

УДК 577.18.03/04:615.372

О.Ю. Ісаєнко¹, О.В.Книш¹, Є.М. Бабич¹, А.М. Компанієць^{2*},
О.І. Осецький², В.П. Полянська³, С.В. Зачепило³

Вплив умов зберігання фільтратів бульйонних культур пробіотиків на їхню протимікробну активність

UDC 577.18.03/04:615.372

O.Yu. Isaienko¹, O.V. Knysh¹, Ye.M. Babych¹,
A.M. Kompaniets^{2*}, O.I. Osetsky², V.P. Polianska³, S.V. Zachepylo³
**Influence of Storage of Probiotic Broth Culture Filtrates
on Their Antimicrobial Activity**

Реферат: На сьогодні єдина ефективна технологія тривалого зберігання метаболіт-вмісних продуктів мікробного походження остаточно не розроблена. Інформація щодо переваг та доцільності застосування того чи того методу зберігання таких продуктів у наукових літературних джерелах відсутня. Визначення оптимальних умов дозволить уникати втрати біологічної активності метаболітів під час зберігання як на етапах наукових досліджень, так і на виробництві. У роботі отримували метаболіти шляхом відділення від продуцентів за допомогою центрифугування та фільтрації після культивування пробіотиків у рідкому поживному середовищі. Досліджено протимікробну активність фільтратів культуральних рідин пробіотиків із різними посівними дозами одразу після отримання та зберігання протягом 60 діб у рідкому стані за температури $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$, у замороженому стані при $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ та в ліофілізованому стані за гіпотермічних умов $((4 \pm 1)^\circ\text{C})$. Встановлено, що зберігання фільтратів бульйонних культур пробіотиків у вищезазначених умовах не призводить до суттєвого зниження їхньої протимікробної активності. Отримані результати можуть бути використані під час створення комерційних препаратів метабіотиків.

Ключові слова: пробіотики, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*, продукти метаболізму, протимікробна активність, заморожування, ліофілізація.

Реферат: На сьогоднішній день єдина ефективна технологія тривалого зберігання метаболіт-содержащих продуктов микробного происхождения окончательно не разработана. Информация о преимуществах и целесообразности применения того или иного метода хранения таких продуктов в научных литературных источниках отсутствует. Определение оптимальных условий хранения позволит избежать потери биологической активности метаболитов при хранении как на этапах научных исследований, так и на производстве. В работе получали метаболиты путем отделения от продуцентов с помощью центрифугирования и фильтрации после культивирования пробиотиков в жидкой питательной среде. Исследовали противомикробную активность фильтратов культуральных жидкостей пробиотиков с разными посевными дозами сразу после получения и хранения в течение 60 суток в жидком состоянии при температуре $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$, в замороженном состоянии при $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ и в лиофилизированном состоянии в условиях гипотермии $((4 \pm 1)^\circ\text{C})$. Установлено, что хранение фильтратов бульонных культур пробиотиков в вышеупомянутых условиях не приводит к существенному снижению или потере противомикробной активности продуктов их метаболизма. Полученные результаты могут быть использованы при создании коммерческих препаратов метабіотиков.

Ключевые слова: пробиотики, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*, продукты метаболизма, противомикробная активность, замораживание, лиофилизация.

Abstract: Nowadays there is no standard efficient technology for long-term storage of metabolite-containing products of microbial origin as well as no data about the advantages and expediency of using one or another method of storage for these products. Determining the optimal storage conditions will prevent the loss of biological activity of metabolites during storage both for scientific research and production. Metabolites were obtained by isolation from the producers by means of centrifugation and filtration after culturing probiotics in a liquid nutrient medium. We studied antimicrobial activity of filtrates of probiotic culture liquids with various inoculation doses right after obtaining and storage for 60 days in liquid, frozen and frozen-dried state at $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ and under hypothermic conditions $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$, respectively. The storage of probiotic broth culture filtrates under the mentioned above conditions did not result in a significant reduction of their antimicrobial activity. The obtained results can be used when developing commercial metabіotics.

Key words: probiotics, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*, metabolic products, antimicrobial activity, freezing, freeze-drying.

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАН України», м. Харків, Україна

²Лабораторія кріопротекторів, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

³Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава, Україна

¹Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Laboratory of Cryoprotectants, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

³Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
електронна пошта: journal@cryo.org.ua

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: journal@cryo.org.ua

Надійшла 13.09.2017

Прийнята до друку 09.10.2017

Received October, 13, 2017

Accepted November, 09, 2017

© 2017 O.Yu. Isaienko et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Одним із основних механізмів дії пробіотиків є антагоністична активність по відношенню до умовно-патогенних та облігатно-патогенних мікроорганізмів. Вона реалізується завдяки здатності пробіотичних бактерій продукувати метаболіти – органічні кислоти, коротколанцюгові жирні кислоти, перекис водню, спирти та антибактеріальні речовини білково-пептидної природи (лізоцим, бактеріоцини тощо) [8, 18, 21, 26]. Однак низький рівень виживання (20–40%) екзогенних пробіотиків у шлунково-кишковому тракті пацієнта не дозволяє їм повною мірою реалізувати власний пробіотичний потенціал і обумовлює необхідність застосування додаткових засобів їхнього захисту – кислотостійких капсул або мікропористих носіїв (сорбентів) [5, 15, 20]. Крім того, одночасний прийом пробіотика та антибіотика можливий тільки за наявності у пробіотичного мікроорганізму резистентності до призначеного антибактеріального препарату. У зв'язку з цим лікування пробіотичними препаратами на основі живих бактерій пов'язане з ризиком розповсюдження генів антибіотикорезистентності в мікробіомі людини, що суперечить вимогам лікарської безпеки [25]. Всупереч поширеній думці про те, що лікування пробіотиками абсолютно безпечно, в наукових літературних джерелах повідомляється про випадки виникнення серйозних побічних ефектів внаслідок клітинної пробіотикотерапії [20]. Застосування виключно метаболітів бактерій – біологічно активних речовин, які забезпечують основні ефекти пробіотиків, дозволяє уникнути низки недоліків клітинної пробіотикотерапії та може розглядатися не тільки як замісна терапія при дисбіозах. У деяких випадках метабіотики (пробіотичні препарати, які містять метаболіти пробіотиків) можуть стати альтернативою антибіотикам [3, 16, 17, 20, 24].

