

DOI 10.31718/2077-1096.22.1.111

УДК 57.086.13:602

Петров І.В., Висеканцев І.П., Черкашина Я.О., Хардід Е.О.

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ПРОБІОТИКІВ ПІСЛЯ ЗБЕРІГАННЯ ЗА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків,

Представлені у публікації результати є частиною досліджень, присвячених розробці технологій довгострокового зберігання іммобілізованих в гелевих носіях клітин пробіотиків. Мета роботи — вивчення антагоністичної активності пробіотичних штамів мікроорганізмів, іммобілізованих в альгінатному гелі без домішок і з домішками кріозахисних компонентів, після зберігання за різних низьких температур. Об'єкти і методи дослідження. Пробіотичні штами *Escherichia coli* (*E. coli* M-17), *Lactobacillus acidophilus* IMB B-2637 (*L. acidophilus*), *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-505 (*S. cerevisiae*) були іммобілізовані в гранулах 1% альгінатного гелю без домішок та з додаванням лактози (10%), сахарози (10%), захисного середовища сахароза, молоко знежирене, лактоза кінцева концентрація в гелі лактози – 1%, сахарози – 5%, молока знежиреного – 5% v/v, молока знежиреного – 5% v/v. Зразки заморозували до -20, -40, -75°C у холодильних камерах. Зразки, які зберігали за температури -196°C, спочатку охолоджували до -40°C із швидкістю 1 град./хв., потім переносили у рідкий азот. Зберігали зразки за вказаних температур протягом 24 міс. Відігрівали зразки на водяній бані при 30°C. Гранули розчиняли у 4% розчині етилендіамінтетраоцтова кислота. Життєздатність клітин визначали «чашковим» методом Коха по здатності до колонієутворення. Антагоністичну активність *E. coli* M-17 та *L. acidophilus* по відношенню до тест-штамів бактерій вивчали методом відстроченого антагонізму. Антагоністичну активність *S. cerevisiae* по відношенню до усіх тест-штамів (бактерій та *C. albicans*) та антагоністичну активність *E. coli* M-17 по відношенню до тест-штаму *C. albicans* вивчали за модифікованим методом двошарового середовища із визначенням мінімальної інгібуючої концентрації антагоніста. Встановлено, що іммобілізація в альгінатному гелі без домішок та з домішками кріозахисних компонентів і зберігання протягом 24 місяців за температур -20, -40, -75, -196°C не впливали на спектр та вираженість антагоністичної дії пробіотиків. Це свідчить про те, що іммобілізація у гелі та зберігання за низьких температур не викликають в життєздатних клітинах пошкодження генетичних структур, які детермінують хімічні та біохімічні реакції, продукти яких забезпечують антагоністичну дію пробіотиків.

Ключові слова: пробіотики, іммобілізація, альгінатний гель, низькотемпературне збереження, антагоністична активність.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дане дослідження є частиною відомчої (НАН України) науково-дослідної роботи «Вивчення механізмів кріопошкодження мікроорганізмів, іммобілізованих в гелевих носіях з різними фізико-хімічними властивостями, під час низькотемпературного зберігання та ліофілізації», № державної реєстрації 0118U001187.

Вступ

Іммобілізовані в гелевих носіях пробіотики та симбіотики набувають широкого розповсюдження в сфері виробництва медичних і ветеринарних пробіотичних препаратів та лікувально-профілактичних продуктів харчування [1]. Гелеві носії захищають мікробні клітини від пошкоджуючої дії природних захисних бар'єрів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та забезпечують транспортування в певні ділянки слизової кишечника живих клітин пробіотичних штамів мікроорганізмів [2].

Однією із складових технологій виготовлення і застосування препаратів та продуктів, які містять живі мікроорганізми, є їх довгострокове зберігання. У світовій практиці для зберігання мікроорганізмів найбільш часто використовують низькі температури і ліофілізацію [3]. Методи довгострокового зберігання іммобілізованих в гелевих носіях мікроорганізмів знаходяться в стані розробки.

