пределах физиологической нормы. При введении в рацион экспериментальных животных разработанного продукта в составе микробиома кишечника крыс увеличилось содержание бифидо- и лактобактерий, а также энтеробактерий, типичных для нормофлоры крыс. Со стороны биохимических показателей, характеризующих липидный обмен, у крыс, потреблявших кисломолочные продукты (контроль и опыт), статистически значимо снизилась концентрация холестерина в сыворотке крови, а у животных, получавших разработанный продукт, - и концентрация триглицеридов относительно показателей интактных животных. Штамм *L. reuteri* LR1 является первым выделенным в России и охарактеризованным как пригодный для производства пробиотических пищевых продуктов, поскольку до сих пор в составе таких продуктов используются штаммы зарубежного производства.*

Ключевые слова: *Lactobacillus reuteri* LR1, *Lactobacillus helveticus* NK1, *Streptococcus thermophilus*, факторы роста, совместное культивирование, технологические параметры, степень выживания, функциональные свойства

Вопр. питания. 2018. Т. 87, № 5. С. 52-62. doi: 10.24411/0042-8833-2018-10053.

В настоящее время молочные заводы выпускают большое количество кисломолочных продуктов с пробиотиками (бифидобактериями, ацидофильными молочнокислыми палочками, пропионовокислыми бактериями, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* и др.), которые являются представителями нормальной кишечной микрофлоры человека. Для увеличения объема производства кисломолочных продуктов с пробиотическими свойствами перспективны представляются поиск новых пробиотических штаммов и разработка на их основе продуктов функционального назначения [1, 2]. Одним из таких штаммов является *Lactobacillus reuteri*.

L. reuteri - это вид гетероферментативных молочнокислых бактерий, которые присутствуют в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) человека и животных и считаются одними из немногих истинно аутохтонных видов лактобацилл, присущих человеку. *L. reuteri* был выделен из фекалий человека и идентифицирован как *L. fermentum* Biotyp 11 [3]. Впоследствии был переклассифицирован и назван *L. reuteri* на основе детально изученного типа муреина клеточной стенки, ДНК-гомологии и G+C содержания [4]. *L. reuteri* развивается при температуре 45 °С, но не развивается при 15 °С, оптимальная температура роста составляет 35-38 °С и активная кислотность 6,0-6,8 ед. рН. *L. reuteri* ферментирует глюкозу, фруктозу, арабинозу, рибозу, сукрозу, раффинозу и глюконат. Клеточная стенка бактерий не содержит тейхоиновой кислоты и муреин лизин-D-изоаспарагинового типа.

Такие штаммы *L. reuteri*, как DSM 17938, ATCC 55730, ATCC PTA 6475, наряду с другими представителями лактобацилл широко используются для профилактики и комплексного лечения не только некоторых гастроэнтерологических заболеваний (хеликобактериоз, синдром раздраженного кишечника и др.) [5-7], но и таких, как нозокомиальная пневмония [8, 9], метаболический синдром и опосредованные с ним сердечно-сосудистые заболевания, ожирение, диабет и др. [10, 11]. В последнее время все большее количество исследований посвящено изучению влияния микрофлоры ЖКТ на работу центральной нервной системы. Так, хроническое воспаление и/или иммунная активация ЖКТ, которые лежат в основе этиологии синдрома раздраженного кишечника и в первую очередь связаны с нарушением нормального состава микробиома кишечника, являются фактором риска при расстройствах центральной нервной системы, таких как депрессия, нервная анорексия, обсессивно-компульсивное расстройство и аутизм [12, 13].

Клинические испытания показали, что прием *L. reuteri* безопасен как для детей, так и для взрослых, обеспечивает нормализацию микробиома кишечника у человека, достоверно снижает частоту и тяжесть диареи различной этиологии, снижает частоту возникновения инфекций и воспаления ЖКТ [14-18]. Являясь кислотоустойчивыми, они сохраняются в желудке дольше прочих бактерий, выживая в больших количествах (80%) в желудке в течение 2 ч.

Штамм *L. reuteri* LR1 был выделен в 2014 г. из фекалий человека, идентифицирован современными методами в ФГАНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности" и показана его антагонистическая активность в отношении многих патогенных микроорганизмов, в том числе характеризующихся множественной устойчивостью к антибиотикам [19]. Штамм лактобацилл данного вида является первым,

выделенным в России и охарактеризованным как пригодный для производства пробиотических пищевых продуктов, поскольку до сих пор в составе таких продуктов используются штаммы зарубежного производства.

Цель настоящей работы - установить технологические параметры производства кисломолочного продукта с использованием *L. reuteri* LR1 и *L. helveticus* NK1 при совместном культивировании и исследовать функциональные свойства разработанного продукта.

Материал и методы

Для восстановления культуры *L. reuteri* LR1 использовали среду MPC (MRS) жидкую, культивировали при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в анаэробных условиях. Культивирование всех образцов проводили на приборе параллельных биореакторов (DAS GIP, Германия) при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ с автоматическим измерением активной кислотности. Отбирали пробы через каждые 2 ч от начала культивирования.

Влияние дрожжевого экстракта пищевого качества как ростового фактора на изменение активной кислотности штамма *L. reuteri* LR1 в процессе культивирования определяли инокулированием 6% закваски в стерилизованное обезжиренное молоко и в стерилизованное обезжиренное молоко с добавлением 0,2% дрожжевого экстракта и выдерживанием в течение 24 ч при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$. Процент внесения инокулята *L. reuteri* LR1 и температура его культивирования были выбраны на основании ранее проведенных исследований [20]. Количество вносимого инокулята *L. helveticus* NK1 и *Streptococcus thermophilus* (ХТС) варьировали от 1 до 6%. Внесение *L. reuteri* LR1 во всех опытах составляло 6%.

Количество клеток *L. reuteri* LR1 при совместном культивировании с ХТС определяли методом предельных разведений в среде гидролизатно-молочной среде ГМК-1 и MRS-агаре с добавлением ампициллина в количестве 2 мг/дм^3 среды и культивировании посевов в анаэробных условиях в течение 3-5 дней при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ [21]. Колонии, выросшие на ГМК-1 и MRS-агаре с добавлением ампициллина, микроскопировали и проводили морфологическую оценку принадлежности клеток к *L. reuteri*. Количество клеток ХТС определяли методом предельных разведений в стерильном обезжиренном молоке при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3-5 дней по ГОСТ 33951-2016.