Зазвичай метаболіти отримують під час культивування пробіотика в рідкому поживному середовищі з наступним відділенням від продуцента культуральної рідини, який містить продукти обміну [4, 7, 13, 22]. Останні представляють собою біомолекули, які під впливом різних чинників можуть зазнавати структурних змін, що, у свою чергу, приводить до змін біологічної активності. Очевидно, що під час дослідження зразків одразу після їх одержання спостерігатиметься мінімальна зміна біологічної активності метаболітів. Однак одразу після отримання зразків не завжди є можливість одночасного проведення різних видів досліджень або вивчення великої кількості зразків, які містять біологічно активні речовини. У таких випадках постає потреба у створенні оптимальних умов для збереження біологічно активного потенціалу продуктів метаболізму. Стабільність біологічної активності продуктів метаболізму має велике значення також при виробництві метабіотиків, оскільки з

One of the main mechanisms of probiotic effect is an antagonistic activity against the opportunistic and obligatory pathogenic microorganisms. It is implemented due to the capability of probiotic bacteria to produce the metabolites, *i. e.* organic acids, short-chain fatty acids, hydrogen peroxide, alcohols and antibacterial substances of protein-peptide origin (lysozyme, bacteriocins, *etc.*) [6, 9, 11, 24]. Nevertheless, a low survival (20–40%) of exogenous probiotics in patient's gastrointestinal tract does not allow them to fully implement their own probiotic potential and necessitates the use of additional means for their protection, such as the acid-resistant capsules or microporous carriers (sorbents) [19, 26, 27]. In addition, a simultaneous administration of probiotic and antibiotic is only possible if a probiotic microorganism is resistant to the prescribed antibacterial drug. In this context the therapy with the live bacteria-based probiotic drugs is associated with the risk of spreading of antibiotic resistance genes in human microbiome, contradicting to the medical safety requirements [8]. In contrast to the common belief that the therapy with probiotics is completely safe, there are the reports about the cases of severe side-effects due to cellular probiotic therapy [26]. Application of bacterial metabolites only, *i. e.* the biologically active substances, providing the main effects of probiotics, enables to mitigate certain disadvantages of cell probiotic therapy and may be considered not only as the substitution therapy in dysbiosis. In some cases, the metabiotics (probiotic drugs, containing probiotic metabolites) may be the alternative to antibiotics [4, 7, 20, 23, 26].

Usually, the metabolites are obtained during probiotic culturing in a liquid nutrient medium with a subsequent isolation of culture liquid with the metabolic products from a producer [5, 10, 17, 21]. These include the biomolecules, which can be structurally changed under the effect of various factors, that, in turn, results in changes in biological activity. Obviously, the assessment of specimens right after obtaining will show only the minimum change in biological activity of metabolites. However, a simultaneous performance of different researches or using a big number of specimens, containing biologically active substances, is not always possible just after specimen obtaining. In these cases, there is a need in creating the optimal conditions to preserve the biologically active potential of metabolic products. The stability of biological activity of metabolic products is of great importance in production of metabiotics as well, since they can be stored for a long time from the time of their obtaining up to the intake by a patient. Nowadays there is no standard technology for storage of the metabolites either for scientific research or for production of drugs containing the metabolites. The technology of metabolite obtaining mostly determi-



моменту отримання до вживання пацієнтом вони можуть підлягати тривалому зберіганню. Наразі відсутня єдина технологія зберігання метаболітів як на етапах наукових досліджень, так і при виробництві препаратів на основі метаболітів. Здебільшого технологія отримання метаболітів визначає подальший спосіб зберігання. Якщо отримання продуктів метаболізму передбачає концентрування фільтрату культуральної рідини пробіотика ліофільним висушуванням, то метаболіти зберігають у сухому стані [4, 7]. В.А. Несчисляєв та Л.П. Чистохіна [22] пропонують зберігати ультрафільтрати культуральних рідин після термічної стабілізації у рідкому стані. З метою забезпечення стабільних властивостей рідких метаболітних пробіотиків упродовж тривалого терміну до їхнього складу при виробництві вводять стабілізатори та консерванти [3]. Однак введення додаткових хімічних сполук до отриманих метаболітів на етапах наукових досліджень є неприйнятним, оскільки це може вплинути на результати. У такому разі виникає необхідність застосування інших способів збереження їхніх початкових властивостей. Порівняльні дослідження впливу різних умов зберігання на біологічну активність продуктів метаболізму пробіотиків раніше не проводилися.

Мета даної роботи – оцінка та порівняння протимікробного потенціалу фільтратів бульйонних культур пробіотиків *Lactobacillus rhamnosus GG* та *Saccharomyces boulardii* за різних умов зберігання.

Матеріали та методи

У якості продуцентів метаболітів у роботі були використані гриби *Saccharomyces boulardii* з пробіотичного препарату «BULARDI®» («Schonen», Швейцарія) та пробіотичний штам *Lactobacillus rhamnosus GG* з симбіотику «PREEMA®» («Schopen»). Протимікробну активність метаболітів вивчали на тест-культурах: циркулюючих штаммах, які зберігаються в колекції мікроорганізмів лабораторії профілактики краплинних інфекцій (ДУ «ІМІ НАМН», Україна) та референс-штамах, отриманих із Музею мікроорганізмів (ДУ «ІМІ НАМН») (*Staphylococcus epidermidis* №558, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Corynebacterium xerosis* №41, *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺* №11, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Мікроорганізми вирощували на сприятливих для них поживних середовищах: 1%-й цукровий м'ясо-пептонний бульйон (цМПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), жовтково-сольовий агар (ЖСА), кров'яно-телуритовий агар (КТА) [23]. Синхронізацію культур здійснювали шляхом витримки в гіпотермічних умовах ((4 ± 1)°C) упродовж 30 хв [1].

Отримання метаболітів. Із добових культур пробіотичних штамів лактобактерій та сахаромі-

нес the further way of their storage. If the obtaining of metabolic products involves the concentration of probiotic culture liquid filtrate by freeze-drying, then the metabolites will be stored in a dry state [5, 10]. V.A. Neschislyayev and L.P. Chistokhina [21] proposed to store the ultrafiltrates of culture filtrates after thermal stabilization in a liquid state. In order to preserve the properties of liquid metabolic probiotics for a long time, they are supplemented with stabilizers and preservatives during their production [4]. However, the introduction of additional chemical compounds to the obtained metabolites for research purposes is unacceptable, since this may corrupt the obtained data. In this case, there is a need to use the other ways to preserve their initial properties. The effect of different storage conditions on biological activity of metabolic products of probiotics have not been comparatively studied previously.

This research was aimed to assess and compare an antimicrobial potential of broth culture filtrates of probiotics *Lactobacillus rhamnosus GG* and *Saccharomyces boulardii* under different storage conditions.

