

УДК: 579.67 + 615.282

© Е. П. Рыжкова, И. В. Данилова, И. Л. Шамрайчук, А. В. Кураков, А. И. Нетрусов

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII* И ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *LACTOBACILLUS*RYZHKOVA E. P., DANILOVA I. V., SHAMRAICHUK I. L., KURAKOV A. V.,
NETRUSOV A. I. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII*
AND SEVERAL *LACTOBACILLUS* SPECIESМосковский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
repyz4748@gmail.com

Дана сравнительная оценка антифунгальной активности *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf (ВКПМ В-9654) и семи штаммов бактерий из рода *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*). Культуральная жидкость *Propionibacterium freudenreichii* ВКПМ В-9654 обладала значительно более сильным противогрибным действием, чем таковая штаммов лактобацилл. Наиболее чувствительными к ее действию были дрожжевые грибы *Debariomyces hansenii*, затем представители мицелиальных микромицетов родов *Penicillium* и *Aspergillus*, а наиболее устойчивым был штамм *Geotrichum candidum*. Максимальную активность в подавлении грибов из лактобацилл проявил штамм *Lactobacillus brevis* 5. Антифунгальная активность культуральных жидкостей *Propionibacterium freudenreichii* и *Lactobacillus brevis*, взятых в соотношении 1 : 1, превосходила таковую *Propionibacterium freudenreichii* и *Lactobacillus brevis*, взятых по отдельности.

Ключевые слова: *Propionibacterium freudenreichii*, молочнокислые бактерии, антифунгальная активность, пропионовая кислота.

Comparative assessment of antifungal activity of *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf VKPM B-9654 and seven strains of *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*) was done. Cultural liquid of *Propionibacterium freudenreichii* VKPM B-9654 had a much stronger antifungal effect than the strains of *Lactobacillus*. The yeast *Debariomyces hansenii* were the most sensitive to its action, the following mycelial micromycetes of genera *Penicillium* and *Aspergillus* were and the strain of *Geotrichum candidum* was most resistant. The strain of *Lactobacillus brevis* 5 demonstrated the maximum inhibition activity to the fungi between the lactobacilli. Antifungal activity of cultural liquid (CL) *Propionibacterium freudenreichii* and *Lactobacillus brevis*, taken in the ratio 1 : 1 was superior than the CL *Propionibacterium freudenreichii* and *L. brevis* alone.

Key words: *Propionibacterium freudenreichii*, lactic acid bacteria, antifungal activity, propionic acid.

Для антимикробной защиты растительных кормов при доступе воздуха целесообразно применять источники биodeградебельных органических кислот микробиологического происхождения, таких как молочная, уксусная и пропионовая. Последняя действует не только при низких значениях pH (как недиссоциированная кислота), но и как соль в условиях, близких к нейтральным (Kung et al., 2004; Danilova et al., 2012). Пропионовокислые бактерии (ПКБ) — известные продуценты пропионовой кислоты в высоких концентрациях (Vorobyeva, 1995).

Штамм *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf (ВКПМ В-9654) является пробиотиком (Ryzhkova et al., 2015a), при этом он образует не только пропионовую

кислоту, но и бактериоциноподобные полипептиды, подавляющие грибы (Ryzhkova et al., 2017). Штамм RVS-13-slg (ВКПМ В-11325), полученный селекцией из предыдущего и введенный в готовый кисломолочный продукт, в 7 раз увеличивал его устойчивость к грибам-микромицетам, таким как *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. и др. (Ryzhkova et al., 2015b).

Поскольку указанные штаммы ПКБ — пробиотики, для защиты растительных кормов от поражения микроскопическими грибами следует вводить не чистые растворы пропионовой кислоты/пропионатов, а цельные культуры, содержащие клетки ПКБ. Пробиотические свойства бактерий — штаммоспецифичны. Поэтому данную работу проводили с конкретным

штаммом ПКБ, для которого пробиотический потенциал доказан (Ryzhkova et al., 2015a).