Исследования по определению антагонистической активности разработанного продукта по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре проводили методом развивающихся смешанных популяций в соответствии с МУ 2.3.2.2789-10 [22]. В качестве тест-штаммов были выбраны вероцитотоксигенный штамм *Escherichia coli* ATCC 25922, антибиотикорезистентный штамм *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, полученные из коллекции ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздрава России, и возбудитель внутрибольничных инфекций антибиотикорезистентный штамм *Klebsiella pneumoniae*, полученный из Национального медицинского исследовательского центра трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова.

Статистическую обработку данных проводили по результатам 3-4 повторностей, построение графиков, диаграмм и таблиц с применением программ Statistica 10 и Microsoft Office 2010.

Исследования по определению функциональных свойств разработанного кисломолочного продукта проводили в условиях однофакторного эксперимента на белых крысах линии Вистар на базе экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения в ФГБНУ "Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова".

Исследования проводили на клинически здоровых сексуально наивных животных SPF-категории, полученных из НПП "Питомник лабораторных животных" филиала ФГБНУ "Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова" РАН(Пушино, Россия), случайным образом отобранных, индивидуально промаркированных и прошедших адаптацию на протяжении 5 сут, с исходной массой тела 160 ± 10 г.

На протяжении периода адаптации и в течение эксперимента животных содержали в системе индивидуально вентилируемых клеток [в составе вентиляционного блока VENT II и стеллажа с клетками типа Bio A.S. (ENRET, Германия), при оптимальном микроклимате в каждой отдельной клетке: температуре (22 ± 3) °С, влажности 50-60%, освещении 12/12 - световой день с 6.00 до 18.00].

Животные были произвольно распределены на группы по 10 крыс: животные 1-й группы (интактные) на протяжении всего эксперимента потребляли стандартный рацион вивария (ОРВ) - полнорационный комбикорм по ТУ 9296-002-70941247 ("Лабораторкорм", Россия); крысам 2-й группы (контрольные) дополнительно к ОРВ вводили кисломолочный продукт, сквашенный с использованием закваски *Str. thermophilus* "Контроль"; животным 3-й группы (опытные) дополнительно к ОРВ вводили кисломолочный продукт, сквашенный с использованием закваски *L. reuteri* LR1, *Str. thermophilus* и *L. helveticus* NK1 - "Опыт".

На протяжении всего срока проведения исследований экспериментальные животные получали изокалорийные (400 ккал/100 г сухого корма) полноценные рационы (табл. 1, 2).

Таблица 1. Состав стандартного рациона вивария

Компонент		Содержание, %, в 100 г сухого продукта
Казеин (86% белка)*		12,0
Жировая композиция	лярд	7,7
	масло подсолнечное	3,8
Крахмал		72,0
Минеральная смесь**		4,0
Жирорастворимые витамины***		1,0
Водорастворимые витамины****		0,1

Примечание. * – белок коровьего молока CA.160030 (ENVIGO, Новая Зеландия); ** – состав (г на 1 кг смеси); натрий хлористый NaCl – 139; калий фосфорнокислый однозамещенный K_2HPO_4 – 338,8; магний серноокислый гидрат $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 57,4; кальций углекислый $CaCO_3$ – 381,4; железо (II) сернокислое $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 26,4; йодид калия KI – 0,77; марганец серноокислый $MnSO_4 \times 2H_2O$ – 4,45; медь сернокислая гидрат $CuSO_4 \times 5H_2O$ – 0,48; кобальт хлористый гидрат $CoCl_2 \times 6H_2O$ – 0,24; фтористый натрий NaF – 0,5; алюминиевокалиевые квасцы $AlK(SO_4)_2 \times 12H_2O$ – 0,11; *** – состав (мл на 100 мл раствора): α -токоферол (50 мг/мл) – 10; ретинол (100 тыс. МЕ/мл) – 0,8; холекальциферол (50 тыс. МЕ/мл) – 1,4; подсолнечное масло рафинированное дезодорированное до 100 мл; **** – состав (в мг на 100 г смеси): тиамин (B_1) – 500; рибофлавин (B_2) – 500; пиридоксин (B_6) – 500; пантотенат кальция (B_5) – 2800; никотиновая кислота (B_3) – 2000; фолиевая кислота (B_9) – 200; цианокобаламин (B_{12}) – 4; викасол (K) – 100; глюкоза – 93400.

Таблица 2. Состав суточного рациона животных экспериментальных групп

Состав рациона	Экспериментальные группы животных		
	1-я (интактная)	2-я (контрольная)	3-я (опытная)
Стандартный рацион вивария, г	29,0	29,0	29,0
Кисломолочный продукт, мл (<i>Str. thermophilus</i> – 10^7 КОЕ/г) с содержанием в 100 г менее 0,5% жира, 3,0% белка, 3,7% углеводов	–	5,0	–
Кисломолочный продукт, мл (<i>Str. thermophilus</i> и <i>L. helveticus</i> NK1 – 10^7 КОЕ/г, <i>L. reuteri</i> LR1 – 10^6 КОЕ/г) с содержанием в 100 г менее 0,5% жира, 3,0% белка, 3,7% углеводов	–	–	5,0
Количество съедаемого корма на голову крысы (среднее значение), г	29,0	34,0	34,0
Энергетическая ценность (калорийность), ккал	116	118	118

В сутки животные всех экспериментальных групп потребляли по 29 г ОРВ (116 ккал). Животные в контрольной и опытной группах получали рационы, состоящие из комбикорма и исследуемых кисломолочных продуктов, которые скармливали в дополнение в количестве по 5 мл на голову (2 ккал) в сутки. Таким образом, доля кисломолочного продукта составила 14,7% от массы корма в сутки. Исследуемые продукты вводили животным индивидуально, ежедневно *per os*.