Здатність до колонізації кишечника пробіотичними штамми мікроорганізмів в значній мірі залежить від високих адгезивних та антагоністичних властивостей [4]. Відповідно, процедура іммобілізації, склад гелевих носіїв та методи довгострокового зберігання повинні забезпечувати

збереженість життєздатності, адгезивних та антагоністичних властивостей іммобілізованих клітин пробіотиків. Було показано, що іммобілізація в альгінатному гелі без домішок та в гелі з домішками дисахаридів, захисного середовища, яке містить сахарозу – 5%, молоко знежирене – 5% (v/v) і лактозу – 1% (СМЛ), знежиреного молока та зберігання за різних низьких температур не впливали на адгезивні властивості пробіотичних штамів мікроорганізмів [5]. Вплив вказаних вище чинників на антагоністичні властивості іммобілізованих пробіотиків не вивчали.

Мета дослідження

Дослідити антагоністичну активність пробіотичних штамів мікроорганізмів, іммобілізованих в альгінатному гелі без домішок та з домішками кріозахисних компонентів, після зберігання за різних низьких температур.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктами дослідження були пробіотичні штами мікроорганізмів *Escherichia coli* M-17 (далі *E. coli* M-17), *Lactobacillus acidophilus* IMB B-2637 (далі *L. acidophilus*), *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-505 (далі *S. cerevisiae*). Штам *E. coli* M-17 був отриманий із Всеросійської колек-

ції промислових мікроорганізмів НДЦ «Курчатівський інститут» – «ГосНИИгенетика» (Москва, РФ), *L. acidophilus* та *S. cerevisiae* – із Депозитарію мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України (Київ, Україна).

Умови вирощування мікроорганізмів, іммобілізації клітин в гелевих гранулах, заморожування і зберігання зразків за температур -20, -40, -75, -196°C, розчинення гелевих гранул і відмивання клітин від гелю та ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота), визначення життєздатності клітин описані у роботі [5].

Клітини мікроорганізмів були іммобілізовані в гелевих гранулах наступного складу:

№1: 1% альгінатний гель без домішок;

№2: 1% альгінатний гель + 10% лактози;

№3: 1% альгінатний гель + 10% сахарози;

№4: 1% альгінатний гель + середовище СМЛ (кінцева концентрація лактози – 1%, сахарози – 5%, молока – 5% (v/v));

№5: 1% альгінатний гель + 5% молока (v/v).

Кінцева концентрація мікробних клітин в гелях становила 10^9 кл/мл.

Антагоністичну активність *E. coli M-17* та *L. acidophilus* по відношенню до тест-штамів умовно-патогенних бактерій вивчали за методом відстроченого антагонізму [6]. Антагоністичну активність *S. cerevisiae* по відношенню до усіх тест-штамів та антагоністичну активність *E. coli M-17* та *L. acidophilus* по відношенню до тест-штаму *C. albicans* вивчали за модифікованим методом двошарового середовища із визначенням мінімальної інгібуючої концентрації антагоніста (МІКА) [7]. Під час визначення антагоністичної активності *L. acidophilus* по відношенню до тест-штамів бактерій використовували агаризовані живильні середовища Гаузе № 2 та МРС-5 [6] відповідно. Для визначення антагоністичної активності *E. coli M-17* та *L. acidophilus* по відношенню до тест-штаму *C. albicans* для нижнього шару використовували середовища Гаузе № 2 та МРС-5, а для поверхневого шару – агаризоване середовище Сабуро (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd, India). Під час визначення антагоністичної активності *S. cerevisiae* для нижнього шару використовували агаризоване середовище УЕРД [8], для верхнього шару – «Nutrient agar» та середовище Сабуро (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd, India). Чашки Петрі з посівами *L. acidophilus* культивували у мікроаерофільних умовах. Були використані наступні тест-штами мікроорганізмів: *Staphilococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* 0157, *Shigella flexneri* 170, *Shigella sonnei* 5063, *Proteus mirabilis* H-237, *Proteus vulgaris* 177, *Candida albicans* ATCC 10231 (далі *S. aureus*, *E. coli*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *C. albicans*). Усі штами отримані із колекції мікроорганізмів Державної

установи «Інститут мікробіології і імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» (Харків). Під час визначення антагоністичної активності із кожного зразку проводили по 6 паралельних посівів.

Під час статистичної обробки експериментальних даних обчислювали їх середнє арифметичне (M) і стандартне відхилення m. Результати подавали у вигляді $M \pm m$ [9]. Для визначення статистичної достовірності відсутності або наявності відмінностей у двох різних наборах отриманих числових характеристик використовували t-критерій Ст'юдента: якщо обчислене значення критерію перевищувало критичне (табличне) значення на рівні значущості $p < 0,05$, то відмінності, що спостерігалися, вважали статистично достовірними на відповідному рівні ($p < 0,05$). Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою пакету програм MS Excel, а також програми «Statistica 6.0».