Однако остается вопрос об отношении разных грибов к перечисленным органическим кислотам. Чувствительность или толерантность микромицетов к органическим кислотам у разных грибов существенно отличается, что обусловлено наличием у них различных механизмов их детоксикации (Brock, Buckel, 2004; Doores, 2005). Органические кислоты проникают в мицелий через цитоплазматическую мембрану в недиссоциированной форме. Константы диссоциации (рКа) молочной (МК), уксусной (УК) и пропионовой (ПК) кислот составляют 3.08, 4.75 и 4.87 соответственно, т. е. пропионовая кислота сохраняет недиссоциированную форму при более высоком значении pH, чем другие кислоты (Doores, 2005). Главные экзометаболиты-антисептики МКБ и ПКБ — молочная, уксусная и пропионовая кислоты, действуют в присутствии других минорных по активности антимикробных соединений. По эффективности антимикробного действия кислоты располагаются в следующий ряд: молочная < уксусная < пропионовая кислота (Doores, 2005; Lind et al., 2005).

Известно, что силосы созревают под действием МКБ. Показано, что пропионовая кислота (0.1—0.2 %), введенная сама по себе или с инокулятом МКБ, эффективно способствует как созреванию силоса, так и его сохранности в аэробных условиях. При этом на один-два порядка снижается количество дрожжевых клеток в готовом продукте (Kung et al., 2004).

Цельные культуры ПКБ, выделяя помимо пропионовой кислоты/пропионатов множество полезных веществ, — нутрицевтиков (витамины группы В, незаменимые аминокислоты, бифидогенные факторы и др.), антиметаболитов, включая бактериоциноподобные полипептиды, и взаимодействуя с МКБ (Ryzhkova et al., 2015a, 2017), могут вносить существенный вклад в качество силосования кормов, увеличивая их кормовую ценность и сохранность. Отметим, что пропионовая кислота в концентрации примерно до 0.4 % изменений в органолептических свойствах продукта (в том числе и его аромата) не вызывает, а соли ПК (например, пропионат натрия) не меняют аромата продукта (Doores, 2005; Ryzhkova et al., 2015b). В то же время молочно-кислая бактерия *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, культивируемая предварительно на мучной среде, инициирует и стимулирует развитие штамма *Propionibacterium freudenreichii* и образование им летучих жирных кислот (Ryzhkova et al., 2009). В определенных условиях совместное использование штаммов лактобацилл и *P. freudenreichii* может также усиливать их антигрибную активность (Schwenninger et al., 2008). Все это свидетельствует о необходимости проведения детального изучения антигрибной активности пропионовых бактерий, причем пробиотических штаммов, и МКБ, в частности лактобацилл, и выяснения эффективности их действия на грибы при совместном применении.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение антифунгального действия штамма пробиотической пропионовокислой бактерии *P. freudenreichii*

RVS-4-irf (B-9654) с таковым у молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, а также исследование совместного действия данного штамма ПКБ и штамма *L. brevis* для рекомендаций в дальнейшем по их применению в защите материалов растительного происхождения от порчи грибами.

Материалы и методы

Штаммы и условия их поддержания. Использовали штамм классических пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf (International GenBank AC number EU418709), депонированный в ВКПМ под номером B-9654. Сокращенное обозначение — Pfr-4. Изучение его физиолого-биохимических свойств и идентификация были проведены ранее (Danilova et al., 2012). Для культивирования штамма использовали среду В следующего состава (г/л): глюкоза — 20.0, триптон — 10.0, дрожжевой экстракт — 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5.0, KH_2PO_4 — 1.5, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ — 0.1; микроэлементы (мг/л): $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 5.0 или $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ — 4.0, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.01, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.005; вода дистиллированная, pH 7.0.

Бактерии *Lactobacillus acidophilus* 146, *L. brevis* 5, *L. brevis* 78, *L. fermentum* 34, *L. plantarum* A 63 and *L. plantarum* 30 были взяты из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ; *L. casei* C1 — из коллекции ГосНИИ хлебопекарной промышленности. Их также поддерживали на среде В. Культуры Pfr-4 и лактобацилл выращивали при 30 °C в высоком слое среды при свободном доступе воздуха (Pfr-4 в течение 4 суток, лактобациллы в течение 3 суток). Ежедневно pH доводили до нейтрального значения с помощью стерильного 10%-го раствора NaHCO_3 . Пробирки с культурами хранили при 6 °C.

