УДК 637.14

РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И РЕЖИМОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *LACTOBACILLUS REUTERI* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНЦЕНТРАТА

Т.А. Раскошная, В.Ф. Семенихина*, И.В. Рожкова, А.В. Бегунова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35

**e-mail: microbs@yandex.ru*

Дата поступления в редакцию: 09.06.2016
Дата принятия в печать: 10.08.2016

Lactobacillus reuteri был выделен во ВНИМИ. Данный вид лактобактерий обладает широким спектром функциональных свойств, поэтому разработка бактериального концентрата *L. reuteri* является актуальной и востребованной. Цель исследований заключалась в выборе ферментного препарата, позволяющего получить гидролизаты белков из обезжиренного молока и сыворотки как основы для создания питательной среды, а также в изучении влияния некоторых факторов (дозы протеолитического фермента, продолжительности гидролиза), в проведении оптимизации питательной среды различными компонентами и подборе технологических режимов (температуры, pH среды, дозы инокулята) культивирования *L. reuteri*. Для исследований были выбраны 4 протеолитических фермента (протосубтилин, Alcalase, Neutrase, Protamex) в концентрации 0,4 и 3 %. Продолжительность процесса гидролиза 1,5 и 3 ч, температура процесса 55 °С, активная кислотность 7,2 ед. pH. С целью оптимизации состава питательной среды проведены исследования по влиянию отдельных компонентов (гидролизат, дрожжевой экстракт, сахароза, цистеин, инулин) на ее питательную ценность. Исследовано влияние технологических режимов культивирования *L. reuteri* (активная кислотность 5,6–6,6 ед. pH, температура культивирования 32–41 °С, доза инокулята от 3 до 8 %) на накопление клеток в среде. Анализ полученных данных показал, что при культивировании на гидролизате, полученном на обезжиренном молоке, количество клеток было выше, чем на гидролизате, полученном на сыворотке. При исследовании влияния вида и дозы вносимого фермента установлено, что исследованные ферменты обладали практически одинаковым воздействием на накопление клеток *L. reuteri*, при повышении дозы фермента интенсивность развития клеток возрастала. Установлен оптимальный состав питательной среды для культивирования *L. reuteri*: гидролизат 96,75 %, дрожжевой экстракт 3 % и инулин 0,25 %. Установлены оптимальные технологические режимы культивирования *L. reuteri*: температура 37 °С, активная кислотность 6,2 ед. pH, доза инокулята 6–7 %, продолжительность культивирования 6–8 ч. При этих параметрах количество клеток составило 2×10^9 КОЕ/см^3.

Пробиотический штамм, *Lactobacillus reuteri,* ферменты, Alcalase, Neutrase, Protamex, протосубтилин, культивирование, бактериальный концентрат

Введение

В последние годы наблюдается большой интерес к кисломолочным продуктам, содержащим микроорганизмы – пробиотики (бифидобактерии, ацидофильные молочнокислые палочки, *L. rhamnosus, L. casei*, пропионовокислые бактерии и др.), которые являются представителями нормальной кишечной микрофлоры человека. В настоящее время большое внимание уделяется изучению свойств пробиотического микроорганизма *Lactobacillus reuteri.* Исследования последних десятилетий выявили способность молочнокислых бактерий образовывать антимикробные вещества различной природы, которые могут стать альтернативой существующим антибиотикам и консервантам. Наиболее изученной из них является группа антибактериальных пептидов – бактериоцинов, разнообразных по уровню активности, спектру и механизму действия [1]. Бактериоцины легко расщепляются ферментами пищеварительного тракта, и поэтому они могут заменить традиционные химические [2, 3, 4].

Lactobacillus reuteri обитает в кишечнике человека и животных, продуцирует бактериоцин реутерин, который ингибирует кишечные патогены и стимулирует иммунную систему человека. *Lactobacillus reuteri* облигатная гетероферментативная молочнокислая палочка, микроаэрофил. *Lactobacillus reuteri* продуцируют большое количество глюканов и фруктанов и других экзополисахаридов, которые рассматриваются как пребиотики.

Так как данный вид лактобактерий обладает широким спектром функциональных свойств, разработка импортозамещающей биотехнологии бактериального концентрата *Lactobacillus reuteri*, предназначенного для производства продуктов и препаратов с пробиотическими свойствами, на сегодняшний день является актуальной и востребованной.

Процесс получения бактериального концентрата включает в себя наращивание клеток молочнокислых бактерий в питательной среде и их отделение центрифугированием. При этом необходимо накопить в среде максимально возможное количество активных клеток. В качестве азотистой основы для питательных сред широко используются гидролизаты белков молока. Степень гидролиза белковых субстратов и пептидный состав гидролизата зависят от многих факторов, таких как: вид и специ-

фичность фермента, концентрация фермента и продолжительность ферментации, pH и температура ферментации и т.д.