Животные на протяжении эксперимента потребляли корм и воду *ad libitum*. Питательную воду для поения лабораторных животных получали на установке водоподготовки EMD Millipore RiOs™ 50 (Merck Millipore, Германия). Минерализацию воды осуществляли путем добавления в нее минеральных солей для получения физиологически полноценного минерального состава (минерализация 314-382 мг/л: гидрокарбонаты -144-180, хлориды - 60-76, кальций - 6, магний - 3, натрий - 50-58, калий - 50-58). Температура воды для поения составляла 10-12 °С.

Содержание, питание, уход за животными, манипуляции, выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями приказа Минздрава России от 1.04.2016 №

199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики", Международными правилами гуманного обращения с животными - Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей.

До начала исследования, каждые 4-е сутки и накануне эвтаназии животных взвешивали на электронных технических весах Ohaus (Adventurer Pro, США). По окончании эксперимента животных усыпляли в камере для эвтаназии (VetTech, Великобритания) с помощью углекислого газа.

Патологоанатомическое исследование включало осмотр внешней поверхности тела, всех отверстий, внутричерепной, грудной и брюшной полостей и их содержимого. Печень, почки, селезенка, сердце всех животных были надлежащим образом отделены от всехприлегающих тканей и взвешены во влажном состоянии, сразу после вскрытия во избежание высыхания, на электронных технических весах Ohaus (Adventurer Pro, США).

Содержание лимфоцитов (LYM), гранулоцитов (GRA) и моноцитов (MON) определяли на проточном цитометре Guava EasyCyte (Merck Millipore, Германия) посредством детектирования размера и гранулярности клеток. Содержание лейкоцитов определяли расчетным путем по формуле:

$$WBC = LYM + GRA + MON.$$

Относительное содержание лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов определяли расчетным путем по формулам: $LYM/WBC \times 100\%$, $GRA/WBC \times 100\%$, $MON/WBC \times 100\%$.

Биохимические исследования проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе BioChem FC-360 (HTI, США), используя наборы реактивов (High Technology, США). В крови животных определяли концентрацию общего белка, альбумина, глюкозы, креатинина, холестерина, триглицеридов.

Для количественного учета групп микроорганизмов навеску из фекалий крыс массой 1 г вносили в регенерированный агаризованный (0,1%) тиогликолево-фосфатный буфер, в соотношении 1:10. Из этой суспензии готовили последовательные 10-кратные разведения, которые вносили в соответствующие питательные среды.

Бифидобактерии в фекальных массах животных определяли на среде TOS-MUP агар (TOS пропионатный агар с мупироцином лития); лактобациллы - на среде MPC (MRS); энтеробактерии - на среде Эндо и цитратном агаре. Содержание стафилококков определяли на желточно-солевом агаре, с последующим определением плазмокоагулирующей активности; энтерококков - на среде МИС (молочно-ингибиторная среда); дрожжей и плесневых грибов - на среде Сабуро. Содержание микроорганизмов выражали в lg КОЕ/г сырой массы фекалий.

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 10. Результаты представляли в виде "среднее значение \pm ошибка среднего" ($M \pm m$). Статистическую достоверность оценивали с применением однопараметрического ANOVA-теста с применением критерия Тьюки (при уровне значимости 0,05).

Результаты и обсуждение

Разработка биотехнологии кисломолочного продукта с использованием пробиотического штамма *Lactobacillus reuteri* LR1

Результаты предварительных опытов по культивированию *L. reuteri* LR1 на молоке показали, что данный штамм обладает низкой кислотообразующей и протеолитической активностью, что согласуется и с данными литературы [23]. В связи с этим с целью интенсификации роста исследуемого штамма были поставлены опыты по накоплению клеток исследуемого штамма на стерилизованном молоке и на стерилизованном молоке с добавлением дрожжевого экстракта (рис. 1).

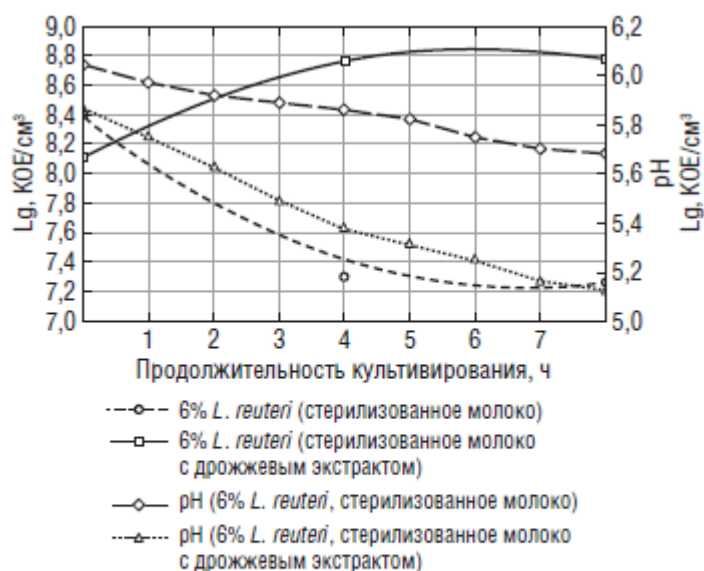


Рис. 1. Влияние дрожжевого экстракта на изменение количества клеток *Lactobacillus reuteri* LR1 и значение активной кислотности среды в процессе культивирования

Добавление дрожжевого экстракта к молоку способствовало развитию и накоплению клеток *L. reuteri* LR1, что свидетельствует о целесообразности использования дрожжевого экстракта как добавки в молоко для приготовления производственной закваски или продукта на основе чистой культуры *L. reuteri* LR1.

В центральной лаборатории микробиологии ФГАНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности" были проведены исследования по разработке биотехнологии бактериального концентрата *L. reuteri* LR1 и бактериального концентрата ассоциации штаммов *L. reuteri* LR1 и *L. helveticus* NK1. Отечественными и зарубежными исследователями давно отмечено, что совместное культивирование слабого кислотообразователя с более сильным оказывает стимулирующий эффект на рост и размножение первой культуры [23, 24]. Было высказано множество предположений по этому поводу, и одним из них было, что вторая культура в процессе своей жизнедеятельности расщепляет или синтезирует определенные вещества, которые необходимы для развития более слабой культуры. Разработанная 2-штаммовая ассоциация показала хорошие технологические свойства, но не всегда по органолептическим показателям (вкусу и консистенции) обеспечивала выход продукции требуемого качества. В связи с этим при дальнейшей разработке технологии кисломолочного продукта на основе *L. reuteri* LR1 были выбраны 2 культуры — *Str. thermophilus* и *L. helveticus* NK1, которые обладают более сильными протеолитическими системами, ускоряя процесс сквашивания молока и улучшая органолептические показатели продукта, такие как консистенция и вкус.