Результати дослідження та їх обговорення

Встановлено, що процес іммобілізації в гелевих носіях, додавання до альгінатного гелю зачисних домішок (дисахариди, середовище СМЛ, молоко) та наступне зберігання протягом 24 місяців за температур -20, -40, -75, -196°C не впливали на спектр та вираженість антагоністичної дії пробіотичних штамів *E. coli M-17*, *L. acidophilus*, *S. cerevisiae*. Зони затримки росту тест-штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів пробіотиками та мінімальні інгібуючі концентрації пробіотиків достовірно не відрізнялися від аналогічних показників вільних клітин пробіотиків до іммобілізації та зберігання за низьких температур (табл. 1, 2, 3, 4).

В основі антагоністичної дії пробіотиків лежать метаболіти пробіотиків, які чинять пряму мікробіцидну дію, та стимуляція різними механізмами неспецифічних імунних факторів ШКТ [10]. До метаболітів, від яких залежить спектр та вираженість антагоністичної дії пробіотиків, відносять молочну та оцтову кислоти, пероксид водню, бактеріоцини, високоактивні ферменти нуклеїнового обміну, органічні жирні кислоти [11].

Раніше було показано, що частина іммобілізованих в гелевих носіях клітин пробіотиків гинула під час зберігання за температур -20, -40, -75°C. Кількість клітин, які загинули, залежала від складу гелю, температури і термінів зберігання [5]. Представлені в даному дослідженні результати свідчать, що в клітинах, які залишилися життєздатними, зберігалися непошкодженими генетичні структури, що детермінують хімічні та біохімічні процеси, продуктами яких є вказані вище метаболіти. Відповідно, при умові забезпечення в процесі зберігання певної кількості життєздатних клітин («репродуктивна доза») [12], іммобілізовані в альгінатному гелі без додавання та з додаванням кріозахисних домішок пробіотики будуть виказувати терапевтичну дію.

Таблиця 1.

Антагоністична активність пробіотичного штаму *Escherichia coli* M-17 після іммобілізації в гелевих носіях і зберігання протягом 24 міс. за різних низьких температур.

Тест-штами бактерій	Температура зберігання, град. С	Зони затримки росту тест-штамів (в мм) після зберігання іммобілізованого пробіотика протягом 24 міс. (n=6).				
		Гель №1 М±m	Гель №2 М±m	Гель №3 М±m	Гель №4 М±m	Гель №5 М±m
S. aureus	-20°C	8 ± 1,2	8 ± 1,1	8 ± 1,4	8 ± 1,2	8 ± 1,3
	-40°C	8 ± 1,4	8 ± 1,6	8 ± 1,7	8 ± 1,6	8 ± 0,9
	-75°C	8 ± 1,0	8 ± 0,9	8 ± 1,5	8 ± 1,2	8 ± 1,5
	-196°C	8 ± 1,1	8 ± 1,3	8 ± 1,9	8 ± 1,4	8 ± 1,9
E. coli	-20°C	18 ± 1,5	18 ± 1,2	18 ± 1,1	18 ± 1,4	18 ± 1,7
	-40°C	18 ± 1,7	18 ± 1,1	18 ± 1,4	18 ± 1,3	18 ± 1,3
	-75°C	18 ± 1,4	18 ± 1,7	18 ± 1,2	18 ± 1,8	18 ± 1,7
	-196°C	18 ± 1,5	18 ± 1,4	18 ± 1,9	18 ± 1,1	18 ± 1,8
S. flexneri	-20°C	25 ± 1,9	25 ± 1,9	18 ± 1,1	18 ± 1,4	18 ± 1,9
	-40°C	25 ± 1,2	25 ± 2,0	18 ± 1,5	18 ± 1,5	18 ± 1,6
	-75°C	25 ± 1,2	25 ± 1,5	25 ± 0,9	25 ± 1,1	25 ± 2,1
	-196°C	25 ± 1,3	25 ± 1,7	25 ± 1,3	25 ± 1,6	25 ± 1,8
S. sonnei	-20°C	22 ± 1,5	22 ± 1,1	22 ± 1,6	22 ± 1,7	22 ± 1,7
	-40°C	22 ± 1,6	22 ± 1,8	22 ± 1,2	22 ± 1,4	22 ± 1,6
	-75°C	22 ± 1,8	22 ± 1,7	22 ± 1,4	22 ± 1,5	22 ± 1,3
	-196°C	22 ± 1,4	22 ± 2,1	22 ± 1,8	22 ± 1,8	22 ± 1,9
P. mirabilis	-20°C	25 ± 1,9	25 ± 1,3	25 ± 1,4	25 ± 1,4	25 ± 1,1
	-40°C	25 ± 1,2	25 ± 1,8	25 ± 1,7	25 ± 1,3	25 ± 1,5
	-75°C	25 ± 1,5	25 ± 1,4	25 ± 1,9	25 ± 1,7	25 ± 1,4
	-196°C	25 ± 1,9	25 ± 2,0	25 ± 2,0	25 ± 1,9	25 ± 1,7
P. vulgaris	-20°C	18 ± 1,5	18 ± 1,6	18 ± 1,8	18 ± 1,6	18 ± 1,9
	-40°C	18 ± 1,6	18 ± 1,9	18 ± 1,1	18 ± 2,0	18 ± 2,0
	-75°C	18 ± 1,8	18 ± 1,3	18 ± 1,4	18 ± 1,5	18 ± 1,4
	-196°C	18 ± 1,4	18 ± 1,5	18 ± 1,2	18 ± 1,9	18 ± 1,5