Целью настоящих исследований является выбор наиболее эффективного ферментного препарата, позволяющего получить гидролизаты белков из обезжиренного молока и сыворотки как основы для создания питательной среды, а также изучить влияние некоторых факторов (доза протеолитического фермента, продолжительность гидролиза), провести оптимизацию питательной среды различными компонентами и подобрать технологические режимы (температура, pH среды, доза инокулята клеток) культивирования *L. reuteri* для разработки бактериального концентрата.

Объекты и методы исследований

Объектом исследования является штамм *Lactobacillus reuteri*, выделенный в 2014 году в Центральной лаборатории микробиологии ФГБНУ «ВНИМИ».

Штамм *Lactobacillus reuteri* хранили в замороженном состоянии при температуре минус 80 °С в растворе, содержащем 6 % обезжиренного сухого молока и 10 % глицерина. Для восстановления культуры использовали среду MRS, температуру культивирования 37 °С и анаэробные условия.

Для исследований были выбраны 4 протеолитических фермента (протосубтилин, Alcalase, Neutrase, Protamex).

Работы по подбору питательной среды для культивирования *L. reuteri* проводили поэтапно: на первом – осуществляли гидролиз обезжиренного молока и сыворотки. Исходя из литературных источников и предшествующих исследований [5, 6, 7] для эксперимента были выбраны две концентрации ферментов: 0,4 и 3 %, продолжительность гидролиза составила 1,5 и 3 ч. Согласно рекомендациям производителей температура и активная кислотность процесса составляли 55 °С и 7,2 ед. pH соответственно. Полученные гидролизаты были исследованы как питательные среды для накопления максимального количества клеток *L. reuteri*. Процесс культивирования проводили при температуре 37 °С в течение 16–17 ч, доза инокулята составляла 5 %. После 17 ч культивирования определяли количество клеток (чашечным методом на среде MRS в анаэробных условиях).

При разработке состава питательной среды для наращивания биомассы *L. reuteri* использовались следующие компоненты: гидролизованное молоко, дрожжевой экстракт, инулин, сахароза и цистеин. Все полученные данные обрабатывались в программе Statistica 6.1 [8, 9].

Известно, что оптимальная температура роста и pH питательной среды для молочнокислых палочек составляет 37–41 °С и pH = 5,4–6,4 ед. pH, тогда как из литературных источников, посвященных различным исследованиям с *Lactobacillus reuteri*, авторы используют следующие значения температур и активной кислотности для культивирования микроорганизма: 38 °С и pH – 6,2 ед. pH, 37 °С и pH – 6,5 ед. pH, pH – 6,0–6,8 ед. pH, pH – 5,8 ед. pH и 37 °С [10]. Исходя из вышеизложенного в работе по подбору режимов культивирования микроорганизма *Lactobacillus reuteri* был взят следующий интервал значений активной кислотности pH: 5,6; 5,8; 6,0; 6,2; 6,4; 6,6 ед. pH и температуры 32, 35, 37, 39, 41 °С. Культивирование *Lactobacillus reuteri* проводили в ферментерах фирмы Das Gip (Германия) на 400 мл, а затем в ферментере Prelude фирмы Biolafitt на 5 л (Франция) при постоянных значениях активной кислотности или температурах и непрерывном раскислении водным раствором NaOH с массовой долей 30 %. Инокулят готовили на среде MRS и вносили в количестве 5 % во всех опытах.

Через каждые 2 ч культивирования проводили отбор проб и определяли количество клеток *Lactobacillus reuteri*.

Количество клеток *Lactobacillus reuteri* определяли методом предельных разведений в среде ГМК-1 в анаэробных условиях и термостатировании в течение 3–5 дней при температуре 37 °С в соответствии с Методическими рекомендациями по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях цельномолочной и молочно-консервной промышленности [11].

Результаты и их обсуждение

Математическая обработка данных экспериментов по влиянию вида ферментов и режимов гидролиза показала, что такие факторы, как «вид среды», «вид фермента» и «доза фермента», оказывали значимый эффект на развитие клеток *L. reuteri.* Было установлено, что наибольшее количество клеток было получено на гидролизате, приготовленном на обезжиренном молоке – $8{,}8\times10^7$ КОЕ/см^3, тогда как на гидролизованной сыворотке – $9{,}1\times10^6$ КОЕ/см^3. На рис. 1 представлены данные по влиянию вида фермента на накопление клеток *L. reuteri*.