Был проведен ряд опытов по сокультивированию *L. reuteri* LR1 и композиции *L. helveticus* NK1 с *Str. thermophilus* (ХТС).

Инокулят ХТС получали культивированием 1% композиции (*L. helveticus* NK1 с *Str. thermophilus*) в стерилизованном молоке, инокулят *L. reuteri* LR1 готовили на стерильном обезжиренном молоке с добавлением дрожжевого экстракта в количестве 0,2%, культивирование инокулятов проводили при температуре 37 ± 1 °С.

Исследовали влияние закваски ХТС на развитие клеток *L. reuteri* LR1 в процессе сокультивирования на обезжиренном молоке, для чего одновременно производили инокуляцию закваски ХТС и *L. reuteri* LR1.

На рис. 2 показаны результаты эксперимента по оценке влияния дозы инокулята ХТС на развитие *L. re-uteri* LR1 в процессе их совместного культивирования.

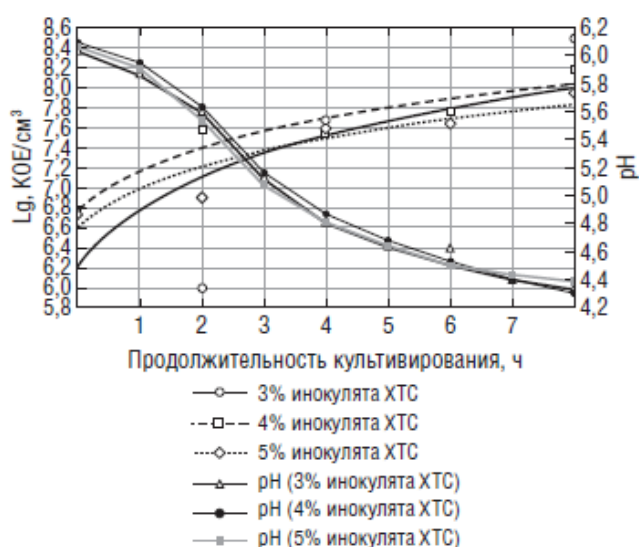


Рис. 2. Изменение количества клеток *Lactobacillus reuteri* LR1 и значения активной кислотности среды при совместном культивировании при внесении различных доз инокулята ХТС

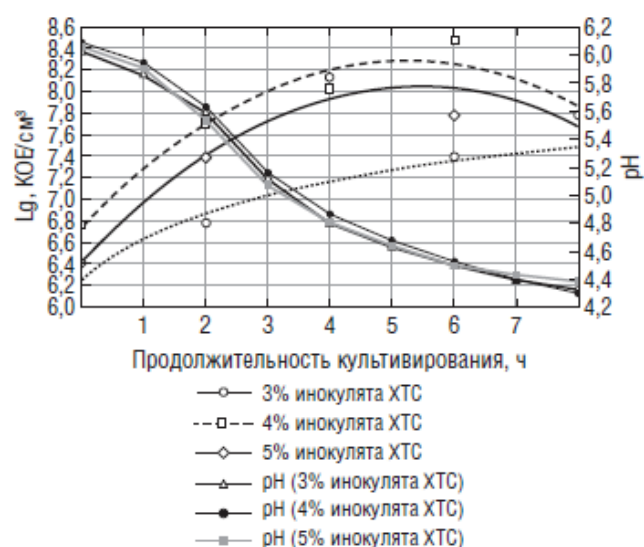


Рис. 3. Изменение количества клеток ХТС и значения активной кислотности среды в процессе сокультивирования с *Lactobacillus reuteri* LR1 при внесении различных доз инокулята ХТС

Представленные логарифмические кривые роста *L. reuteri* LR1 показывают практически одинаковую тенденцию роста штамма в процессе сокультивирования с закваской ХТС: через 4 и 6 ч содержание клеток *L. reuteri* LR1 находится в одном lg-диапазоне независимо от дозы ХТС, а через 8 ч количество клеток *L. reuteri* LR1 изменялось следующим образом: 3% ХТС - $3,3 \times 10^8$ КОЕ/см³, 4% ХТС - $1,5 \times 10^8$ КОЕ/см³, 5% ХТС - $8,9 \times 10^7$ КОЕ/см³.

Анализ полученных данных показал, что после 8 ч совместного культивирования увеличение дозы инокулята ХТС не способствовало увеличению количества клеток *L. reuteri* LR1.

Присутствие и размножение 2-штаммовой закваски ХТС в среде обеспечивает стимулирующий эффект на развитие пробиотического штамма. Но, с другой стороны, большое содержание этих клеток может оказывать конкурентное действие и ингибирующий эффект на пробиотический штамм из-за резкого понижения активной кислотности питательной среды. Наибольший прирост клеток *L. reuteri* LR1 наблюдался через 8 ч культивирования и составил при 3% ХТС - 25,9%, при 4% ХТС - 21,2%, при 5% ХТС - 18,0%.

Данные по изменению значений активной кислотности среды и количества клеток ХТС в процессе сокультивирования представлены на рис. 3.

Как видно из представленных данных, кривые кислотообразования для всех образцов одинаковы, активная кислотность достигает значения 4,6 ед. рН через 5 ч культивирования, а более активное развитие клеток наблюдается при внесении 4 и 5% инокулята ХТС. Наибольшее содержание клеток было отмечено после 6 ч культивирования при внесении 4% инокулята ХТС и составляло 7×10^8 КОЕ/см³.

Для того чтобы выбрать оптимальное технологическое решение производства кисломолочного продукта, обеспечивающего высокое содержание клеток *L. reuteri* LR1, данные проведенных исследований были обобщены и статистически обработаны (табл. 3).