Примітка: – зони затримки тест-штамів вільними клітинами *E. coli* M-17 до іммобілізації та заморожування (контроль) становили для *S. aureus* 8 ± 1,4 мм; для *E. coli* 18 ± 1,8 мм; для *S. flexneri* 25 ± 1,4 мм; для *S. sonnei* 22 ± 1,9 мм; для *P. mirabilis* 25 ± 1,6 мм; для *P. vulgaris* 18 ± 1,2 мм.
– усі відмінності не достовірні по відношенню до контролю (p>0,05).

Таблиця 2.

Антагоністична активність пробіотичного штаму *Lactobacillus acidophilus* IMB B-2637 після іммобілізації в гелевих носіях і зберігання протягом 24 міс. за різних низьких температур.

Тест-штами бактерій	Температура зберігання, град. С	Зони затримки росту тест-штамів (в мм) після зберігання іммобілізованого пробіотика протягом 24 міс.				
		Гель №1 М±m	Гель №2 М±m	Гель №3 М±m	Гель №4 М±m	Гель №5 М±m
S. aureus	-20°C	24 ± 1,8	24 ± 1,2	24 ± 1,6	24 ± 0,8	24 ± 1,8
	-40°C	24 ± 1,5	24 ± 1,8	24 ± 1,8	24 ± 0,7	24 ± 2,1
	-75°C	26 ± 2,0	24 ± 1,6	24 ± 0,9	24 ± 1,5	24 ± 1,5
	-196°C	24 ± 1,7	24 ± 1,5	24 ± 1,1	24 ± 1,1	24 ± 1,9
E. coli	-20°C	22 ± 1,5	22 ± 1,2	22 ± 1,5	22 ± 1,3	22 ± 1,8
	-40°C	22 ± 2,0	22 ± 1,2	22 ± 1,7	22 ± 1,8	22 ± 1,6
	-75°C	21 ± 2,1	22 ± 1,5	22 ± 1,8	22 ± 1,2	22 ± 0,7
	-196°C	22 ± 2,1	22 ± 2,1	22 ± 1,3	22 ± 1,3	22 ± 1,4
S. flexneri	-20°C	24 ± 1,3	24 ± 1,3	24 ± 0,8	24 ± 1,6	24 ± 1,8
	-40°C	24 ± 1,9	24 ± 1,6	24 ± 1,1	24 ± 1,7	24 ± 1,6
	-75°C	24 ± 2,0	25 ± 1,8	24 ± 1,4	24 ± 1,4	24 ± 1,4
	-196°C	24 ± 2,1	24 ± 2,0	24 ± 1,8	24 ± 1,1	24 ± 1,7
S. sonnei	-20°C	24 ± 1,7	24 ± 1,1	24 ± 1,1	24 ± 1,3	24 ± 2,0
	-40°C	24 ± 1,9	24 ± 1,5	24 ± 1,5	24 ± 1,1	24 ± 1,7
	-75°C	24 ± 1,5	24 ± 1,4	24 ± 0,8	24 ± 1,7	24 ± 1,8
	-196°C	24 ± 1,7	23 ± 2,2	24 ± 1,7	23 ± 2,2	24 ± 1,9
P. mirabilis	-20°C	26 ± 1,5	26 ± 1,7	26 ± 2,0	26 ± 2,1	27 ± 1,8
	-40°C	25 ± 2,3	26 ± 1,8	25 ± 2,3	26 ± 1,4	26 ± 1,4
	-75°C	26 ± 1,7	26 ± 1,6	26 ± 1,4	26 ± 1,5	26 ± 1,5
	-196°C	26 ± 1,5	26 ± 1,4	26 ± 1,5	26 ± 1,8	26 ± 1,8
P. vulgaris	-20°C	28 ± 1,2	28 ± 1,2	28 ± 1,7	28 ± 1,4	28 ± 2,0
	-40°C	28 ± 2,1	28 ± 2,3	28 ± 1,3	28 ± 1,1	28 ± 1,7
	-75°C	28 ± 1,9	28 ± 2,2	28 ± 1,6	28 ± 1,3	28 ± 1,9
	-196°C	28 ± 1,7	28 ± 1,5	28 ± 1,5	28 ± 1,9	28 ± 1,5