В качестве тест-культур грибов из коллекций кафедр микологии и альгологии и биологии почв МГУ были взяты штаммы *Aspergillus fumigatus* 102, *A. ochraceus* 121, *Debaryomyces hansenii* 4K, *Geotrichum candidum* 5K, *Penicillium chrysogenum* 2K, которые хранили на косяках с сусло-агаром (Maltax, Finland) при 6 °C.

Определение антифунгальной активности бактерий. Для получения спорых/дрожжевых суспензий тест-культуры грибов выращивали в течение 10 суток в зависимости от штамма при 28 °C в пробирках со скошенной твердой средой с сусло-агаром (СА, 3 °Б). Суспензию дрожжевых клеток или спор с отдельными фрагментами мицелия получали путем смыва стерильной водой с поверхности колоний на скошенной твердой среде и доводили разведением водой плотность суспензии до 10^5 клеток/мл. Подсчет концентрации клеток/спор осуществляли в камере Горяева или на основе измерения оптической плотности суспензии с учетом размера клеток.

Культуральную жидкость (КЖ, 0.1—1.0 мл) или культуру Pfr-4 (0.1—1.0 мл), суспензию (0.2 мл) дрожжевых клеток/спор грибов вносили в пробирки 15 × 1.5 см с жидкой глюкозо-дрожжевой минераль-

Таблица 1

Антифунгальное действие пропионовой, уксусной и молочной кислот на жидкой среде при pH 5.0

Тест-культура	МИК, mM		
	пропионовая кислота	уксусная кислота	молочная кислота
<i>Aspergillus fumigatus</i> 102	52	210	> 500
<i>A. ochraceus</i> 121	42	120	> 500
<i>Penicillium chrysogenum</i> 2K	52	120	> 500
<i>Geotrichum candidum</i> 5K	73	350	> 500
<i>Debariomyces hansenii</i> 4K	21	60	> 500

Примечание. Знак «>» указывает, что при данной концентрации молочной кислоты нет полного подавления роста гриба.

ной средой А (0.8 мл) следующего состава (г/л): глюкоза — 30.0, дрожжевой экстракт — 10.0, NaNO_3 — 3.0, KH_2PO_4 — 0.3, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.25, KCl — 0.25, FeSO_4 — 0.01, ZnSO_4 — 0.04, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 0.005; вода дистиллированная, pH 6.0. В контрольных вариантах вместо КЖ или культуры Pfr-4 вносили стерильную дистиллированную воду. Конечная концентрация спор или дрожжевых клеток при засеве была не менее 10^4 клеток/мл, что обеспечивало хороший рост грибов в контроле на 3-и сутки. Инкубацию проводили в течение 3 суток при 30 °C на качалке при 160—200 об./мин. Ингибирующее действие оценивали визуально, в том числе с помощью микроскопа, по наличию или отсутствию активного роста мицелия. Подавление роста дрожжевых тест-культур измеряли по изменению оптической плотности суспензий с помощью спектрофотометра Spescol 10 при $\lambda = 540$ нм ($l = 1.0$ см). Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) КЖ или цельной культуры в отношении грибов определяли как их наименьшие концентрации (общий %) в среде/продукте, достаточные для подавления развития микромицетов и дрожжей.

Определение антифунгальной активности КЖ 7 штаммов различных видов рода *Lactobacillus* проводили аналогично опытам с Pfr-4, но для анализа выбрали значение pH 5.0, при котором все грибы хорошо развивались. Для испытания использовали 3-суточные культуры. Степень ингибирования роста грибов лактобациллами и Pfr-4 при pH 5.0 в сравнении с контролем определяли по снижению веса выросших грибов после

сбора их биомассы на фильтрах Synpor 2 (Chemapol, Prague) и высушивания при 55 °C. Эффективность раздельного и совместного действия КЖ штаммов *L. brevis* 78 и Pfr-4 определяли при добавлении их с тест-культурами грибов в количестве 10 % от общего объема среды.

Для приготовления КЖ культуры лактобацилл и Pfr-4 центрифугировали при 6000 g 15 мин и стерилизовали фильтрованием (фильтры Synpor 6, Chemapol, Prague). Значение pH доводили до нужного показателя с помощью 5 или 10%-го растворов H_2SO_4 и 10%-го раствора NaHCO_3 .