Materials and methods

We used here the *Saccharomyces boulardii* isolated from the probiotic product BULARDI® (Schonen, Switzerland) and the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus GG* from the symbiotic PREEMA® (Schonen) as metabolite producers. An anti-microbial activity of metabolites was studied in the test cultures, *i. e.* the circulating strains, stored in the microorganism collection of the laboratory for prevention of droplet infections (Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the NAMS of Ukraine) and the reference strains, obtained from the Museum of Microorganisms (Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the NAMS of Ukraine) (*Staphylococcus epidermidis* №558, *Staphylococcus aureus* ATSC 25923, *Corynebacterium xerosis* №41, *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺* №11, *Pseudomonas aeruginosa* ATSC 27853). Microorganisms were grown in favorable nutrient media, *i. e.* 1% sugar meat-peptone broth (sMPB), meat-peptone agar (MPA), yolk-salt agar (YSA), blood-tellurite agar (BTA) [1]. The cultures were synchronized by exposure under hypothermic conditions ((4 ± 1)°C) for 30 min [2].

Metabolite obtaining. Cell suspensions with optical density of 1.0; 5.0; 10.0 McFarland standard were prepared from the daily cultures of probiotic strains of *lactobacilli* and *Saccharomyces*, then assessed with Densi-La-Meter (Lachema, Czech Republic) device. The prepared suspensions were inoculated in 1% sMPB in 1:9 ratio. Probiotic microorganisms were cultured within 48 hrs at (37 ± 1)°C. Broth cultures



цетів готували суспензії клітин із оптичною густиною 1,0; 5,0; 10,0 одиниць за шкалою МакФарланда, яку вимірювали за допомогою приладу «Densi-Lameter» («Lachema», Чехія). Приготовані суспензії інокулювали в 1%-й цМПБ у співвідношенні 1:9. Тривалість культивування пробіотичних мікроорганізмів складала 48 годин за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Бульйонні культури центрифугували при 1000g упродовж 30 хв. Супернатант фільтрували за допомогою стерильних мембранних фільтратів із діаметром пор 0,2 мкм («Владіпор», Росія).

Зберігання метаболітів. Фільтрати бульйонних культур пробіотиків із посівною дозою 10 одиниць за шкалою МакФарланда (свіжовиділені) після дослідження їхньої протимікробної активності зберігали протягом 60 діб: у рідкому стані за температури $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ (холодове зберігання); у замороженому стані при $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ (заморожені); у ліофілізованому стані за умов гіпотермії $((4 \pm 1)^\circ\text{C})$ (ліофілізовані).

Заморожування здійснювали пасивним охолодженням зразків фільтратів у морозильній камері холодильника «Samsung RB29FSRND5A» («Samsung», Південна Корея) до температури $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$. Ліофільне висушування дослідних зразків, поміщених у пластикові флакони ємністю 20 мл, проводили на устаткуванні «УЗВ-10» виробництва СКТБ із ДВ ІПКіК НАН України. Флакони зі зразками охолоджували безпосередньо у сублімаційній камері у спеціальних алюмінієвих касетах. Процес ліофілізації починався при досягненні температури -20°C і тривав протягом 14–16 годин при середньому тиску в камері 102 Па. Залишкова вологість зразків не перевищувала 5%. Для забезпечення стерильності зразків флакони переміщували в пакувальний бокс під впливом ультрафіолетового випромінювання. Ліофільно висушені зразки зберігали у герметичних пластикових флаконах. Перед дослідженням протимікробної активності заморожені зразки розморожували на водяній бані за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ до повного відтавання. Регідратацію ліофілізованих зразків проводили в асептичних умовах шляхом додавання дистильованої води протягом 10 хв, доводячи об'єм зразка до початкового значення.

Фільтрати бульйонних культур пробіотиків із посівною дозою 1 (А) та 5 (В) одиниць за шкалою МакФарланда після дослідження їхньої протимікробної активності зберігали протягом 60 діб у замороженому стані за температури $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Дослідження протимікробної активності метаболітів. Якісний метод. Дослідження проводили у рідкому середовищі (фільтраті культуральної рідини пробіотика) одразу після отримання та зберігання у вищезазначених умовах упродовж 60 діб. Дослідні зразки отримували шляхом дода-

were centrifuged at 1000g for 30 min. The supernatant was filtered with the sterile membrane filters with 0.2 μm pore diameter (Vladipor, Russia).

Metabolite storage. The filtrates of broth probiotic cultures with the inoculation dose of 10 McFarland standard (freshly isolated) after studying their antimicrobial activity were stored for 60 days in a liquid state at $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ (cold storage); in a frozen state at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ (frozen); in a frozen-dried state under hypothermia $((4 \pm 1)^\circ\text{C})$ (frozen-dried).

Freezing was performed with a passive cooling of filtrated specimens in freezing chamber of refrigerator Samsung RB29FSRND5A (Samsung, South Korea) down to $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$. The experimental specimens were placed into 20 ml plastic flasks and frozen-dried with the UZV-10 device, manufactured by the Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine. Flasks with the specimens were cooled directly in a sublimation chamber in the special aluminum cassettes. The freeze-drying started when the temperature reached -20°C and lasted for 14–16 hrs at an average chamber pressure of 102 Pa. The residual humidity of specimens did not exceed 5%. To ensure the specimen sterility the flasks were transferred into the packaging box under ultraviolet radiation. The frozen-dried samples were stored in the sealed plastic flasks. Before analyzing the antimicrobial activity the frozen specimens were thawed in a water bath at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ up to a complete thawing. The frozen-dried specimens were rehydrated under aseptic conditions via supplementing with distilled water within 10 min, bringing the specimen volume up to its initial value.

After studying antimicrobial activity the filtrates of broth probiotic cultures with inoculation dose of 1 (A) and 5 (B) McFarland standard were stored for 60 days in a frozen state at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Study of antimicrobial activity of metabolites. Qualitative method. The research was carried out in a liquid medium (filtrate of probiotic culture liquid) right after obtaining and storage under the mentioned above conditions for 60 days. The experimental specimens were obtained via supplementing bacterial suspensions of test cultures of 1.0 McFarland standard to the probiotic culture liquid filtrates in the 1:9 ratio. The control samples contained the corresponding test culture and 1% sMPB. Experimental and control specimens were incubated at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 24 and 48 hrs. The medium turbidity testified to the test culture growth. In the case if the medium remained transparent, the following inoculation was carried out to a solid nutrient medium: MPA, YSA or BTA (depending on test culture). The presence of growth on a solid nutrient medium indicated a bacte-



вання бактеріальних суспензій тест-культур із оптичною густиною 1,0 за шкалою МакФарланда до фільтратів культуральних рідин пробіотиків у співвідношенні 1:9. Контрольні зразки містили відповідну тест-культуру та 1% цМПБ. Дослідні та контрольні зразки інкубували за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 24 та 48 годин. Помутніння середовища свідчило про ріст тест-культури. У випадку, якщо середовище залишалося прозорим, висів із нього здійснювали на тверде поживне середовище – МПА, ЖСА або КТА (залежно від тест-культури). Наявність росту на твердому поживному середовищі свідчила про бактеріостатичний ефект фільтрату по відношенню до тест-культури, а його відсутність – про його бактерицидну дію.