Примітка: – зони затримки тест-штамів вільними клітинами *L. acidophilus* до іммобілізації та заморожування (контроль) становили для *S. aureus* 24 ± 1,5 мм; для *E. coli* 22 ± 1,9 мм; для *S. flexneri* 24 ± 1,3 мм; для *S. sonnei* 24 ± 1,8 мм; для *P. mirabilis* 26 ± 1,1 мм; для *P. vulgaris* 28 ± 1,5 мм.
– усі відмінності не достовірні по відношенню до контролю (p>0,05).

Таблиця 3.
Антагоністична активність пробіотичних штамів *Escherichia coli* M-17 та *Lactobacillus acidophilus* IMB B-2637 по відношенню до тест-штаму *S. albicans* після іммобілізації в гелевих носіях і зберігання протягом 24 міс. за різних низьких температур.

Пробіотик	Температура зберігання, град. С	МІКА (lg КУО/мл) пробіотичних штамів після іммобілізації і зберігання протягом 24 міс.				
		Гель №1 М±m	Гель №2 М±m	Гель №3 М±m	Гель №4 М±m	Гель №5 М±m
<i>E. coli</i> M-17	-20°C	7,4±0,03	7,2±0,04	7,5±0,02	7,3±0,04	7,4±0,05
	-40°C	7,1±0,03	7,2±0,01	7,3±0,06	7,5±0,05	7,4±0,04
	-80°C	7,5±0,05	7,3±0,06	7,5±0,04	7,4±0,07	7,3±0,03
	-196°C	7,1±0,03	7,2±0,04	7,1±0,05	7,5±0,02	7,4±0,03
<i>L. acidophilus</i>	-20°C	2,4±0,04	2,4±0,06	2,4±0,07	2,3±0,08	2,4±0,07
	-40°C	2,5±0,08	2,5±0,04	2,5±0,04	2,5±0,04	2,5±0,03
	-80°C	2,6±0,05	2,5±0,05	2,5±0,03	2,4±0,05	2,5±0,04
	-196°C	2,5±0,04	2,6±0,03	2,5±0,04	2,5±0,03	2,5±0,02

Примітка: – МІКА вільних клітин *E. coli* M-17 для *S. albicans* до іммобілізації та заморожування (контроль) становила 7,4 ± 0,06 lg КУО/мл;
– МІКА вільних клітин *L. acidophilus* для *S. albicans* до іммобілізації та заморожування (контроль) становила 2,5 ± 0,04 lg КУО/мл;
– КУО: колонієутворюючі одиниці;
– усі відмінності не достовірні по відношенню до контролю ($p > 0,05$).

Таблиця 4.
Антагоністична активність пробіотичного штаму *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-505 після іммобілізації в гелевих носіях і зберігання протягом 24 міс. за різних низьких температур.