Определение концентрации летучих жирных кислот (ЛЖК) в культуральной жидкости молочно-кислых и пропионовокислых бактерий. КЖ Pfr-4 и лактобацилл для анализа содержания в них ЛЖК получали центрифугированием культур (pH 2.0) при 28 000 g в течение 20 мин. Содержание ЛЖК определяли методом газовой хроматографии с помощью аппаратно-программируемого комплекса на базе газового хроматографа Chrom 4 (Чехия). Использовали колонку размером 1000 × 4 мм, заполненную полиэтиленгликоль-адипатом и содержащую хромосорб W. Скорость потока водорода в пламенно-ионизационном детекторе составляла 40 мл·мин⁻¹; температура — 240 °C (в испарителе) и 130 °C (в колонке). Газ-носитель (азот) подавали в колонку под давлением 70 кПа. Результаты хроматографии регистрировали и обрабатывали с помощью компьютерной программы.

Таблица 2

Концентрации пропионовой и уксусной кислот в среде как результат применения КЖ Pfr-4 в минимальных ингибирующих дозах (МИД) в отношении разных грибов (pH 5.0)

Тест-культура гриба	МИД, об. %	Пропионовая кислота, mM	Уксусная кислота, mM
<i>Aspergillus fumigatus</i> 102	> 50	> 28.5	> 15.5
<i>A. ochraceus</i> 121	50	28.5	15.5
<i>Penicillium chrysogenum</i> 2K	30	17.1	9.3
<i>Geotrichum candidum</i> 5K	> 50	> 28.5	> 15.5
<i>Debariomyces hansenii</i> 4K	40	22.5	12.4

Примечание. Знак «>» указывает, что при данной дозе КЖ/концентрации кислоты нет полного подавления роста гриба.

Определение антифунгального действия молочной, уксусной и пропионовой кислот при pH 5.0. Готовили ряд растворов пропионовой, молочной и уксусной кислот в концентрациях от 5 до 500 мМ. Для каждой концентрации pH 5.0 был достигнут добавлением серной кислоты. Для оценки их действия растворы испытуемых кислот (1.0 мл) смешивали с 0.2 мл суспензии тест-культур грибов и 0.8 мл жидкой среды А. В контрольных вариантах раствор кислоты заменяли на стерильную дистиллированную воду. Инкубацию проводили аналогично опытам с Pfr-4 и определяли МИК кислот (мМ) в среде по отсутствию роста грибов.

Все опыты проведены в 3 независимых повторностях. Данные, представленные в табл. 1 и 2, представляют собой медиану (Me) из 3—5 измерений с отклонением менее 10 %.

Результаты

Антифунгальная активность молочной, уксусной и пропионовой кислоты при pH 5.0 среды значительно различалась. Наиболее сильным подавляющим действием обладала пропионовая кислота (МИК 21—73 мМ), затем уксусная кислота — МИК в 3—5 раз выше (табл. 1). МИК молочной кислоты в отношении тест-культур грибов превышал 500 мМ. Представленные данные подтверждают ранее описанное влияние указанных органических кислот при подавлении роста грибов и свидетельствуют о наиболее выраженном

антифунгальном действии именно пропионовой кислоты.

Вместе с тем в настоящей работе в отношении тест-микробиоты была испытана антимикробная активность молочнокислых бактерий, которые являются традиционными культурами-консервантами пищевых и сельскохозяйственных продуктов.

Антифунгальная активность КЖ 7 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, принадлежащих к *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. fermentum* и *L. plantarum*, существенно различалась (рис. 1). Среди исследованных штаммов максимальную активность проявил *L. brevis* 5, который обеспечивал 55—85%-е ингибирование тест-культур грибов разных видов в сравнении с контролем. Штамм *L. plantarum* 30 оказался наименее активным, он подавлял рост только *Debaryomyces hansenii* (прирост биомассы снижался на 30 %). В целом наиболее устойчивым к действию культуральной жидкости лактобацилл оказался *Geotrichum candidum* (данные не приводятся), а самым чувствительным — *Debaryomyces hansenii*. Его рост ингибировала КЖ большинства штаммов лактобацилл, за исключением *Lactobacillus fermentum* 34. Полностью рост тест-культур грибов не подавлял ни один из испытанных штаммов лактобацилл даже при добавлении их КЖ в количестве 50 % от общего объема среды. Это вполне соответствует данным по уровню максимальной концентрации главного антифунгального агента — молочной кислоты в КЖ этих штаммов лактобацилл (1.0—2.0 %), что не позволяет достичь полного подавления роста грибов.