Кількісний метод. Протимікробну активність метаболітів оцінювали за показником кількості життєздатних мікроорганізмів тест-штаму (КУО) в одиниці об'єму фільтратів після добової експозиції. Дослідні та контрольні зразки готували за допомогою якісного методу. Через 24 години експозиції з дослідних та контрольних зразків готували послідовні розведення, з яких здійснювали висів 0,1 мл рідини на поверхню відповідного твердого поживного середовища. Посіви культивували за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через добу підраховували кількість колоній, які виростили, та визначали кількість КУО в одиниці об'єму дослідного матеріалу, яку виражали в десятковому логарифмі КУО/мл.

Усі експерименти проводили в чотирьох повторах. Визначали середні значення отриманих показників та їх стандартні похибки. Значущість різниці між отриманими показниками визначали за допомогою критерію Стьюдента. Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали з використанням програмного пакету «Microsoft Excel 2010» («Microsoft», США).

Результати та обговорення

На першому етапі експериментальної роботи вивчали вплив умов зберігання фільтратів бульйонних культур пробіотиків із посівною дозою 10,0 одиниць за шкалою МакФарланда на їхню протимікробну активність із застосуванням якісного методу оцінки. Обрана посівна доза пробіотиків забезпечує високу протимікробну активність фільтратів, що обумовлено накопиченням у культуральному середовищі метаболітів із протимікробною дією у достатньо високій концентрації [9, 10].

Як показали результати досліджень, фільтрати 48-годинних бульйонних культур лактобактерій одразу після отримання виявляють бактерицидну дію по відношенню до усіх обраних тест-культур (табл. 1). Дослідження протимікробної активності фільтратів, які перенесли зберігання у гіпотермічних умовах, замороженому та ліофілізованому стані,

риостатичний ефект фільтрату проти тест-культури, та його повна відсутність свідчили про антибактеріальний ефект.

Quantitative method. An antimicrobial activity of metabolites was assessed by the index of viable microorganism number of test strain (CFUs) per unit volume of filtrates after daily exposure. Experimental and control specimens were prepared using the qualitative method. After a 24-hour exposure the studied and control specimens were successively diluted, and 0.1 ml of liquid was inoculated to the surface of corresponding solid nutrient medium. The seeded samples were cultured at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. One day later we calculated the number of grown colonies and determined the number of CFUs per unit volume of the studied material, expressed as the common logarithm of CFUs/ml.

All the experiments were repeated 4 times. The mean values of the obtained indices and their standard errors were determined. The significance of difference between the obtained indices was determined using the Student's t-test. The results were statistically processed with the Microsoft Excel 2010 software (Microsoft, USA).

Results and discussion

At the first stage of research we studied the effect of storage conditions of broth probiotic culture filtrates with inoculation dose of 10.0 McFarland standard on their antimicrobial activity using the qualitative method for estimation. The selected inoculation dose for probiotics provided a high antimicrobial activity of filtrates due to accumulation in the culture medium of metabolites with antimicrobial effect in quite a high concentration [13, 14].

Our findings demonstrated the filtrates of 28-hour broth cultures of lactobacilli as manifesting an antibacterial effect against all the selected test cultures right after obtaining (Table 1). The study of antimicrobial activity of the filtrates, stored under hypothermic conditions, in frozen and frozen-dried states demonstrated the preservation of their antibacterial activity at the level of filtrate activity prior to storage.

Filtrates of 48-hour broth cultures of *Saccharomyces* right after obtaining demonstrated a bacteriostatic effect on staphylococcal test cultures during 24- and 48-hour exposures (Table 2). The growth of the *Pseudomonas aeruginosa* culture was suppressed during the first 24 hrs of exposure in freshly isolated filtrate, being absent 48 hrs post exposure. An antibacterial effect of filtrates against the corynebacteria was observed both 24 and 48 hrs post exposures. We established the fact that the storage under hypothermic conditions, freezing and freeze-drying had no effect on the nature of antimicrobial activity of broth culture filtrates of *Saccharomyces* against the selected test cultures.

The findings of the first research stage suggested the metabolic products, associated with an antimicrobial

Таблиця 1. Вплив фільтратів 48-годинних бульйонних культур *Lactobacillus rhamnosus* GG, які зберігалися за різних умов, на життєздатність тест-культур стафілококів, коринебактерій та синьогнійної палички
Table 1. Effect of 48-hour broth culture filtrates of *Lactobacillus rhamnosus* GG, stored under different conditions on staphylococci, corynebacteria and *Pseudomonas aeruginosa* test culture viability

Тест-культури Test cultures	Час експозиції, година Exposure time, hr	Фільтрати бульйонних культур <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG Broth culture filtrates of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG				цМПБ sMPB
		Свіжовиділені фільтрати Freshly isolated	Після холодого зберігання After cold storage	Після заморожування After freezing	Ліофілізовані фільтрати Freeze-dried	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24	-	-	-	-	+
	48	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	-	-	-	-	+
	48	-	-	-	-	+
<i>Corynebacterium xerosis</i>	24	-	-	-	-	+
	48	-	-	-	-	+
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	24	-	-	-	-	+
	48	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	-	-	-	-	+
	48	-	-	-	-	+

Примітки: «+» – ріст культури у рідкому і на твердому поживних середовищах; «-» – присутній бактерицидний ефект.

Note: «+» – culture growth in liquid and solid nutrient media; «-» – antibacterial effect.

показало збереженість їхньої бактерицидної активності на рівні активності фільтратів до зберігання.

Фільтрати 48-годинних бульйонних культур сахароміцетів одразу після отримання виявляють бактериостатичну дію на тест-культури стафілококів протягом 24 та 48 годинної експозиції (табл. 2). Ріст культури *Pseudomonas aeruginosa* пригнічується протягом перших 24 годин витримки у свіжовиділеному фільтраті та відсутній після 48-годинної експозиції. Бактерицидний ефект фільтратів по відношенню до коринебактерій спостерігається як через 24, так і після 48 годин експозиції. У результаті досліджень встановлено, що зберігання за гіпотермічних умов, заморожування та ліофілізація не впливають на характер протимікробної активності фільтратів бульйонних культур сахароміцетів по відношенню до обраних тест-культур.