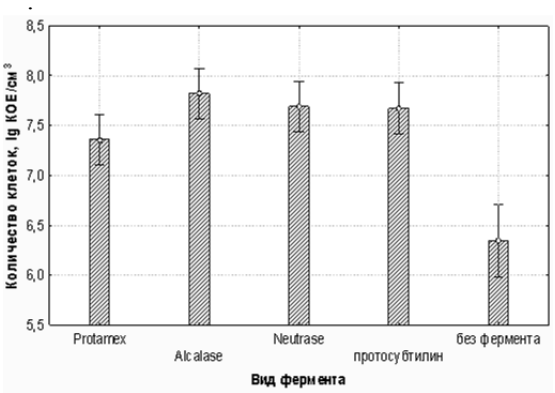

Рис. 1. Влияние вида фермента на накопление клеток *L. reuteri* в гидролизованном обезжиренном молоке

Так, на гидролизате, полученном с использованием фермента Alcalase при культивировании в течение 16–17 ч, количество клеток составило $6{,}6\times10^7$ КОЕ/см^3, тогда как для фермента Neutrase оно составляло $4{,}9\times10^7$ КОЕ/см^3 и протосубтилина – $4{,}7\times10^7$ КОЕ/см^3, Protamex – $2{,}5\times10^7$ КОЕ/см^3.

Исследования показали, что при повышении дозы фермента с 0,4 до 3 % интенсивность развития клеток возрастала. Также определено, что продолжительность гидролиза среды от 1,5 до 3 ч различными ферментами не влияла на питательную ценность получаемых сред, не давая различий в количестве клеток *L. reuteri*. Таким образом, на основании полученных данных в дальнейших исследованиях для получения гидролизованного обезжиренного молока был выбран протеолитический фермент Alcalase с дозой внесения 3 %.

С целью оптимизации состава питательной среды был разработан 5-факторный центральный композиционный план со следующим диапазоном варьирования ингредиентов: гидролизованное молоко 30–100 %, дрожжевой экстракт 0–5 %, сахароза 0–5 %, инулин 0–1 г/дм^3. Проведенные исследования показали, что добавление сахарозы угнетает рост клеток *L. reuteri*. На рис. 2 и 3 представлены поверхности отклика влияния содержания сахарозы (без добавления и при 5 %) на количество клеток в питательной среде.

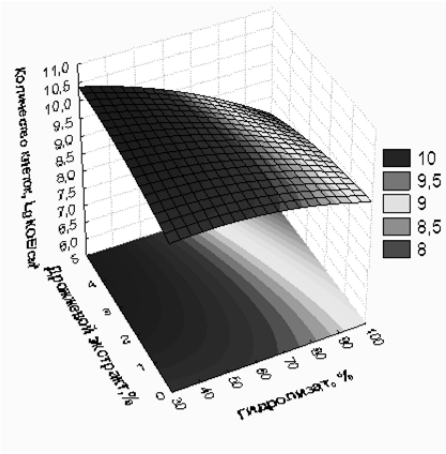

Рис. 2. Зависимость количества клеток *L. reuteri* от концентрации компонентов в среде при «Сахароза» – 0 %

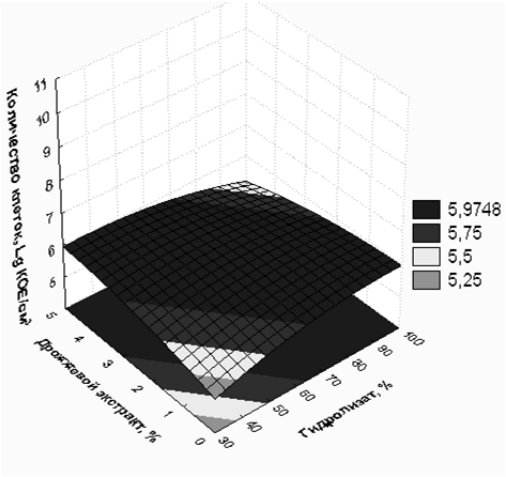

Рис. 3. Зависимость количества клеток *L. reuteri* от концентрации компонентов в среде при «Сахароза» – 5 %

Проведенные исследования показали, что наибольшее накопление клеток *L. reuteri* было получено на питательной среде без добавления сахарозы.

На развитие и рост клеток в процессе культивирования влияло взаимодействие факторов «Гидролизат – Инулин» и «Дрожжевой экстракт – Цистеин». Было установлено, что с увеличением содержания инулина в составе питательной среды количество клеток возрастало. Тогда как ингредиенты дрожжевой экстракт и цистеин в составе питательной среды могут быть взаимозаменяемы (рис. 4 и 5).