Таблица 3. Прирост клеток *Lactobacillus reuteri* LR1 в зависимости от дозы внесения и продолжительности культивирования ХТС

Количество инокулята ХТС, %	Продолжительность культивирования, ч	Прирост клеток <i>L. reuteri</i> LR1, % от исходного
0	6	8*
	8	8*
3	6	14,9
	8	25,9
4	6	15,1
	8	21,2
5	6	13,5
	8	18,0

Примечание. * – культивирование *L. reuteri* LR1 на обезжиренном молоке с добавлением дрожжевого экстракта.

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, сокультивирование пробиотического штамма *L. reuteri* LR1 с закваской ХТС стимулирует рост *L. reuteri* LR1, повышая количество клеток в продукте.

При выборе момента прекращения сквашивания молока заквасочными культурами одним из важных критериев является значение активной кислотности сквашенного продукта. Для кисломолочного продукта, вырабатываемого на основе закваски ХТС, оптимальным уровнем активной кислотности является $4,6 \pm 0,1$ ед. рН. Этому требованию отвечает 6 ч культивирования при внесении инокулятов *L. reuteri* LR1 и ХТС 4,5 ед. рН (см. рис. 2). Но следует также отметить, что при внесении инокулятов *L. reuteri* LR1 и ХТС через 8 ч культивирования имеет место максимальный прирост клеток *L. reuteri* LR1.

Оценка функциональных свойств разработанного продукта

Одним из показателей, характеризующих функциональные свойства разработанного кисломолочного продукта, является его антагонистическая активность к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. На рис. 4 представлены результаты эксперимента по определению антагонистической активности разработанного продукта на основе закваски *L. reuteri* LR1 и ХТС по отношению к условно-патогенным и патогенным *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* ATCC 6538, *Kl. pneumoniae*.

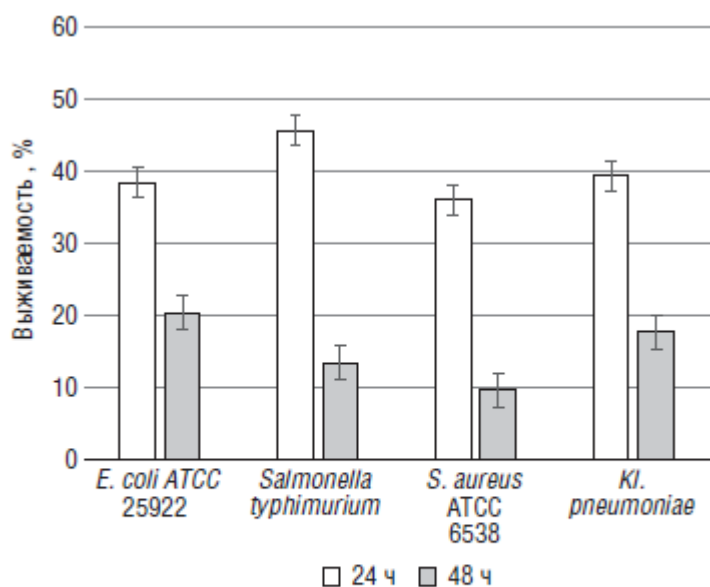


Рис. 4. Степень выживания штаммов тест-культур при совместном культивировании с разработанным продуктом на основе закваски *Lactobacillus reuteri* LR1 и ХТС

Как показали проведенные исследования (см. рис. 4), разработанный продукт обладает выраженной антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Степень выживания исходной численности тест-культур при совместном культивировании с продуктом по сравнению с развитием чистой тест-культуры на 1-е сутки изменялась в диапазоне от 36 до 46%, а на 2-е сутки - от 8 до 20%.

Воздействие образцов разработанного кисломолочного продукта на основе лактобактерий на нормальную микрофлору кишечника крыс оценивали в условиях *in vivo*.

Состояние животных до начала эксперимента находилось в пределах физиологической нормы. Крысы активно поедали корм: имело место полное потребление исследуемых образцов, как контрольных, так и опытных. Сохранность животных на протяжении эксперимента была 100%. Наблюдения за животными в течение 30 дней кормления изучаемыми кисломолочными продуктами свидетельствовали о том, что отклонений в состоянии здоровья и поведении крыс не отмечалось. Добавление разработанного и контрольного продуктов положительным образом сказывалось на усвоении корма. У крыс, потреблявших с рационом кисломолочные продукты "Опыт" и "Контроль", прибавка массы тела была выше показателя интактных животных (на 11 и 6% соответственно), хотя калорийность рационов интактных, опытных и контрольных крыс различалась незначительно (2 ккал).

Изучение видового состава и количественных уровней основных микробных популяций микробиома кишечника крыс и их функциональной активности показало положительное влияние продукта на основе закваски *L. reuteri* LR1 и ХТС, проявляющееся в повышении общего числа анаэробных бактерий, уровней защитных популяций лактобактерий и энтеробактерий, а также в снижении численности условно-патогенной микрофлоры, что может быть связано с действием пробиотиков, входящих в состав продукта (табл. 4).

Таблица 4. Состав микробиома кишечника крыс после включения в их рацион кисломолочных продуктов (содержание микроорганизмов, Ig КОЕ/г сырой массы фецес)

Группа животных	Анаэробы	Аэробы	Энтеробактерии	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>S. aureus</i>	Лактобациллы	Бифидобактерии	Дрожжи	Плесневые грибы
Интактная	8,4±0,3	8,4±0,3	5,0±0,2	7,7±0,2	6,8±0,3	2,3±0,1	8,3±0,2	8,3±0,2	2,3±0,3	4,5±0,4
Контрольная	8,7±0,4	8,4±0,3	5,2±0,3	7,4±0,4	6,6±0,2	2,3±0,4	8,6±0,1	8,6±0,2	2,3±0,4	3,9±0,3
Опытная	9,0±0,2*	8,6±0,2	5,9±0,5*.#	6,6±0,4*.#	4,9±0,4*.#	Не обнаружены*.#	9,5±0,4*	9,0±0,3*	Не обнаружены*.#	3,6±0,2*.#

Примечание. Здесь и в табл. 5 и 6: статистически значимое отличие ($p < 0,05$) от показателя: * – интактных животных; # – контрольных животных.