Отримані на першому етапі досліджень результати свідать про те, що продукти метаболізму, з якими пов'язують протимікробну активність культуральної рідини пробіотиків, добре переносять холодове зберігання, заморожування-відтавання та ліофільне висушування. Підтвердження такої думки

activity of culture probiotic liquid, to tolerate well a cold storage, freeze-thawing and freeze-drying. This idea was confirmed earlier by other researchers. For example, proteins and peptides may be successfully stored in frozen and frozen-dried states when keeping the certain technological parameters (temperature and time regimens for each stage of freeze-drying, freezing, freeze-thawing, the minimum temperature of freezing, medium composition, specimen volume etc.) [3, 16, 18, 22]. So, quite a high level of antimicrobial potential of the studied filtrates, stored under different conditions, might result from a successful combination of the optimal rate of freeze-thawing, cryoprotective properties of freezing medium and low cryolability of biomolecules with antimicrobial activity. However, the antimicrobial effect of filtrates was associated not only with the substances of protein-peptide origin. The findings of the first stage might be correctly interpreted only if only considering the changes in biochemical composition of specimens during storage. Of note is the fact, that the data of the first stage could be also explained by an insufficient sensitivity of the qualitative method of evaluation, *i. e.* impossibility of revealing the slight differences between the antimicrobial potential of the



Таблиця 2. Вплив фільтратів 48-годинних бульйонних культур *Saccharomyces boulardii*, які зберігалися за різних умов, на життєздатність тест-культур стафілококів, коринебактерій та синьогнійної палички
Table 2. Effect of 48-hour broth culture filtrates of *Saccharomyces boulardii*, stored under different conditions on staphylococci, corynebacteria and *Pseudomonas aeruginosa* test culture viability

Тест-культури Test cultures	Час експозиції, година Exposure time, hr	Фільтрати бульйонних культур <i>Saccharomyces boulardii</i> Broth culture filtrates of <i>Saccharomyces boulardii</i>				цМПБ sMPB
		Свіжовиділені фільтрати Freshly isolated	Після холодового зберігання After cold storage	Після заморожування After freezing	Ліофілізовані фільтрати Freeze-dried	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24	±	±	±	±	+
	48	±	±	±	±	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	±	±	±	±	+
	48	±	±	±	±	+
<i>Corynebacterium xerosis</i>	24	-	-	-	-	+
	48	-	-	-	-	+
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	24	-	-	-	-	+
	48	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	±	±	±	±	+
	48	-	-	-	-	+

Примітки: «+» – ріст культури у рідкому і на твердому поживних середовищах присутній; «±» – присутній бактеріостатичний ефект; «-» – присутній бактерицидний ефект.

Note: «+» – culture growth in liquid and solid nutrient media; «±» – bacteriostatic effect; «-» – antibacterial effect.

можна знайти у роботах інших дослідників. Білки та пептиди за умови дотримання певних технологічних параметрів (температурні та часові режими кожного етапу ліофілізації, заморожування, розморожування, мінімальна температура заморожування, склад середовища, об'єм зразка тощо) успішно зберігають у замороженому та ліофілізованому стані [2, 12, 14, 27]. Тобто, достатньо високий рівень протимікробного потенціалу досліджених нами фільтратів, які зберігалися за різних умов, може бути результатом вдалого поєднання оптимальної швидкості заморожування та відтавання, криозахисних властивостей середовища заморожування та низької криолабільності біомолекул із протимікробною активністю. Проте протимікробна дія фільтратів пов'язана не тільки з речовинами білково-пептидної природи. Правильне трактування отриманих на першому етапі результатів можливе тільки з урахуванням змін біохімічного складу зразків під час зберігання. Необхідно відмітити, що результати першого етапу досліджень можна пояснити також недостатньою чутливістю якісного методу оцінки, який не дає можливості виявити незначні відмінності між величиною протимікробного потенціалу досліджених фільтратів на тлі їхньої високої проти-

studied filtrates at the background of their high antimicrobial activity due to the selected inoculation dose of probiotics. We are planning to perform further experiments using more sensitive research methods and studying biochemical changes, which accompany the filtrate storage under different conditions.

We consider the storage in a frozen state to be the most suitable method among the used ones to be applied in future scientific researches. In contrast to the storage under hypothermic conditions ((4 ± 1)°C), this method enables minimizing the damage of biomolecules by reactive oxygen species and highly reactive compounds of radical nature and preserving them in a functionally active state [12]. Freezing is simpler technological process, consuming less time, and does not require special high-value equipment, unlike freeze-drying. Therefore, at the next stage of our research we studied the effect of storage of probiotic broth culture filtrates right in a frozen state on their antimicrobial properties. Taking into account the fact that when applying the probiotic inoculation dose of 10.0 McFarland standard, no difference between an antimicrobial activity of freshly isolated filtrates and those, stored in a frozen state, was obtained, we decided to reduce the inoculation dose of probiotic. We assumed the use of a lower inoculation

мікробної активності завдяки обраній посівній дозі пробіотиків. У подальшому планується проведення аналогічних експериментів із використанням більш чутливих методів дослідження та вивченням біохімічних змін, які супроводжують зберігання фільтратів за різних умов.

Серед застосованих у роботі способів найбільш прийнятним для подальшого використання на етапах наукових досліджень ми вважаємо зберігання у замороженому стані. На відміну від зберігання в гіпотермічних умовах ($(4 \pm 1)^\circ\text{C}$) цей спосіб дозволяє звести до мінімуму пошкодження біомолекул активними формами кисню і високореактивними сполуками радикальної природи та зберегти їх у функціонально активному стані [6]. У порівнянні з ліофілізацією, заморожування – це більш простий технологічний процес, який не потребує багато часу і задіяння спеціального високовартісного обладнання. Тому наступним етапом нашої роботи стало вивчення впливу зберігання фільтратів бульйонних культур пробіотиків саме у замороженому стані на їхні протимікробні властивості. Зважаючи на те, що при застосуванні посівної дози пробіотиків 10,0 одиниць за шкалою МакФарланда, ми не отримали різниці між протимікробною активністю свіжовиділених фільтратів та тих, які зберігалися у замороженому стані, було вирішено зменшити посівну дозу пробіотика. Ми припускаємо, що застосування меншої посівної дози забезпечить накопичення метаболітів у культуральному середовищі у меншій концентрації, а отже, нижчу початкову протимікробну активність фільтратів і вищу ймовірність виявлення її можливих змін у результаті зберігання. Під час вибору посівних доз ми орієнтувалися на роботи інших авторів [11, 19]. Для оцінки протимікробної активності фільтратів, отриманих із застосуванням зазначених посівних доз, було обрано кількісний метод, за допомогою якого можливо виявити зниження протимікробного потенціалу фільтратів у результаті зберігання в замороженому стані.