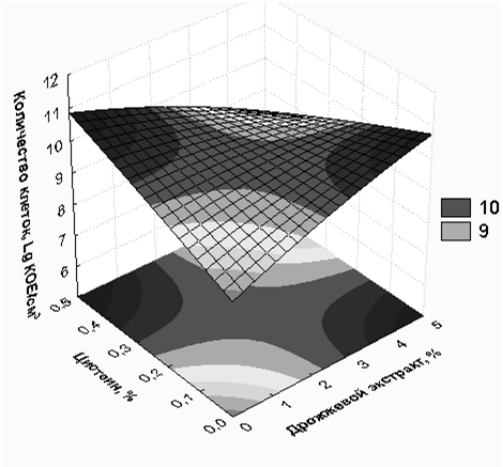

Рис. 4. Зависимость количества клеток *L. reuteri* от концентрации цистеина и дрожжевого экстракта в среде

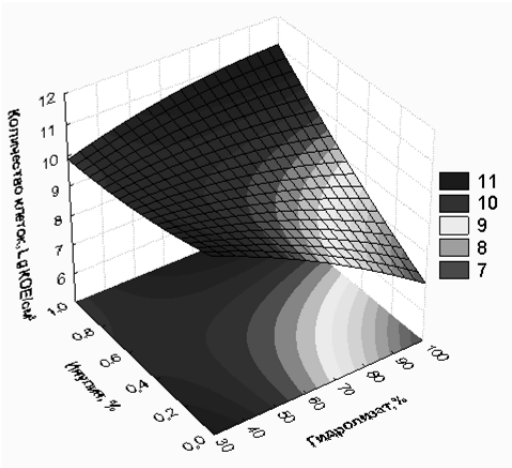

Рис. 5. Зависимость количества клеток *L. reuteri* от концентрации инулина и гидролизата в питательной среде

Таким образом, было установлено, что добавление инулина, дрожжевого экстракта или цистеина в гидролизованное молоко стимулирует развитие *L. reuteri,* тогда как сахароза подавляет. Поэтому в дальнейших исследованиях была проведена оптимизация состава питательной среды из следующих компонентов: гидролизованное молоко, инулин, дрожжевой экстракт или цистеин. Было исследовано влияние количества вносимого дрожжевого экс-

тракта от 0 до 5 %, инулина от 0 до 1 % и гидролизованного молока от 30 до 100 %.

Наибольшее количество клеток *Lactobacillus reuteri* было получено с использованием разработанного состава питательной среды, содержащей гидролизованное ферментом Alcalase молоко – 96,75 %, дрожжевой экстракт – 3 %, инулин – 0,25 %.

Проведены исследования по влиянию размножения *Lactobacillus reuteri* при культивировании при различных значениях активной кислотности (5,8; 6,0; 6,2 ед. pH) и температурах (32; 35; 37; 39; 41 °C). Доза вносимого инокулята составляла 5 %.

На рис. 6 представлены данные по изменению роста *L. reuteri* при поддержании активной кислотности среды на уровне 5,8 ед. pH при различных температурах культивирования: 32, 35, 37, 39 и 41 °C. Анализ представленных данных показывает, что наибольшее содержание клеток было получено при культивировании при температуре 35, 37 °C и достигало $1{,}4\times10^9$ КОЕ/см^3 и $1{,}5\times10^9$ КОЕ/см^3 соответственно.

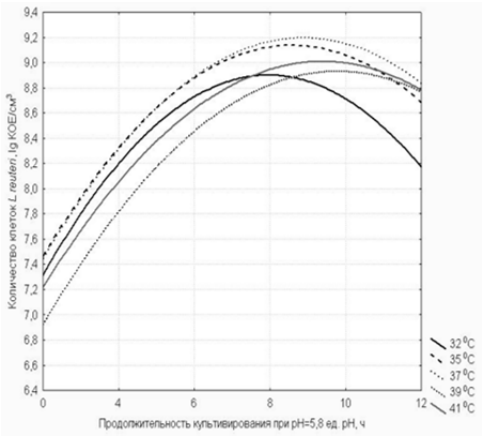

Рис. 6. Изменение содержания клеток *L. reuteri* в процессе культивирования при различных температурах при pH = 5,8 ед. pH

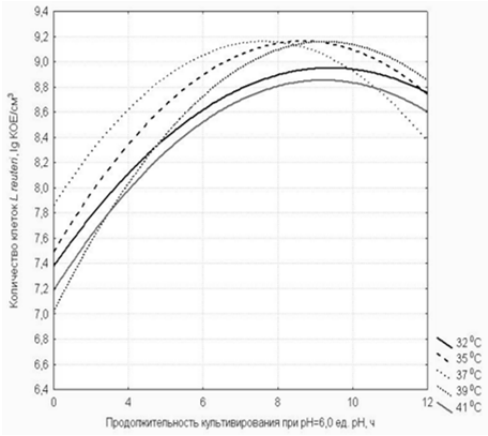

Рис. 7. Изменение содержания клеток *L. reuteri* в процессе культивирования при различных температурах при pH = 6,0 ед. pH

На рис. 7 представлены данные по изменению роста *L. reuteri* при поддержании активной кислотности среды на уровне 6,0 ед. pH при различных температурах культивирования: 32, 35, 37, 39 и 41 °C.