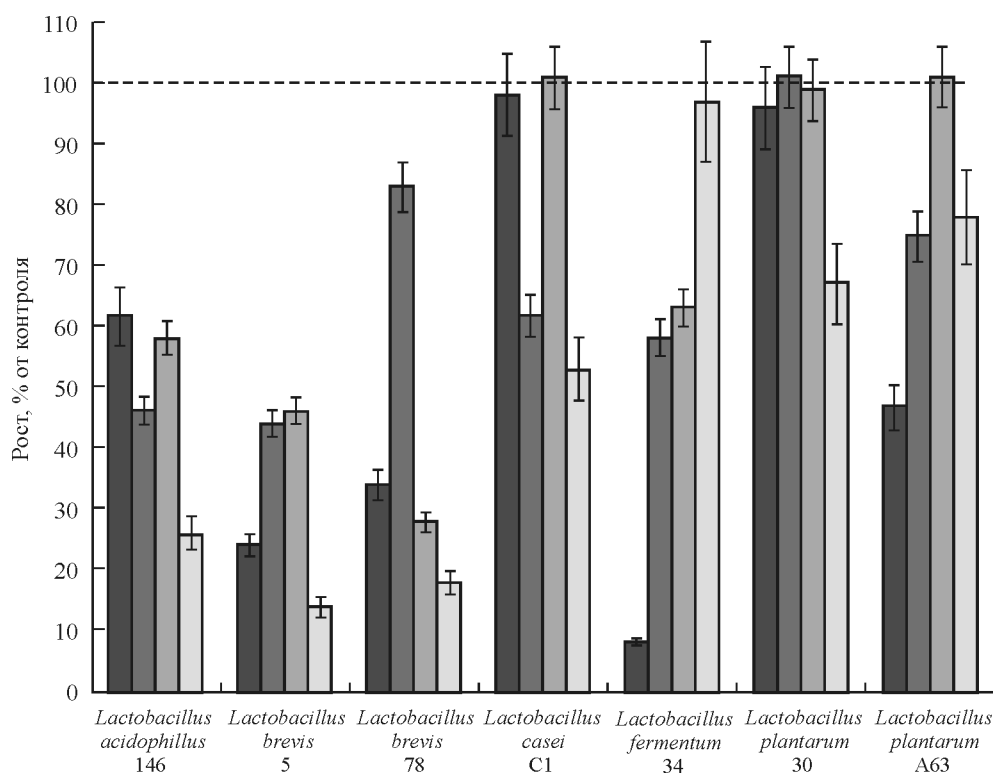


Рис. 1. Подавление роста грибов культуральной жидкостью молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* при pH 5. Виды грибов обозначены как столбцы диаграммы (слева направо): *Aspergillus fumigatus*, *A. ochraceus*, *Penicillium chrysogenum*, *Debaryomyces hansenii*.

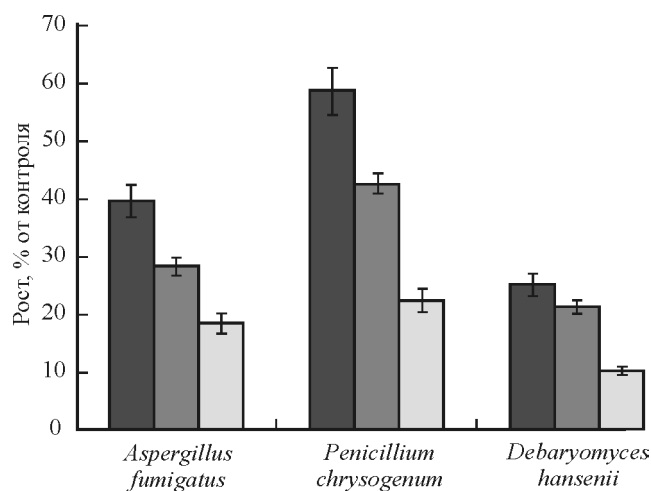


Рис. 2. Подавление роста тест-грибов культуральной жидкостью *Lactobacillus brevis* 5 (20 %) (слева), Pfr-4 (20 %) (в центре), *L. brevis* 5 и Pfr-4 (10 + 10 %) (справа).