Таблиця 3. Протимікробна активність фільтратів 48-годинних бульйонних культур *Lactobacillus rhamnosus* GG із посівною дозою 1 (А) та 5 (В) одиниць за шкалою МакФарланда до та після заморожування

Table 3. Antimicrobial activity of 48-hour broth culture filtrates of *Lactobacillus rhamnosus* GG with inoculation dose of 1 (A) and 5 (B) McFarland standard prior to and after freezing

Тест-культури Test cultures	Час експозиції, година Exposure time, hr	Фільтрати бульйонних культур <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG Broth culture filtrates of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG				цМПБ sMPB
		до заморожування prior to freezing		після заморожування after freeze-thawing		
		A	B	A	B	
		lg, КУО/мл lg CFUs/ml				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24	5,7 ± 0,05	–	5,9 ± 0,01*	–	9,9 ± 0,02
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	6,2 ± 0,1	–	6,6 ± 0,05*	–	9,8 ± 0,03
<i>Corynebacterium xerosis</i>	24	–	–	–	–	9,6 ± 0,04
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	24	–	–	–	–	9,7 ± 0,04
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	–	–	–	–	9,8 ± 0,08

Примітки: протимікробна активність фільтратів, визначена кількісним методом: «–» – відсутність росту мікроорганізмів; * – відмінності статистично значущі відносно показників до заморожування; $p < 0,05$.

Note: an antimicrobial activity of filtrates was determined by quantitative method: «–» – no microorganism growth; * – differences are statistically significant as compared to indices before freezing; $p < 0.05$.

dose would ensure the accumulation of metabolites in a culture medium at a lower concentration, and hence a lower initial antimicrobial activity of filtrates and a higher probability to reveal its possible changes due to storage. When selecting the inoculation doses we followed the investigations of other authors [15, 25]. In order to evaluate an antimicrobial activity of the filtrates, obtained with applying the mentioned inoculation doses, we selected a quantitative method to reveal the reduction of antimicrobial potential of filtrates as a result of storage in a frozen state.

Thus, the next stage in our research was to study the storage effect of probiotic broth culture filtrates with inoculation doses of 1.0 (A) and 5.0 (B) McFarland standard in a frozen state at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ on their antimicrobial properties against the test cultures after daily exposure using quantitative method of evaluation. Ac-



Таким чином, наступним етапом нашої роботи стало вивчення впливу зберігання фільтратів бульйонних культур пробіотиків із посівними дозами 1,0 (А) та 5,0 (В) одиниць за шкалою МакФарланда в замороженому стані за температури $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ на їхні протимікробні властивості по відношенню до тест-культур після добової експозиції з застосуванням кількісного методу оцінки. Згідно з результатами, представленими у табл. 3, свіжовиділені та розморожені фільтрати бульйонних культур лактобактерій, отримані з використанням обох посівних доз, виявляють бактерицидну активність по відношенню до коринібактерій та синьогнійної палички. Бактерицидна дія фільтратів лактобактерій по відношенню до стафілококів спостерігається (як до, так і після заморожування) тільки під час застосування посівної дози 5 одиниць (В) за шкалою МакФарланда. Фільтрати з посівною дозою 1,0 одиниць (А) за шкалою

МакФарланда мають бактериостатичну дію на стафілококи. Кількісні показники життєздатності тест-культур стафілококів після добової експозиції у розморожених фільтратах А є значуще вищими, ніж у свіжовиділених фільтратах А, але знаходяться у межах одного порядку.

Бактерицидна активність фільтратів бульйонних культур сахароміцетів по відношенню до коринібактерій після заморожування-розморожування зберігається незалежно від посівної дози (табл. 4). Бактериостатична дія метаболітів сахароміцетів по відношенню до стафілококів та синьогнійної палички при застосуванні обох посівних доз після перенесеного заморожування також зберігається. Показники життєздатності тест-культур стафілококів і псевдомонад після експозиції у розморожених фільтратах сахароміцетів А і В є значуще вищими у порівнянні з відповідними показниками після експозиції у свіжовиділених фільтратах. Однак

Таблиця 4. Протимікробна активність фільтратів 48-годинних бульйонних культур *Saccharomyces boulardii* з посівною дозою 1 (А) та 5 (В) одиниць за шкалою МакФарланда до та після заморожування

Table 4. Antimicrobial activity of 48-hour broth culture filtrates of *Saccharomyces boulardii* with inoculation dose of 1 (A) and 5 (B) McFarland standard prior to and after freezing

Тест-культури Test cultures	Час експозиції, година Exposure time, hr	Фільтрати бульйонних культур <i>Saccharomyces boulardii</i> Broth culture filtrates of <i>Saccharomyces boulardii</i>				цМПБ sMPB
		до заморожування prior to freezing		після заморожування after freeze-thawing		
		A	B	A	B	
		lg, КУО/мл lg CFUs/ml				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24	7,9 ± 0,02	7,3 ± 0,09	8,1 ± 0,1*	7,5 ± 0,07*	9,9 ± 0,02
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	7,9 ± 0,02	7,3 ± 0,09	8,1 ± 0,1*	7,5 ± 0,07*	9,9 ± 0,02
<i>Corynebacterium xerosis</i>	24	-	-	-	-	9,6 ± 0,04
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	24	-	-	-	-	9,7 ± 0,04
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	7,7 ± 0,02	7,5 ± 0,1	7,9 ± 0,01*	7,8 ± 0,01*	9,8 ± 0,08

Примітки: Протимікробна активність фільтратів, визначена кількісним методом: «-» – відсутність росту мікроорганізмів; * – відмінності статистично значущі відносно показників до заморожування; $p < 0,05$.

Note: An antimicrobial activity of filtrates was determined by quantitative method: «-» – no microorganism growth; * – differences are statistically significant as compared to indices before freezing; $p < 0.05$.

according to the findings presented in Table 3, the freshly isolated and frozen-thawed filtrates of lactobacilli broth cultures, obtained using both inoculation doses, demonstrated an antibacterial activity against corynebacteria and *Pseudomonas aeruginosa*. Antibacterial effect of lactobacilli filtrate against staphylococci was observed (both prior to and after freezing) only when applying the inoculation dose 5 (B) McFarland standard. The filtrates with inoculation dose 1.0 (A) McFarland standard had a bacteriostatic effect on Staphylococci. Quantitative indices of staphylococcal test culture viability after daily exposure in frozen-thawed filtrates A were significantly higher vs. freshly-isolated filtrates A, but were within the same order.