Наибольшее количество клеток ($1{,}6\times10^9$ и $2{,}4\times10^9$ КОЕ/см^3) было отмечено при культивировании при температуре 35 и 37 °C.

На рис. 8 представлены данные по изменению роста *L. reuteri* при поддержании активной кислотности среды на уровне 6,2 ед. pH при различных температурах культивирования: 32, 35, 37, 39 и 41 °C.

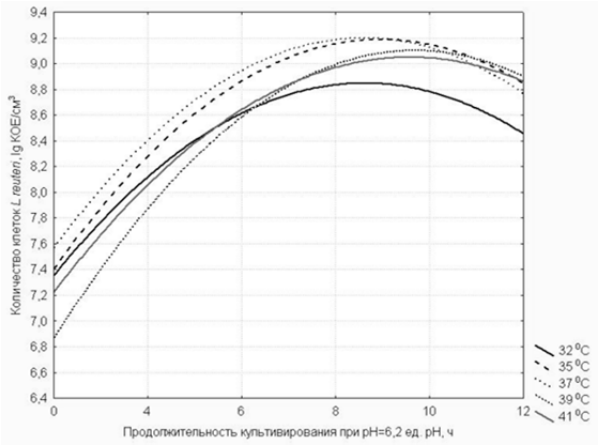

Рис. 8. Изменение содержания клеток *L. reuteri* в процессе культивирования при различных температурах при pH = 6,2 ед. pH

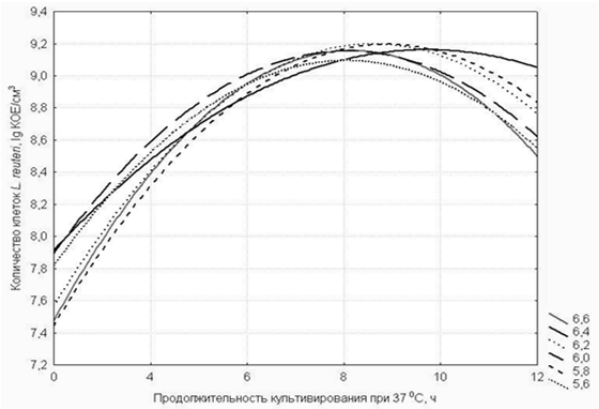

Рис. 9. Изменение содержания клеток при культивировании при различных значениях активной кислотности

Исходя из данных, представленных на рис. 8, видно, что при температуре 35, 37 °C и активной кислотности pH = 6,2 ед. pH также отмечалось высокое количество клеток в культуральной среде.

Как видно из рис. 9, интенсивное накопление клеток происходило в течение 8–10 ч (при внесении 5 % инокулята) и разница в количестве клеток в стационарной фазе роста при культивировании при разных значениях активной кислотности была невелика, варьировалась в интервале $7{,}5\times10^8$–$1{,}75\times10^9$ КОЕ/см^3. Однако наибольшее количество клеток было достигнуто при культивировании при более низких значениях активной кислотности в интервале pH от 5,8 до 6,2 ед. pH. Так, при актив-

ной кислотности среды 5,8 ед. pH наибольшее количество клеток составило $1,5\times10^9$ КОЕ/см^3, при 6,0 ед. pH – $1,75\times10^9$ КОЕ/см^3 и при 6,2 ед. pH – $1,4\times10^9$ КОЕ/см^3.

По полученным данным было установлено, что наибольшее содержание клеток *L. reuteri* было достигнуто при температуре 37 °С и активной кислотности 6,2 ед. pH. Следует отметить, что максимум концентрации живых клеток в питательной среде наблюдался через 8–10 ч культивирования *L. reuteri.*

При исследовании динамики размножения *Lactobacillus reuteri* в зависимости от дозы вносимого инокулята и различной продолжительности культивирования использовали активную кислотность 6,2 ед. pH и температуру культивирования 37 °С. В ходе исследований доза инокулята составляла 3, 4, 5, 6, 7 и 8 %.

Анализ полученных данных показал, что интенсивность размножения *Lactobacillus reuteri* зависит от количества внесенного инокулята. Максимальное количество клеток *Lactobacillus reuteri* отмечалось через 6–8 ч культивирования при внесении 6–7 % инокулята и составило 2×10^9 КОЕ/см^3.

В ходе исследований также определяли количество клеток *Lactobacillus reuteri* в биомассе, полученной после культивирования при внесении различных доз инокулята, после ее отделения на суперцентрифуге. Наибольшее количество клеток *Lactobacillus reuteri* накапливалось при получении биомассы после отделения клеток на суперцентрифуге при внесении 6 % инокулята и составило 10^{11} КОЕ/см^3.