Таблица 5. Цитометрические показатели крови крыс

Показатель	Физиологическая норма [25]	Группа животных		
		интактная	контрольная	опытная
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,13–11,06	4,80±0,74	4,50±0,68	2,99±0,40
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,82–9,45	3,88±0,64	3,74±0,67	2,58±0,36
Моноциты, эозинофилы, базофилы и незрелые клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,03–1,5	0,04±0,01	0,04±0,01	0,02±0,00
Гранулоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,15–1,89	1,02±0,18	0,59±0,08*	0,39±0,04*
Лимфоциты, %	44,7–90	85,80±0,75	82,93±4,00*	76,92±3,46*
Моноциты, %	0,6–9,2	0,65±0,07	0,79±0,09	0,90±0,24
Гранулоциты, %	9,0–49,3	22,18±3,45	16,29±4,02*	13,55±0,75*.#

Таблица 6. Биохимические показатели сыворотки крови крыс

Показатель	Физиологическая норма [26]	Группа животных		
		интактная	контрольная	опытная
Общий белок, г/л	52–76	65,12±0,78	66,94±0,59	66,19±0,85
Альбумин, г/л	34–48	41,27±0,24	42,87±0,37	42,43±0,55
Креатинин, мкмоль/л	9,0–70,0	59,15±1,69	61,00±1,33	59,05±1,19
Билирубин общий, мкмоль/л	0,7–3,42	2,25±0,12	2,31±0,15	2,11±0,10
Холестерин, ммоль/л	0,962–2,47	2,37±0,11	1,83±0,06*	1,83±0,07*
Триглицериды, ммоль/л	0,22–1,76	1,09±0,07	1,06±0,14	0,71±0,05*.#
Глюкоза, ммоль/л	3,92–12,21	10,93±1,50	11,10±1,17	10,12±1,07

Благоприятное воздействие кисломолочных продуктов было характерно для продукта "Опыт". Так, у животных опытной группы условно-патогенные микроорганизмы (коагулазоположительные стафилококки, дрожжи) не обнаруживались.

У животных всех групп содержание лейкоцитов и лимфоцитов, гранулоцитов и их распределение по популяциям находилось в пределах физиологической нормы (табл. 5). У крыс, получавших кисломолочный продукт "Опыт", по сравнению с показателями интактных животных наблюдалось снижение содержания лейкоцитов и лимфоцитов на 37,7 и 33,5%, однако не достигшее уровня статистической значимости. При этом у крыс контрольной и опытной групп выявлено статистически значимое снижение содержания гранулоцитов на 42,2 и 61,8% соответственно по сравнению с показателем интактных крыс (см. табл. 5).

У животных всех групп гематологические показатели, характеризующие функциональное состояние эритроцитов и тромбоцитов, находились в пределах физиологической нормы - значимых отклонений между группами не отмечено.

При биохимическом исследовании крови животных (табл. 6) установлено, что содержание общего белка, альбумина и креатинина, билирубина и глюкозы было в пределах нормы.

Со стороны биохимических показателей, характеризующих липидный обмен, у крыс, потреблявших кисломолочные продукты, выявлено статистически значимое снижение концентрации холестерина в сыворотке крови, а у животных, получавших разработанный продукт, - и концентрации триглицеридов относительно показателей интактных животных. В настоящее время хорошо известны гипохолестеринемические свойства пробиотиков, подтвержденные как экспериментами *in vivo*, так и клиническими исследованиями [27]. В том числе показано, что потребление крысами сквашенного с использованием штамма *L. reuteri* LR6 молока на фоне диеты с повышенным содержанием холестерина приводило к значительному снижению концентрации общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови животных [28]. Тем не менее наличие у различных пробиотических культур гипохолестеринемической активности является штамм-специфичной характеристикой [29].

В целом показано, что исследуемые кисломолочные продукты при введении их в рацион не вызывают отклонений в состоянии здоровья и поведении лабораторных животных *spf*-категории.

Заключение

Обобщая результаты всех апробированных комбинаций была разработана биотехнология кисломолочного продукта с заквасочными культурами *L. reuteri* LR1 и ХТС: доза инокулята *L. reuteri* LR1 - 6%, ХТС - 3-4%, температура сквашивания - 37 ± 1 °С, продолжительность сквашивания - 6 ч. Количество клеток ХТС в продукте - не менее 1×10^7 КОЕ/см³ и содержание пробиотического штамма *L. reuteri* LR1 в 1 см³ продукта не ниже 10^6 КОЕ/см³.

Разработанный продукт обладает выраженной антагонистической активностью по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам - *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* ATCC 6538, *Kl. pneumoniae*.

Проведенный комплекс исследований по доклиническому изучению функциональных свойств разработанного кисломолочного продукта свидетельствует о наличии у него нормализующего эффекта на микробиоту и ряд показателей липидного обмена.

При введении в рацион экспериментальных животных разработанного продукта в составе микробиоты кишечника крыс увеличилось содержание бифидо- и лактобактерий, а также энтеробактерий, типичных для нормофлоры крыс, в сыворотке крови снижалась концентрация холестерина и триглицеридов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследования выполнены при частичной (в части оценки функциональных свойств) финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00094).