КЖ Pfr-4 ингибировала рост грибов в большей степени, чем таковая *L. brevis* 5 (рис. 2). Однако для полного подавления роста *Aspergillus fumigatus* 102 и *Geotrichum candidum* 5K требовались высокие дозы КЖ Pfr-4 — более 50 % (табл. 2). КЖ Pfr-4 полностью ингибировала рост *Penicillium chrysogenum* 2K, *Debaryomyces hansenii* 4K и *Aspergillus ochraceus* 121; минимальная ингибирующая доза КЖ (МИД) — 30, 40 и 50 % соответственно. При таких дозах вносимой КЖ концентрации пропионовой и уксусной кислот были ниже их МИК (табл. 1). Ингибирующий эффект достигается, по-видимому, за счет других антифунгальных соединений. Известно, что пропионовокислые бактерии образуют бактерициноподобные полипептиды, обладающие антифунгальной активностью (Ryzhkova et al., 2017).

КЖ *Lactobacillus brevis* 5 и Pfr-4, введенные по отдельности в количестве 20 % от объема среды, подавляли рост тест-культур *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* и *Debaryomyces hansenii* на 60, 40, 75 и 72, 57 и 80 % соответственно. КЖ *Lactobacillus brevis* 5 и Pfr-4, добавленные совместно в среду культивирования тест-грибов, ингибировали их рост на 82, 76 и 90 %, что превосходило таковое у штамма Pfr-4 и еще в большей мере у *L. brevis* 5 (рис. 2).

Обсуждение

Благодаря своим экзометаболитам пробиотический штамм Pfr-4 проявляет выраженную антифунгальную активность, которую наблюдали на примере подавления роста штаммов пяти видов, — *Aspergillus fumigatus*, *A. ochraceus*, *Penicillium chrysogenum*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*. Антифунгальная активность культуральных жидкостей у семи штаммов лактобацилл различалась и была заметно ниже таковой у исследуемого штамма пропионовокислой бактерии, что согласуется с различием в подавлении роста грибов пропионовой, уксусной и молочной кислот, среди которых пропионовая кислота обла-

дает наиболее сильным антифунгальным действием. Эти данные подтвердили более ранние наблюдения (Doores, 2005; Lind et al., 2005).

Культуральная жидкость штамма Pfr-4 оказывает более сильное ингибирующее действие на грибы, чем содержащиеся в его КЖ пропионовая и уксусная кислоты. Это объяснимо исходя из факта образования пропионовыми бактериями минорных экзометаболитов с антимикробными свойствами, например альдегидов уксусной и пропионовой кислот, пероксида водорода, диацетила (Vorobyeva, 1995), 3-фенилмолочной кислоты (Lavermicossa et al., 2003) и др. Недавно мы доказали способность этого штамма пропионовокислой бактерии выделять в среду собственные полипептиды микостатического действия, отличные от таковых триптона среды (Ryzhkova et al., 2017).

Антифунгальная активность лактобацилл также может определяться помимо молочной кислоты и следов уксусной и пропионовой кислот широким спектром веществ (3-фенилмолочная кислота, бензойная кислота, гидроксильированные жирные кислоты, реутерин, диацетил, дикетопиперазин, пероксид водорода), спектр которых может существенно различаться у разных штаммов (Dalić et al., 2010; Delavenne et al., 2012). Среди исследованных нами лактобацилл наиболее перспективен в отношении ингибирования роста грибов штамм *Lactobacillus brevis* 5. Введение КЖ этого штамма и пропионовокислой бактерии Pfr-4 в соотношении 1 : 1 в суммарном количестве 20 % в среду для выращивания грибов вызывало усиление ингибирующего действия в сравнении с действием КЖ этих бактерий раздельно. Этот эффект требует дальнейшего изучения, ибо указывает на синергию в антифунгальном действии экзометаболитов молочно- и пропионовокислых бактерий.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 14-50-00029).