Тест-штами бактерій	Температура зберігання, град. С	МІКА (lg КУО/мл) пробіотичних штамів після іммобілізації і зберігання протягом 24 міс.				
		Гель №1 М±m	Гель №2 М±m	Гель №3 М±m	Гель №4 М±m	Гель №5 М±m
<i>S. aureus</i>	-20°C	6,3±0,07	6,4±0,05	6,4±0,04	6,5±0,03	6,4±0,04
	-40°C	6,4±0,08	6,4±0,05	6,4±0,05	6,4±0,07	6,3±0,05
	-75°C	6,4±0,04	6,4±0,07	6,3±0,08	6,5±0,04	6,4±0,08
	-196°C	6,4±0,08	6,4±0,09	6,3±0,04	6,4±0,05	6,3±0,04
<i>E. coli</i>	-20°C	3,1±0,05	3,1±0,08	3,1±0,03	3,2±0,1	3,1±0,08
	-40°C	3,1±0,06	3,2±0,04	3,1±0,05	3,2±0,07	3,1±0,08
	-75°C	3,2±0,08	3,2±0,08	3,1±0,04	3,2±0,04	3,1±0,04
	-196°C	3,2±0,09	3,1±0,04	3,2±0,07	3,1±0,05	3,3±0,12
<i>S. flexneri</i>	-20°C	3,4±0,03	3,5±0,06	3,6±0,1	3,5±0,04	3,4±0,1
	-40°C	3,5±0,05	3,5±0,02	3,4±0,1	3,4±0,04	3,5±0,1
	-75°C	3,5±0,08	3,4±0,09	3,4±0,1	3,5±0,07	3,5±0,06
	-196°C	3,4±0,09	3,4±0,07	3,5±0,04	3,5±0,04	3,5±0,08
<i>S. sonnei</i>	-20°C	3,2±0,04	3,2±0,1	3,2±0,02	3,2±0,04	3,2±0,07
	-40°C	3,4±0,09	3,2±0,1	3,4±0,09	3,2±0,01	3,2±0,04
	-75°C	3,3±0,07	3,2±0,08	3,2±0,06	3,2±0,1	3,2±0,05
	-196°C	3,2±0,04	3,2±0,06	3,1±0,04	3,2±0,1	3,2±0,04
<i>P. mirabilis</i>	-20°C	4,1±0,05	4,1±0,08	4,0±0,1	4,1±0,04	4,1±0,1
	-40°C	4,2±0,08	4,1±0,05	4,2±0,1	4,0±0,08	4,2±0,1
	-75°C	4,1±0,06	4,2±0,1	4,1±0,1	4,1±0,06	4,2±0,1
	-196°C	4,3±0,1	4,1±0,03	4,1±0,06	4,1±0,05	4,1±0,1
<i>P. vulgaris</i>	-20°C	4,4±0,06	4,4±0,05	4,3±0,1	4,3±0,04	4,5±0,03
	-40°C	4,4±0,03	4,4±0,05	4,3±0,1	4,5±0,05	4,4±0,07
	-75°C	4,5±0,09	4,6±0,05	4,5±0,05	4,5±0,04	4,4±0,07
	-196°C	4,4±0,07	4,4±0,03	4,4±0,08	4,4±0,09	4,4±0,04
<i>C. albicans</i>	-20°C	3,2±0,1	3,2±0,1	3,2±0,06	3,3±0,1	3,3±0,07
	-40°C	3,3±0,07	3,2±0,08	3,2±0,05	3,3±0,1	3,3±0,08
	-75°C	3,3±0,05	3,3±0,06	3,2±0,04	3,3±0,1	3,5±0,2
	-196°C	3,3±0,08	3,3±0,08	3,4±0,05	3,4±0,1	3,3±0,03

Примітка: – МІКА вільних клітин *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-505 до іммобілізації та заморожування (контроль) становила для *S. aureus* 6,4 ± 0,09; для *E. coli* 3,1 ± 0,07; для *S. flexneri* 3,5 ± 0,04; для *S. sonnei* 3,2 ± 0,05; для *P. mirabilis* 4,1 ± 0,08; для *P. vulgaris* 4,4 ± 0,08; для *C. albicans* 3,3 ± 0,05;
– КУО: колонієутворюючі одиниці;
– усі відмінності не достовірні по відношенню до контролю ($p > 0,05$).

Висновки

Процес іммобілізації в гранулах альгінатного гелю, додавання до складу гелю криопротективних домішок (дисахариди, знежирене молоко, середовище СМЛ) та наступне зберігання протягом 24 місяців за температур -20, -40, -75, -196°C

не визивають змін спектру та вираженості антагоністичної активності пробіотичних штамів *E. coli* M-17, *L. acidophilus*, *S. cerevisiae*.