Литература

1. Shangpliang H.N.J., Sharma S., Rai R., Tamang J.P. Some technological properties of lactic acid bacteria isolated from Dahi and Datshi, naturally fermented milk products of Bhutan // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8. P. 116. doi: 10.3389/fmicb.2017.00116.
2. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligne B. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017. Vol. 44. P. 94-102.
3. Lerche M., Reuter G. Das Vorkommen aerobwachsener grampositiver Stabchen des Genus *Lactobacillus* Beijerinck im Darminhalt erwachsener Menschen (Gleichzeitig ein Beitrag zur genaueren Kenntnis der aeroben Laktobazillen) // *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I Orig.* 1962. Bd 185. S. 446-481.
4. Kandler O., Stetter K.O., Kohl R. *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a new species of heterofermentative lactobacilli // *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. Reihe C.* 1980. Bd 1. S. 264-269.
5. Sanchez B., Delgado S., Blanco-Miguez A., Lourenco A., Gueimonde M., Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease // *Mol. Nutr. Food Res.* 2017. Vol. 61, N 1. Article ID 1600240. doi: 10.1002/mnfr.201600240.
6. Bron P.A., Kleerebezem M., Brummer R.-J., Cani P.D., Mercenier A., MacDonald T.T. et al. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? // *Br. J. Nutr.* 2017. Vol. 117. P. 93-107. doi: 10.1017/S0007114516004037.
7. Bird A.S., Gregory P.J., Jalloh M.A., Cochrane Z.R., Hein D.J. Probiotics for the treatment of infantile colic: a systematic review // *J. Pharm. Pract.* 2017. Vol. 30, N 3. P. 366-374.
8. Rojas M.A., Lozano J.M., Rojas M.X., Rodriguez V.A., Rondon M.A., Bastidas J.A. et al., Prophylactic probiotics to prevent death and nosocomial infection in preterm infants // *Pediatrics.* 2012. Vol. 130, N 5. P. e1113-e1120.
9. Cook D.J., Johnstone J., Marshall J.C., Lauzier F., Thabane L., Mehta S. et al. Probiotics: Prevention of Severe Pneumonia and Endotracheal Colonization Trial - PROSPECT: a pilot trial // *Trials.* 2016. Vol. 17. P. 377. doi: 10.1186/s13063-016-1495-x.
10. Zoumpopoulou G., Pot B., Tsakalidou E., Papadimitriou K. Dairy probiotics: beyond the role of promoting gut and immune health // *Int. Dairy J.* 2017. Vol. 67. P. 46-60.
11. Tonucci L.B., Olbrich dos Santos K.M., de Oliveira L.L., Ribeiro S.M.R., Martino H.S.D. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study // *Clin. Nutr.* 2017. Vol. 36. P. 85-92.
12. Toribio-Mateas M. Harnessing the power of microbiome assessment tools as part of neuroprotective nutrition and lifestyle medicine interventions // *Microorganisms.* 2018. Vol. 6. P. 35. doi: 10.3390/microorganisms6020035.
13. Foster J.A., Rinaman L., Cryan J.F. Stress & the gut-brain axis: regulation by the microbiome // *Neurobiol. Stress.* 2017. Vol. 7. P. 124-136.
14. Szajewska H., Urbanska M., Chmielewska A., Weizman Z., Shamir R. Meta-analysis: *Lactobacillus reuteri* strain DSM 17938 (and the original strain ATCC 55730) for treating acute gastroenteritis in children // *Benef. Microbes.* 2015. Vol. 5, N 3. P. 285-293.

15. Chau K., Lau E., Greenberg S., Jacobson S., Yazdani-Brojeni P., Verma N. et al. Probiotics for infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial investigating *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 // *J. Pediatr.* 2015. Vol. 166, N 1. P. 74-78.
16. Mobini R., Tremaroli V., Stahlman M., Karlsson F., Levin M., Ljungberg M. et al. Metabolic effects of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in people with type 2 diabetes: a randomized controlled trial // *Diabetes Obes. Metab.* 2017. Vol. 19, N 4. P. 579-589.
17. Francavilla R., Polimeno L., Demichina A., Maurogiovanni G., Principi B., Scaccianoce G. et al. *Lactobacillus reuteri* strain combination in *Helicobacter pylori* infection: a randomized, double-blind, placebo-controlled study // *J. Clin. Gastroenterol.* 2014. Vol. 48, N 5. P. 407-413. doi: 10.1097/MCG.0000000000000007.
18. Jadresin O., Hojsak I., Misak Z., Kekez A.J., Trbojevic T., Ivkovic L. et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in the treatment of functional abdominal pain in children: RCT study // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2017. Vol. 64, N 6. P. 925-929. doi: 10.1097/MPG.0000000000001478.
19. Fedorova T.V., Vasina D.V., Begunova A.V., Rozhkova I.V., Ras-koshnaya T.A., Gabrielyan N.I. Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus* spp. against Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. Vol. 54, N 3. P. 277287.
20. Раскошная Т.А., Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Бегунова А.В. Разработка режимов культивирования *L. reuteri* для получения бактериального концентрата клеток // *Техника и технология пищевых производств.* 2016. № 3. С. 56-63.
21. Бегунова А.В., Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Раскошная Т.А. Динамика размножения *L. reuteri* и *L. helveticus* // *Мол. пром-сть.* 2017. № 9. С. 47-48.
22. МУ 2.3.2.2789-10 "Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов".
23. Karlsson M. Evaluation of *Lactobacillus reuteri* DSM17938 as starter in cheese production // NY002 Agricultural Programme - Food Science 270 HEC, Second cycle, A2E. Uppsala : SLU, Dept. of Microbiology, 2013.
24. Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Бегунова А.В., Раскошная Т.А., Ширшова Т.И. Ассоциация пробиотических культур *L. reuteri* и *L. helveticus* для разработки бактериального концентрата // *Мол. пром-сть.* 2017. № 10. С. 60-61.
25. *Clinical Laboratory Parameteres for Rats.* Charles River, 2008. 14 p.
26. *Animal Clinical Chemistry: A Practical Handbook for Toxicologist-sand Biomedical Researchers.* 2nd ed. / ed. G.O. Evans. A. George Owen and Company/CRC Press, UK, 2009. 368 p.
27. Thushara R.M., Gangadaran S., Solati Z., Moghadasian M.H. Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies // *Food Funct.* 2016. Vol. 7. P. 632-642.

28. Singh T.P., Malik R.K., Katkamwar S.G., Kaur G. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus reuteri* LR6 in rats fed on high-cholesterol diet // *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2015. Vol. 66, N 1. P. 71-75.

29. Ishimwe N., Daliri E.B., Lee B.H., Fang F., Du G. The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics // *Mol. Nutr. Food Res.* 2015. Vol. 59. P. 94-105. doi: 10.1002/mnfr.201400548.

References

1. Shangpliang H.N.J., Sharma S., Rai R., Tamang J.P. Some technological properties of lactic acid bacteria isolated from Dahi and Datshi, naturally fermented milk products of Bhutan. *Front Microbiol.* 2017; 8: 116. doi: 10.3389/fmicb.2017.00116.

2. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligne B., et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol.* 2017; 44: 94-102.

3. Lerche M., Reuter G. Das Vorkommen aerobwachsener gram-positiver Stäbchen des Genus *Lactobacillus* Beijerinck im Darminhalt erwachsener Menschen (Gleichzeitig ein Beitrag zur genaueren Kenntnis der aeroben Laktobazillen). *Zentralbl Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hyg. I Orig.* 1962; 185: 446-81.