REFERENCES

- Brock M, Buckel W (2004) On the mechanism of action of the antifungal agent propionate: propionyl-CoA inhibits glucose metabolism in *Aspergillus nidulans*. Eur J Biochem 271(15):3227—3241
- Danilova IV, Mao Yu-B, Lee H, Tourova TP, Ryzhkova EP, Netrusov AI (2012) *Propionibacterium freudenreichii* strains as antibacterial agents at neutral pH and their production on food-grade media fermented by some lactobacilli. J Food Safety 32(1):48—58
- Dalić DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F (2010) Lactic acid bacteria — potential for control of mould growth and mycotoxins. Food control 21:370—380
- Delavenne E, Mounier J, Dénier F, Barbier G, Le Blay G (2012) Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. Int J Food Microbiol 155(3):185—190
- Doores S (2005) Organic acids. In: Davidson PM, Sofos JN, Branen AL (eds) Antimicrobials in Food, 3rd edn. Boca Raton, London, New York, Singapore, Taylor and Francis Group LLC, p 91—142
- Kung LJr, Myers CL, Neylon JM, Taylor CC, Lazartie J, Mills JA, Whiter AG (2004) The effects of

buffered propionic acid-based additives alone or combined with microbial inoculation on the fermentation of high moisture corn and whole-crop barley. *J Dairy Sci* 87(5):1310—1316

Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A (2003) Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl Environ Microbiol* 69(1): 634—640

Lind H, Jonson H, Schnurer J (2005) Antifungal effect of dairy propionibacteria — contribution of organic acids. *Int J Food Microbiol* 98(2):157—165

Ryzhkova EP, Serebrov VV, Danilova IV, Bykovchenko TV (2015a) Background for trials of *Propionibacterium freudenreichii* strain RVS-4-irf as a component of clinical nutrition. *Biotechnologiya* 4:70—78 (in Russ.)

Ryzhkova EP, Danilova IV, Kurakov AV (2015b) Approach for acid-milk products protection against spoilage with micromycetes. RF Patent N 2555535 (in Russ.)

Ryzhkova EP, Lee H, Bykovchenko TV, Danilova IV, Polandova RD (2009) Microbial safeguard of wheat bread based on trofic chain between *Lactobacillus delbrueckii* and *Propionibacterium freudenreichii*. *Biotechnologiya* 2:29—37 (in Russ.)

Ryzhkova EP, Shamraichuk IL, Kurakov AV, Netrusov AI (2017) Production of antimicrobial polypeptides by *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf. *Microbiology* 86(2):170—175

Schwenninger SM, Lacroix Ch, Truttmann St, Jans Ch, Spornli C, Bigler L, Meile L (2008) Characterization of low-molecular-weight antiyeast metabolites produced

by a food-protective *Lactobacillus*—*Propionibacterium* coculture. *J Food Protect* 71(12):2481—2487

Vorobyeva LI (1995) Propionic acid bacteria. Moskva (in Russ.)

Воробьева Л. И. (Vorobyeva) Пропионовокислые бактерии. М.: Изд-во МГУ, 1995. 288 р.

Рыжкова Е. П., Данилова И. В., Кураков А. В. (Ryzhkova et al.) Способ защиты кисломолочных продуктов от порчи грибами. Патент РФ № 2555535. 2015b.

Рыжкова Е. П., Данилова И. В., Шамрайчук И. Л., Кураков А. В., Нетрусов А. И. (Ryzhkova et al.) Образование антимикробных полипептидов бактерией *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf // Микробиология 2017. Т. 86, № 2. С. 158—163.

Рыжкова Е. П., Ли Хао, Быковченко Т. В., Данилова И. В., Поландова Р. Д. (Ryzhkova et al.) Микробиологическая защита пшеничного хлеба с использованием трофической цепи *Lactobacillus delbrueckii* и *Propionibacterium freudenreichii* // Биотехнология. 2009. № 2. С. 29—37.

Рыжкова Е. П., Серебров В. В., Данилова И. В., Быковченко Т. В. (Ryzhkova et al.) Предпосылки для испытаний штамма *Propionibacterium freudenreichii* RVS-4-irf в качестве компонента клинического питания // Биотехнология. 2015а. № 4. С. 70—78.

Поступила 06 07 2017