Выводы

1. Наибольшее количество клеток было получено при культивировании *L. reuteri* в питательной среде с гидролизованным молоком при использовании протеолитического фермента Alcalase в количестве 3 % от содержания белка в среде.

Оптимальный состав питательной среды состоял из 96,75 % гидролизованного молока, 3 % дрожжевого экстракта, 0,25 % инулина и обеспечивал интенсивное развитие и накопление клеток *Lactobacillus reuteri*.

2. При исследовании влияния активной кислотности среды и температуры культивирования *L. reuteri* на накопление клеток было установлено, что оптимальной температурой культивирования является температура 37 °С и активная кислотность 6,2 ед. pH. Количество клеток при данных параметрах составляло $1,4\times10^9$ КОЕ/см^3.

3. При исследовании влияния дозы вносимого инокулята на интенсивность размножения *L. reuteri* установлено, что максимальное количество клеток *L. reuteri* отмечалось через 6–8 ч культивирования при внесении 6–7 % инокулята (2×10^9 КОЕ/см^3).

4. Установлено, что наибольшее количество клеток *Lactobacillus reuteri* накапливалось при получении биомассы после отделения клеток на суперцентрифуге при внесении 6 % инокулята и составило 10^{11} КОЕ/см^3.

Список литературы

1. Стоянова, Л.Г. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор) / Л.Г. Стоянова, Е.А. Устюгова, А.Н. Нетрусов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – № 3. – С. 644–650.

2. Изучение антибиотического комплекса, образуемого Lactococcus lactis subsp. Lactis 194 вариант – К / Е.А. Устюгова [и др.] // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – № 5. – С. 644–685.

3. Elizete de F.R. Pancheniak. Molecular characterization and biomass and metabolite production of Lactobacillus reuteri LPB P01-001: A potential probiotic/ Elizete de F.R. Pancheniak, Maike T. Maziero, Jose A. Rodriguez-Leon, Jose L. Parada, Michele R. Spier, Carlos R. Soccol// Brazilian Journal of Microbiology. – 2012. –P. 135–147.

4. Filipe Santos. Effect of amino acid availability on vitamin B_{12} production in Lactobacillus reuteri/ Filipe Santos, Bas Teusink, Douwe Molenaar, Maurice van Heck, Michiel Wels, Sander Sieuwerts, Willem M. de Vos, Jeroen Hugenholtz// Applied and environmental microbiology. – V. 75. – N 12. – 2009. – P. 3930-3936.

5. Закономерности гидролиза сывороточных белков экзо- и эндопротеазами / Т.Н. Головач, Н.В. Гавриленко, Н.К. Жабанос, В.П. Курченко // Труды БГУ. – 2008. – Т. 3. – Ч. 1. – С. 1–15.

6. Головач, Т.Н. Культивирование молочнокислых бактерий в питательных средах на основе гидролизатов белков молока / Т.Н. Головач // Труды БГУ. – 2010. – Т. 5. – Ч. 1. – С. 118–126.

7. Головач, Т.Н. Гидролиз белков молока ферментными препаратами и протеолитическими системами молочнокислых бактерий // Труды БГУ. – 2012. – Т. 7. – Ч. 1. – С. 106–120.

8. Magdalena Polak-Berecka, Adam Wasko, Monicka korolowska-Wiater, Marcin Podlesny, Zdzislaw Targonski, Agnieszka Kubik-Komar. Optimization of Medium composition for enhancing growth of lactobacillus rhamnosus PEN using persponse surface methodology// Polish Journal of Microbiology, Vol.59, № 2, 2010, P. 113–118.

9. Конструирование питательной среды для культивирования пробиотического микроорганизма Lactobacillus reuteri / Т.А. Раскошная, В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, А.В. Бегунова // Молочная промышленность. – 2015. – № 4. – С. 26–27.

10. Смирнов, Е.А. Совершенствование научных и разработка практических аспектов биотехнологии моновидовых бактериальных концентратов молочнокислых микроорганизмов для сыроделия: автореф. дис. ... канд. техн. наук / Е.А. Смирнов. – Вологда, 2011.

11. Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях цельномолочной и молочно-консервной промышленности / Регистрационное свидетельство № 12253 от 26.02.2009. – М., 2009.