4. Kandler O., Stetter K.O., Kohl R. *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a new species of heterofermentative lactobacilli. *Zentralbl Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hyg. Abt. I Orig. Reihe C.* 1980; 1: 264-9.

5. Sanchez B., Delgado S., Blanco-Miguez A., Lourenco A., Gueimonde M., Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res.* 2017; 61 (1): 1600240. doi: 10.1002/mnfr.201600240.

6. Bron P.A., Kleerebezem M., Brummer R.-J., Cani P.D., Mercenier A., MacDonald T.T., et al. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br J Nutr.* 2017; 117: 93-107. doi: 10.1017/S0007114516004037.

7. Bird A.S., Gregory P.J., Jalloh M.A., Cochrane Z.R., Hein D.J. Probiotics for the treatment of infantile colic: a systematic review. *J Pharm Pract.* 2017; 30 (3): 366-74.

8. Rojas M.A., Lozano J.M., Rojas M.X., Rodriguez V.A., Rondon M.A., Bastidas J.A., et al., Prophylactic probiotics to prevent death and nosocomial infection in preterm infants. *Pediatrics.* 2012; 130 (5): e1113-20.

9. Cook D.J., Johnstone J., Marshall J.C., Lauzier F., Thabane L., Mehta S., et al. Probiotics: Prevention of Severe Pneumonia and Endotracheal Colonization Trial - PROSPECT: a pilot trial. *Trials.* 2016; 17: 377. doi: 10.1186/s13063-016-1495-x.

10. Zoumpopoulou G., Pot B., Tsakalidou E., Papadimitriou K. Dairy probiotics: beyond the role of promoting gut and immune health. *Int Dairy J.* 2017; 67: 46-60.

11. Tonucci L.B., Olbrich dos Santos K.M., de Oliveira L.L., Ribeiro S.M.R., Martino H.S.D. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Nutr.* 2017; 36: 85-92.

12. Toribio-Mateas M. Harnessing the power of microbiome assessment tools as part of neuroprotective nutrition and lifestyle medicine interventions. *Microorganisms*. 2018; 6: 35. doi: 10.3390/microorganisms6020035.
13. Foster J.A., Rinaman L., Cryan J.F. Stress & the gut-brain axis: regulation by the microbiome. *Neurobiol Stress*. 2017; 7: 124-36.
14. Szajewska H., Urbanska M., Chmielewska A., Weizman Z., Shamir R. Meta-analysis: *Lactobacillus reuteri* strain DSM 17938 (and the original strain ATCC 55730) for treating acute gastroenteritis in children. *Benef Microbes*. 2015; 5 (3): 285-93.
15. Chau K., Lau E., Greenberg S., Jacobson S., Yazdani-Brojeni P., Verma N., et al. Probiotics for infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial investigating *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *J Pediatr*. 2015; 166 (1): 74-8.
16. Mobini R., Tremaroli V., Stahlman M., Karlsson F., Levin M., Ljungberg M., et al. Metabolic effects of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in people with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab*. 2017; 19 (4): 579-89.
17. Francavilla R., Polimeno L., Demichina A., Maurogiovanni G., Principi B., Scaccianoce G., et al. *Lactobacillus reuteri* strain combination in *Helicobacter pylori* infection: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Gastroenterol*. 2014; 48 (5): 407-13. doi: 10.1097/MCG.0000000000000007.
18. Jadresin O., Hojsak I., Misak Z., Kekez A.J., Trbojevic T., Ivkovic L., et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in the treatment of functional abdominal pain in children: RCT study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017; 64 (6): 925-9. doi: 10.1097/MPG.0000000000001478.
19. Fedorova T.V., Vasina D.V., Begunova A.V., Rozhkova I.V., Raskoshnaya T.A., Gabrielyan N.I. Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus* spp. against Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Microbiol*. 2018; 54 (3): 277-87.
20. Raskoshnaya T.A., Semenikhina V.F., Rozhkova I.V., Begunova A.V. The development of growth medium and *Lactobacillus reuteri* cultivation regimes for bacterial concentrate. *Tekhnika i tekhnologiya pischevykh proizvodstv [Technique and Technology of Food Production]*. 2016; 42 (3): 56-62. (in Russian)
21. Begunova A.V., Semenikhina V.F., Rozhkova I.V., Raskoshnaya T.A. Dynamics of *L. reuteri* and *L. helveticus* generation. *Molochnaya promyshlennost' [Dairy Industry]*. 2017; (9): 47-8. (in Russian).
22. MI 2.3.2.2789-10 "Methodological instructions on sanitary-epidemiological evaluation of safety and functional potential of probiotic microorganisms used for food products manufacture".
23. Karlsson M. Evaluation of *Lactobacillus reuteri* DSM17938 as starter in cheese production. In: NY002 Agricultural Programme - Food Science 270 HEC, Second cycle, A2E. Uppsala: SLU, Dept. of Microbiology, 2013.
24. Semenikhina V.F., Rozhkova I.V., Begunova A.V., Raskoshnaya T.A., Shirshova T.I. Association of probiotic *L. reuteri* and *L. helveticus* cultures for bacterial concentrate development. *Molochnaya pro-myshlennost' [Dairy Industry]*. 2017; (10): 60-1. (in Russian)

25. Clinical Laboratory Parameteres for Rats. Charles River, 2008: 14 p.
26. Animal Clinical Chemistry: A Practical Handbook for Toxicologistsand Biomedical Researchers. 2nd ed. In: G.O. Evans (ed.). A. George Owen and Company/CRC Press, UK, 2009: 368 p.
27. Thushara R.M., Gangadaran S., Solati Z., Moghadasian M.H. Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. *Food Funct.* 2016; 7: 632-42.
28. Singh T.P., Malik R.K., Katkamwar S.G., Kaur G. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus reuteri* LR6 in rats fed on high-cholesterol diet. *Int J Food Sci Nutr.* 2015; 66 (1): 71-5.
29. Ishimwe N., Daliri E.B., Lee B.H., Fang F., Du G. The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. *Mol Nutr Food Res.* 2015; 59: 94-105. doi: 10.1002/mnfr.201400548.