Перспективи подальших досліджень

Отримані результати можуть бути використаними в розробці технологій виготовлення та ре-

алізації пробіотичних препаратів і лікувально-профілактичних продуктів харчування на основі іммобілізованих клітин пробіотиків.

Література

1. Yoha KS, Nida S, Dutta S, et al. Targeted delivery of probiotics: perspectives on research and commercialization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2021; 14(1): 1-34.
2. Mitropoulou G, Nedovic V, Goyal A, Kourkoutas Y. Immobilization technologies in probiotic food production. *J Nutr Metab*. 2013;2013:716861.
3. Pohilenko VD, Baranov AM, Detushev KV. Metody dlitel'nogo hraneniya kolekcionnykh kul'tur mikroorganizmov i tendencii razvitiya [Methods of long-term storage of collectible cultures of microorganisms and development trends]. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenij. Povolzhskij region. Medicinskie nauki*. 2009; 4(12): 99–121. (Russian).
4. Alexander KL, Targan SR, Elson ChO. Microbiota activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2014. Jul;260(1):206-20.
5. Visekantsev IP, Petrov IV, Buryak IA, Martsenyuk VP. Zhiznedatnist' ta adgeziya do eritrocytiv lyudini probiotichnihshhtamiv mikroorganizmiv pislya immobilizacii v al'ginatnomu geli i zberigannya za riznih niz'kih temperature [Viability and adhesion to human erythrocytes of probiotic strains of microorganisms after immobilization in alginate gel and storage at various low temperatures]. *Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visnyk Ukrainy's'koyi medychnoyi stomatolohichnoyi akademiyi*. 2020; 20(4):115-124. (Ukrainian).
6. Ministry of Health of the Russian Federation. [Manufactured probiotic strains and probiotic control strains. General

7. Pharmacopoeia Monograph]. GPhM.1.7.2.0012.15. [Internet] 2016 Sep [Cited 07.02.2022]; 49p. Available from: <https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/09/OFS.1.7.2.0012.15-Proizvodstvennye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov.pdf>
8. Patent RF, MPK C 12 Q1/08, C 12 N1/20. Sposob ocenki antagonistscheskoj aktivnosti molochnokislykh bakterij i bakterij kishechnoj gruppy k patogennym mikobakteriyam s ispol'zovaniem dvuhslojnoj sredy [Method for assessing the antagonistic activity of lactic acid bacteria and bacteria of the intestinal group to pathogenic mycobacteria using a two-layer medium]. / Lazovskaya AL, Vorob'eva ZG, Slinina KN i dr. zayavl. 27.06.2006; opubl. 20.02.2008, Byul. №5 (Russian)
9. Murthy MS, Rao BS, Reddy NM, Subrahmanyam P, Madhvanath U. Non-equivalence of YEPD and synthetic complete media in yeast reversion studies. *Mutation Research*. 1975; 27(2): 219-223.
10. Mironov AN, redaktor. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv [Guidelines for conducting preclinical trials of drugs]. M: Grif i K; 2012. Part I; 944 s. (Russian)
11. Drannik GN, Kurchenko AI, Drannik AG. Immunnaya sistema slizistykh, fiziologicheskaya mikroflora i probiotiki [Mucosal immune system, physiological microflora and probiotics]. K: Poligraf plyus; 2009. 143 s. (Russian)
12. Tkachenko EI, Suvorova AN, redaktors. Disbioz kishechnika. Rukovodstvo po diagnostike i lecheniyu [Intestinal dysbiosis. Guide to diagnosis and treatment]. SPB: InformMed; 2009. 276 s. (Russian)
13. Chernyavskij VI, Biryukova SV, Volyanskij AYU, et al. Mikrobiota i disbioz [Microbiota and dysbiosis]. Uchebnoe posobie. Har'kov: Stil'-izdat; 2018. 65 s. (Ukrainian).

Реферат

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРОБИОТИКОВ ПОСЛЕ ХРАНЕНИЯ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Петров И. В., Высеканцев И. П., Черкашина Я. О., Нардид Э. О.

Ключевые слова: пробиотики, иммобилизация, альгинатный гель, хранение при низких температурах, антагонистическая активность.