DEVELOPMENT OF NUTRIENT MEDIUM AND CULTIVATION REGIMES OF *LACTOBACILLUS REUTERI* FOR BACTERIAL CONCENTRATE PRODUCTION

T.A. Raskoshnaya, V.F. Semenikhina*, I.V. Rozhkova, A.V. Begunova

All-Russia Dairy Research Institute,
35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia

**e-mail: lena_short@mail.ru*

Received: 09.06.2016
Accepted: 10.08.2016

Lactobacillus reuteri has been selected in the All-Russia Dairy Research Institute. The mentioned type of lactic acid bacteria possesses a wide spectrum of functional properties thus the development of *L.reuteri* bacterial concentrate is actual and demanded. The aim of the present investigations is to choose ferment preparation which makes it possible to obtain protein hydrolysates from skimmed milk and whey as the basis for the creation of nutrient medium, to study the impact of some factors (proteolytic ferment dose, hydrolyze duration), to carry out optimization of nutrient medium by different components, and to select the technological regimes (temperature, medium pH, inoculate dose) of *L.reuteri* cultivation. Four proteolytic ferments (protosubtilin, Alcalase, Neutrase, Protamex) were chosen in the concentration of 0.4% and 3.0%. The hydrolyze process duration was 1.5 and 3 h, the process temperature was 55°C, the active acidity was 7.2 pH units. Investigations on optimization of nutrient medium composition relating to separate components influence (hydrolysate, yeast extract, sucrose, cystein, inulin) on its nutritional value have been conducted. The influence of technological regimes of *L.reuteri* cultivation (active acidity 5.6–6,6 pH units, cultivation temperature (32–41)°C, inoculate dose from 3% to 8%) on cells accumulation in the medium has been studied. The analyses of the findings showed that the number of cells cultivated on hydrolysate obtained from skimmed milk was higher than that cultivated on hydrolysate obtained from whey. The investigation on the introduced ferment type and dose impact showed that the studied ferments possessed practically similar influence on *L.reuteri* cells accumulation. The intensity of cells growth became higher with the ferment dose increasing. The optimum nutrient medium composition for *L.reuteri* cultivation has been determined: hydrolysate – 96.75%, yeast extract - 3% and inulin – 0.25%. The optimum technological regimes for *L.reuteri* cultivation have been also defined: temperature - 37°C, active acidity - 6.2 pH units, inoculate dose - 6–7%, cultivation period - 6–8 hrs. In this case, the number of cells amounted to 2 x 10^9 CFU/cm^3.

Probiotic strains, *Lactobacillus reuteri*, ferments, Alcalase, Neutrase, Protamez, protosubtilin, cultivation, bacterial concentrate

References

1. Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Netrusov A.N. Antimikrobnye metabolity molochnokislykh bakteriy: raznoobrazie i svoystva (obzor) [Antibicrobial metabolites of lactic acid bacteria: diversity and characteristics (review)]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Appl. Biochem. Microbiol.], 2012, vol. 48, no. 3, pp. 644–650.

2. Ustyugova E.A., Fedorova G.B., Katrucha G.S., Stoyanova L.G. Izuchenie antibioticheskogo kompleksa, obrazuemogo *Lactococcus lactis subsp*. Lactis 194 variant – K [Investigation of antibiotic complex formed by *Lactococcus lactis subsp*. Lactis 194 variants – K]. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. 2011, vol. 80, no. 5, pp. 644–485.

3. Elizete de F.R. Pancheniak, Maike T. Maziero, Jose A. Rodriguez-Leon, Jose L. Parada, Michele R. Spier, Carlos R. Soccol Pancheniak. Molecular characterization and biomass and metabolite production of Lactobacillus reuteri LPB P01-001: A potential probiotic. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, pp. 135–147

4. Filipe Santos, Bas Teusink, Douwe Molenaar, Maurice van Heck, Michiel Wels, Sander Sieuwerts, Willem M. de Vos, Jeroen Hugenholtz. Effect of amino acid availability on vitamin B_{12} production in Lactobacillus reuteri. *Applied and environmental microbiology*, 2009, vol. 75, no. 12, pp. 3930–3936.

5. Golovach T.N., Gavrilenko N.V., Zhabanos N.K., Kurchenko V.P. Zakonomernosti gidroliza syvorotochnykh belkov ekzo- i endoproteazami [The mechanism of whey proteins htdrolyze by exo-and endoproteinases]. *Trudy Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta* [Proceedings of the Belarusian State University], 2008, vol. 3, part 1, pp. 1–15.

6. Golovach T.N. Kul'tivirovanie molochnokislykh bakteriy v pitatel'nykh sredakh na osnove gidrolizatov belkov moloka [Cultivation of lactic acid bacteria in nutritive media of the basis of milk proteins hydrolyzates]. *Trudy Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta* [Proceedings of the Belarusian State University], 2010, vol. 5. part 1, pp. 118–126.