An antibacterial activity of broth cultures filtrates of *Saccharomyces* against the corynebacteria after freeze-thawing was kept regardless of inoculation dose (Tabl. 4). Bacteriostatic effect of *Saccharomyces* metabolites against *Staphylococci* and *Pseudomonas*



важливим є те, що різниця між кількісними показниками життєздатності тест-культур після експозиції у свіжовиділених та розморожених фільтратах є невеликою: вона становить значно менше, ніж один порядок.

Висновки

Отримані результати свідчать про те, що досліджені способи зберігання фільтратів бульйонних культур пробіотиків упродовж обраного інтервалу часу не мають значного впливу на протимікробні властивості продуктів їхнього метаболізму. Тому за необхідності та наявності відповідного технічного оснащення будь-який із вищезазначених способів зберігання фільтратів може бути застосований без ризику суттєвого зниження або втрати ними протимікробної активності.

Література

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. – М.: Медицина, 1992. – С. 29–59.
2. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 6, №1. – С. 6–11.
3. Бондаренко В.М. Метаболитные пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микробиологических нарушениях // Consilium Medicum. – 2005. – Т. 6, №6. – С. 437–443.
4. Бузолева Л.С., Сомов Г.П., Бурцева Т.И. Сравнительный анализ качественного и количественного состава аминокислот и органических кислот, продуцируемых в культуральную жидкость *Yersinia pseudotuberculosis* при разных температурах // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2006. – №3. – С. 12–16.
5. Высеканцев И.П., Бабинцев О.М., Марценюк В.Ф. и др. Коррекция популяций ценобиотнов *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. у мышей с экспериментальным дисбиозом кишечника после терапии иммобилизованными на энтеросорбентах пробиотиками, хранившимися при –80 и –196°C // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №3. – С. 267–286.
6. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Никитченко Ю.В. Влияние низкотемпературного хранения на перекисное окисление липидов и антиоксидантную активность фолликулярной жидкости человека // Проблемы криобиологии. – 1998. – №4. – С. 44–47.
7. Ермоленко Е.И., Черныш А.Ю., Марцинковская И.В. и др. Влияние пробиотических энтерококков на рост *Streptococcus agalactiae* // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2007. – №5. – С. 73–77.
8. Ершова И.Б., Гаврыш Л.И., Кунегина Е.Н., Мочалова А.А. Значение лактобактерий в организме человека и тактика правильного выбора эубиотиков // Новости медицины и фармации. – 2007. – №17. – С. 20–21.
9. Ісаєнко О.Ю., Книш О.В., Бабич Є.М. та ін. Вплив продуктів метаболізму *Lactobacillus rhamnosus* GG на тест-культури стафілококів та коринібактерій // Вісник проблем біології і медицини. – 2017. – Вип. 2, №136. – С. 246–251.
10. Ісаєнко О.Ю., Книш О.В., Бабич Є.М. та ін. Протимікробна активність продуктів метаболізму *Saccharomyces boulardii* відносно тест-культур стафілококів і коринібактерій // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2017. – Т. 54, №3. – С. 50–55.

aeruginosa when applying both inoculation doses post freezing was also preserved. The viability indices of staphylococcal and pseudomonad test cultures after exposure in frozen-thawed filtrates of *Saccharomyces* A and B were significantly higher as compared to the corresponding indices after exposure in freshly-isolated filtrates. Nevertheless, of importance was the fact that the difference between quantitative indices of test culture viability after exposure in freshly-isolated and frozen-thawed filtrates was low, *i. e.* much lower than one order.

Conclusions

Our findings testified to the fact that the studied storage methods for the probiotic broth culture filtrates during the selected time interval had no significant effect on antimicrobial properties of their metabolic products. So, any of the mentioned above ways for filtrate storage may be used with no risk of significant decrease or loss by them of antimicrobial activity, if necessary and where an appropriate technical equipment is available.

References

1. Atlas R.M. Handbook of microbiological media. 4th ed. London New York: Boca Raton: CRC Press; 2010.
2. Basnakyana I.A. Cultivation of microorganisms with specified properties. Moscow: Meditsina; 1992.
3. Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V. Technological approaches to improving the process lyophilization of protein and peptide drugs. Russian Journal of Biotherapy 2017; 16(1): 6–11.
4. Bondarenko V.M. Metabolite probiotics: mechanisms of therapeutic effect in microecological disorders. Consilium Medicum 2005; 7(6): 437–443.
5. Buzoleva L.S., Somov G.P., Burtseva T.I. Comparative analysis of qualitative and quantitative composition of the amino and organic acids produced into cultural medium by *Yersinia pseudotuberculosis* at different temperatures. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2006; (S3): 12–16.
6. Chicherin I.Yu., Pogorelsky I.P., Lundovskikh I.A. Antibacterial activity and composition of supernatant of native culture *Lactobacillus plantarum* 8P–A3. Zhurnal Mezhdunarodnoj Meditsiny 2013; 1(2): 131–139.
7. Cotter P., Ross R., Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics. Nat Rev Microbiol 2013; 11(2): 95–105.
8. Courvalin P. Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. Dig Liver Dis 2006; 38(2): 61–65.
9. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. J Mol Microbiol Biotechnol 2007; 13(4): 194–199.
10. Ermolenko E.I., Chernish A.Yu., Martsinkovskaya I.V. et al. Influence of probiotic enterococci on the growth of *Streptococcus agalactiae*. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2007; (5): 73–77.
11. Ershova I.B., Gavrysh L.I., Kunegina E.N., Mochalova A.A. The significance of lactobacilli in the human body and the tactics of the correct choice of eubiotics. Novosti Meditsiny Farmatsii 2007; 17: 20–21.
12. Grischenko V.I., Gerodes A.G., Nikitchenko Yu.V. Effect of various methods of low temperature storage on antioxidative activity of human follicular fluid. Probl Cryobiol 1998; (4): 44–47.