Представленные в публикации результаты являются частью исследований, посвященных разработке технологий долгосрочного хранения иммобилизованных в гелевых носителях клеток пробиотиков. Цель исследования — изучение антагонистической активности пробиотических штаммов микроорганизмов, иммобилизованных в альгинатном геле без добавок и с добавлением криозащитных компонентов, после хранения при разных низких температурах. Объекты и методы исследования. Пробиотические штаммы *Escherichia coli M-17* (*E. coli M-17*), *Lactobacillus acidophilus IMB B-2637* (*L. acidophilus*), *Saccharomyces cerevisiae IMB Y-505* (*S. cerevisiae*) были иммобилизованы в гранулах 1% альгинатного геля без добавок и с добавлением лактозы (10%), сахарозы (10%), защитной среды сахароза, молоко обезжиренное, лактоза: конечная концентрация в геле лактозы – 1%, сахарозы – 5%, молока обезжиренного – 5% v/v), молока обезжиренного – 5% v/v. До температур -20, -40, -75°C образцы замораживали в холодильных камерах. Образцы, которые хранили при температуре -196°C, сначала охлаждали до -40°C со скоростью 1 град./мин., затем переносили в жидкий азот. Хранили образцы при указанных температурах в течение 24 мес. Отогревали образцы на водяной бане при 30°C. Гранулы растворяли в 4% растворе этилендиаминтетрауксусная кислота. Жизнеспособность клеток определяли «чашечным» методом Коха по способности к колониеобразованию. Антагонистическую активность *E. coli M-17* и *L. acidophilus* по отношению к тест-штаммам бактерий изучали методом отсроченного антагонизма. Антагонистическую активность *S. cerevisiae* по отношению ко всем тест-штаммам (бактериям и *C. albicans*) и антагонистическую активность *E. coli M-17* по отношению к тест-штамму *C. albicans* изучали модифицированным методом с использованием двухслойной среды с определением минимальной ингибирующей концентрации. Установлено, что иммобилизация в альгинатном геле без добавок и с добавлением криозащитных компонентов и хранение в течение 24 месяцев при температурах -20, -40, -75, -196°C не влияли на спектр и выраженность антагонистического действия пробиотиков. Это свидетельствует о том, что иммобилизация в геле и хранение при низких температурах не вызывают в жизнеспособных клетках повреждений генетических структур, которые детерминируют химические и биохимические реакции, продукты которых обеспечивают антагонистическое действие пробиотиков.

Summary

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF IMMOBILIZED PROBIOTICS STORED AT LOW TEMPERATURES

Petrov I. V., Vysekantsev I. P., Cherkashyna Ya. O., Nardid E. O.

Key words: probiotics, immobilization, alginate gel, storage at low temperatures, antagonistic activity.

The results presented in this article contribute to the research devoted to the development of technologies for the long-term storage of probiotic cells immobilized in gel carriers. The purpose of this study is to investigate the antagonistic activity of probiotic strains of microorganisms immobilized in alginate gel without additives and with the addition of cryoprotective components after the storage at different low temperatures. Objects and methods. Probiotic strains of *Escherichia coli* M-17 (*E. coli* M-17), *Lactobacillus acidophilus* IMB B-2637 (*L. acidophilus*), *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-505 (*S. cerevisiae*) were immobilized in granules of 1% alginate gel without additives and with the addition of lactose (10%), sucrose (10%), LSM protective medium (final concentration in the gel of lactose was 1%, sucrose - 5%, skimmed milk - 5% v/v). To temperatures of -20, -40, -75°C, the sample freezing was performed at -20, -40, -75°C in freezing cabinets. The samples kept at -196°C, were first cooled to -40°C at a rate of 1 deg/min, and then transferred into liquid nitrogen. The samples were stored at this temperature regimen for 24 months. The samples were allowed to thaw in a water bath at 30°C. The granules were dissolved in a 4% EDTA solution. Cell viability was determined by the Koch "cup" method according to the ability to colony formation. The antagonistic activity of *E. coli* M-17 and *L. acidophilus* against test strains of bacteria was studied by the method of delayed antagonism. The antagonistic activity of *S. cerevisiae* against all test strains (bacteria and *C. albicans*) and the antagonistic activity of *E. coli* M-17 against the test strain *C. albicans* were studied by a modified method using a two-layer medium with the determination of the minimum inhibitory concentration. It was established that immobilization in alginate gel without additives and with the addition of cryoprotective components and storage for 24 months at temperatures of -20, -40, -75, -196°C did not affect the spectrum and severity of the antagonistic action of probiotics. This indicates that immobilization in a gel and storage at low temperatures do not cause damage in viable cells to genetic structures that determine chemical and biochemical reactions, which products provide the antagonistic probiotic effects.