7. Golovach T.N. Gidroliz belkov moloka fermentnymi preparatami i proteoliticheskimi sistemami molochnokislykh bakteriy [Milk proteins hydrolyze by enzyme preparations and proteolytic systems of lactic acid bacteria]. *Trudy Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta* [Proceedings of the Belarusian State University], 2012, vol. 7, part 1, pp. 106–120.

8. Magdalena Polak-Berecka, Adam Wasko, Monicka korolowska-Wiater, Marcin Podlesny, Zdzislaw Targonski, Agnieszka Kubik-Komar. Optimization of Medium composition for enhancing growth of lactobacillus rhamnosus PEN using persponse surface methodology. *Polish Journal of Microbiology*, 2010, vol. 59, no. 2, pp. 113–118.

9. Raskoshnaya T.A., Semenikhina V.F., Rozhkova I.V., Begunova A.V. Konstruirovanie pitatel'noy sredy dlya kul'tivirovaniya probioticheskogo mikroorganizma *Lactobacillus reuteri* [Engineering of Growth Medium for Probiotic *Lactobacillus reuteri* Cultivation]. *Molochnaya promyshlennost'* [Dairy Industry], 2015, no. 4, pp. 26–27.

10. Smirnov E.A. *Sovershenstvovanie nauchnykh i razrabotka prakticheskikh aspektov biotekhnologii monovidovykh bakterial'nykh kontsentratov molochnokislykh mikroorganizmov dlya syrodeliya. Avtoref. diss. кand. tekhn. nauk* [Improvement of scientific and development of practical aspects of mono views bacterial concentrates biotechnology of lactic acid bacteria for cheese making. Cand. eng. sci. thesis]. Vologda, 2011. 36 p.

11. *Metodicheskie rekomendatsii po organizatsii proizvodstvennogo mikrobiologicheskogo kontrolya na predpriyatiyakh tsel'nomolochnoy i molochno-konservnoy promyshlennosti, № 12253 ot 26.02.2009* [Guidelines for organization of the control at whole and canned milk plants, no. 12253, 26.02.2009]. Moscow, 2009.

Дополнительная информация / Additional Information

Разработка питательной среды и режимов культивирования *Lactobacillus reuteri* для получения бактериального концентрата / Т.А. Раскошная, В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, А.В. Бегунова // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 42. – № 3. – С. 56–62.

Raskoshnaya T.A., Semenikhina V.F., Rozhkova I.V., Begunova A.V. Development of nutrient medium and cultivation regimes of Lactobacillus reuteri for bacterial concentrate production. *Food Processing: Techniques and Technology,* 2016, vol. 42, no. 3, pp. 56–62. (in Russ.).

Раскошная Татьяна Александровна
канд. техн. наук, старший научный сотрудник Центральной лаборатории микробиологии, ФГБНУ ВНИМИ (Федеральное государственное бюджетное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности), 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, корп. 7, тел.: +7 (499) 236-72-16, e-mail: microbs@yandex.ru

Семенихина Вера Филатовна
д-р техн. наук, профессор, главный научный сотрудник Центральной лаборатории микробиологии, ФГБНУ ВНИМИ (Федеральное государственное бюджетное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности), 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, корп. 7,
тел.: +7 (499) 236-72-16, e-mail: microbs@yandex.ru

Рожкова Ирина Владимировна
канд. техн. наук, заведующая Центральной лабораторией микробиологии, ФГБНУ ВНИМИ (Федеральное государственное бюджетное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности), 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, корп. 7, тел.: +7 (499) 236-72-16,
e-mail: microbs@yandex.ru

Бегунова Анна Васильевна
научный сотрудник Центральной лаборатории микробиологии, ФГБНУ ВНИМИ (Федеральное государственное бюджетное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности), 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, корп. 7, тел.: +7 (499) 236-72-16,
e-mail: microbs@yandex.ru

Tatyana A. Raskoshnaya
Cand.Sci.(Eng.), Senior Researcher of the Central Laboratory of Microbiology, All-Russia Dairy Research Institute, Bld. 7, 35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia, phone: +7 (499) 236-72-16., e-mail: microbs@yandex.ru

Vera F. Semenikhina
Dr.Sci.(Eng.), Professor, Chief Researcher of the Central Laboratory of Microbiology, All-Russia Dairy Research Institute, Bld. 7., 35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia, phone: +7 (499) 236-72-16., e-mail: microbs@yandex.ru

Irina V. Rozhkova
Cand.Sci.(Eng.), Head of the Central Laboratory of Microbiology, All-Russia Dairy Research Institute, Bld. 7., 35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia,
phone: +7 (499) 236-72-16., e-mail: microbs@yandex.ru

Anna V. Begunova
Researcher of the Central Laboratory of Microbiology, All-Russia Dairy Research Institute, Bld. 7., 35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia, phone: +7 (499) 236-72-16, e-mail: microbs@yandex.ru