- 11.Коротких О.О, Калініченко С.В. Оцінка цитотоксичної дії екзометаболітів *Lactobacillus plantarum* in vitro. Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 1, Т. 2, №127. – С. 158–161.
- 12.Лукоянова О.Л., Боровик Т.Э, Беляева И.А. и др. Влияние замораживания и длительности хранения сцеженного грудного молока на его пищевую, биологическую ценность и микробиологическую безопасность // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – Т. 10, №1. – С. 29–33.
- 13.Молохова Е.И., Сорокина Ю.В. Разработки отечественных метаболитных пробиотиков и их стандартизация // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, №1. – С. 29–33.
- 14.Нардид О.А. Влияние низких температур на белковые системы // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №2. – С. 83–101.
- 15.Несчисляев В.А., Столбова М.Г., Мокин П.А., Бондарев В.П. Разработка и исследование капсулированной лекарственной формы пробиотика на основе иммобилизованных бифидобактерий // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2013. – №2(46). – С. 35–38.
- 16.Несчисляев В.А., Мокин П.А., Федорова Т.В. К вопросу разработки высокоэффективных метаболитных пробиотиков: Материалы 8-й Междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные направления научных исследований: от теории к практике», Чебоксары, 2016 // Сиб. мед. журн. – 2016. – №2–1(8). – С. 15–17.
- 17.Плоскирева А.А., Горелов А.В. Место метаболитных пробиотиков в практике клинициста // РМЖ. – 2014. – Т. 22, №3. – С. 232–236.
- 18.Соловьева И.В., Точилина А.Г., Новикова Н.А. и др. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – №2. – С. 462–468.
- 19.Тимохина Т.Х., Марков А.А., Паромова Я.И. и др. Способ получения экзометаболитов бифидобактерий с высокой антимикробной активностью // Медицинская наука и образование Урала. – 2016. – Т. 17, №2(86). – С. 152–154.
- 20.Урсова Н. И. Актуальные и нерешенные проблемы пробиотикотерапии // Лечащий врач. – 2013. – №8. – С.60–65.
- 21.Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А. и др. Антибактериальная активность и состав надосадочной жидкости нативной культуры *Lactobacillus plantarum* 8P–A3 // Журн. междунар. медицины. – 2013. – №1(2). – С. 131–139.
- 22.Пат. 2224018, РФ, МПК С12N1/20, А61К35/74, С12N1/20, С12R1:25С12N1/20, А61К35/74, С12N1/20, С12R1:25. Способ получения биологического стимулятора [Электронный ресурс] / В.А. Несчисляев, Л.П. Чистохина (РФ); заявитель и патентообладатель ФГУП «НПО по медицинским иммунологическим препаратам «Микроген» (RU). – № 2001131538/13; заявл. 21.11.2001; опубл. 20.02.2004. – Режим доступа: www.fips.ru.
- 23.Atlas R. M. Handbook of Microbiological Media. – 4th edition. – London New York: Boca Raton: CRC Press, 2010. – 2040 p.
- 24.Cotter P., Ross R., Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics // Nat. Rev. Microbiol. – 2013. – Vol. 11, №2. – P. 95–105.
- 25.Courvalin P. Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics // Dig. Liver Dis. – 2006. – Vol. 38, suppl. 2. – P. 261–265.
- 26.De Vuyst L., Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 13, №4. – P. 194–199.
- 27.Pikal M.J. Freeze-drying of proteins. In: Formulation and Delivery of Proteins and Peptides. Eds. J.L. Cleland and R. Langer // ACS Symposium Series. 567: 120–133 (1994).
- 13.Isaenko O.Yu., Knysh O.V., Babych E.M. et. al. The influence of metabolic products of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the test culture of staphylococci and corynebacteria. Bulletin of Problems Biology and Medicine 2017; 2(136): 246–251.
- 14.Isayenko O.Yu., Knysh O.V., Babych E.M. etc. Antimicrobial activity of metabolites of *Saccharomyces boulardii* against test cultures of Staphylococci and Corynebacteria. Pharmacology and Drug Toxicology 2017; 54 (3): 50–55.
- 15.Korotkykh O.O., Kalinichenko S.V. Evaluation of the exometabolites cytotoxic effect of *Lactobacillus plantarum* in vitro. Bulletin of Problems Biology and Medicine 2016; 2 (127): 158–162.
- 16.Lukoyanova O.L., Borovik T.E., Belyayeva I.A. et al. Influence of freezing and prolonged storage of expressed breast milk on its nutritive, biological values and microbiological safety. Voprosy Sovremennoi Pediatrii 2011; 10(1): 29–33.
- 17.Molokhova E.I., Sorokina Yu.V. Working out domestic metabolic probiotic and their standardization. Sibirsky Meditsinsky Journal 2011; 26; 1(1): 29–33.
- 18.Nardid O.A. Effect of low temperatures on protein systems. Probl Cryobiol Cryomed 2014; 24(2): 83–101.
- 19.Neschislyayev V.A., Stolbova M.G., Mokin P.A., Bondarev V.P. Development of probiotic capsule dosage form with immobilized bifidobacteria. Biopreparations Prevention Diagnosis Treatment 2013; 2(46): 35–38.
- 20.Neschislyayev V.A., Mokin P.A., Fedorova T.V. et. al. On the issue of development of highly effective metabolic probiotics. Actual areas (directions) of scientific research: from theory to practice 2016; 2: 15–17.
- 21.Neschislyayev V.A., Chistokhina L.P., inventors. Scientific and Production Association for Immunological Preparations "Microgen", assignee. Method of obtaining a biological stimulator. RU Patent 2001131538/13; 2004 Febr20.
- 22.Pikal M.J. Freeze-drying of proteins. In: Cleland J.L., Langer R, editors. Formulation and delivery of proteins and peptides. ACS Symposium Series 567; 1994. p. 120–133.
- 23.Ploskireva A.A., Gorelov A.V. Place of metabolic probiotics in the practice of a clinician. Russkij Meditsinskij Zhurnal 2014; 22 (3): 232–236.
- 24.Solovyeva I.V., Tochilina A.G., Novikova N.A. et. al. Study of biological properties of new *Lactobacillus* strains. Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod 2010; 2: 462–468.
- 25.Timokhina T.Kh., Markov A.A., Paromova Ya.I. et al. The way of receiving of bifidobacteria exometabolites with high antimicrobe activity. Meditsinskaya Nauka Obrazovaniye Urala 2016; 17: 2(86): 152–154.
- 26.Ursova N.I. Topical and unsolved issues of probiotic therapy. Lechaschii Vrach 2013; 8: 60–65.
- 27.Vysekantsev I.P., Babinets O.M., Martsenyuk V.F. et. al. Correction of Bifidobacterium spp. and Lactobacillus spp. Populations in mice with experimental intestinal dysbiosis after therapy with enterosorbent-immobilized probiotics stored at –80 and –196°C. Probl Cryobiol Cryomed 2015; 25(3): 267–286.

