

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-2-305-311>

Поступила 08.05.2024

Поступила после рецензирования 18.06.2024

Принята в печать 20.06.2024

© Кучеренко И. В., Кураева Е. В., Масежная Е. С., 2024

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КУЛЬТУР ЛАКТОКОККОВ ПРИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Кучеренко И. В.*, Кураева Е. В., Масежная Е. С.

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, Углич, Ярославская область, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

лактококки,
замораживание,
лиофилизация,
выживаемость,
хранение

Важной составляющей в деятельности коллекции заквасочных микроорганизмов является сохранение фонда производственно-ценных культур. Широко распространённым методом длительного хранения коллекционных культур является лиофилизация. Критическим параметром процесса лиофилизации является температура предварительного замораживания. В данной статье представлены результаты исследований выживаемости культур лактококков в процессе лиофилизации с предварительным замораживанием при температурах: минус 20 °С, минус 30 °С и минус 55 °С. Средой культивирования и лиофилизации являлось 10%-ное восстановленное обезжиренное молоко. Выявлена различная реакция микроорганизмов видов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus cremoris* и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* на замораживание и лиофильную сушку при испытанных режимах. Наиболее высокая выживаемость лактококков наблюдалась при температуре замораживания минус 20 °С. Самыми устойчивыми были культуры *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* — выживаемость после сушки с замораживанием при температуре минус 20 °С составила 42,6–57,9%. Самая низкая выживаемость характерна для *Lactococcus cremoris* при всех режимах замораживания (от 3,1 до 15,7%). Лيوфилизация коллекционных культур лактококков позволяет обеспечить высокую выживаемость клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FRFF-2023-0001 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

Received 08.05.2024

Accepted in revised 18.06.2024

Accepted for publication 20.06.2024

© Kucherenko, I. V., Kuraeva, E. V., Masegnaya, E. S., 2024

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

EFFECT OF FREEZING TEMPERATURE ON RATE OF SURVIVAL OF LACTOCOCCUS CULTURES DURING LYOPHILIZATION

Irina V. Kucherenko*, Elena V. Kuraeva, Elena S. Masegnaya

All-Russian Scientific Research Institute of Butter and Cheesemaking, Uglich, Yaroslavl Region, Russia

KEY WORDS:

lactococcus, freezing,
lyophilization, survival,
storage

ABSTRACT

The important component in the activities of the collection of starter microorganisms is the preservation of the pool of the strains valuable for industrial production. Lyophilization (also known as freeze drying) is a widely used method for the long-term storage of the collection cultures. The critical parameter of the process of lyophilization is the pre-freezing temperature. This article brings forward the results of researches of the rate of survival of lactococcus strain cultures during their lyophilization with pre-freezing at the temperatures of minus 20 °C, minus 30 °C and minus 55 °C. Reconstituted 10% skim milk was used as the medium for strain culturing and lyophilization. Different reactions were detected among the microorganisms of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* for their freezing and lyophilization under the tested conditions. The highest rate of survival of lactococcus strains was observed at the freezing temperature of minus 20 °C. The most resistant cultures appeared to be *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* — their rate of survival after lyophilization at minus 20 °C amounted to 42.6–57.9%. The lowest survival rate was recorded for *Lactococcus cremoris* in all freezing modes (from 3.1 to 15.7%). Lyophilization of lactococcus collection cultures ensures high survival rate of the cells.

FUNDING: The article was prepared as part of research on state task No. FRFF-2023-0001 of the V. M. Gorbatov Federal Scientific Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences.

1. Введение

Поддержание коллекций микроорганизмов являются одним из важных направлений деятельности биоресурсных коллекций и производителей бактериальных заквасок. Основными задачами хранения культур микроорганизмов являются: поддержание их в жизнеспособном состоянии, предотвращение мутационных изменений, и сохранение стабильности характерных и важных в таксономическом и технологическом отношении свойств. Для этого необходимо обеспечить содержание микроорганизмов в условиях, которые исключают утрату жизнеспособности и предотвращают мутационные изменения их свойств. В практике работы микробиологических лабораторий и специализированных коллекций применяются различные методы и способы обратимой консервации и хранения

культур микроорганизмов в зависимости от индивидуальных особенностей сохраняемых культур, выполняемых целей и задач, материального и технического уровня и других условий [1].

Несмотря на углубление знаний в области физиологии, биохимии и генетики микроорганизмов, нельзя утверждать о наличии чётких представлений по различным аспектам управления и методологии обратимой консервации различных видов и штаммов коллекционных культур.

Методы хранения культур микроорганизмов подразделяются на краткосрочные и долгосрочные. Все способы сохранения коллекционных культур имеют достоинства и недостатки, условия поддержания культур оказывают различное влияние на сохранность жизнеспособности, а также стабильность свойств микроорганизмов.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Кучеренко И. В., Кураева Е. В., Масежная Е. С. (2024). Влияние температуры замораживания на выживаемость культур лактококков при лиофилизации. *Пищевые системы*, 7(2), 305–311. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-2-305-311>

FOR CITATION: Kucherenko, I. V., Kuraeva, E. V., Masegnaya E. S. (2024). Effect of freezing temperature on rate of survival of lactococcus cultures during lyophilization. *Food Systems*, 7(2), 305–311. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-2-305-311>

Но в основе всех методов лежит снижение их метаболической активности вплоть до состояния анабиоза.

Для непродолжительного хранения используются наиболее простые способы, которые не требуют наличия дорогого оборудования и необходимы в повседневной работе с культурами [2]:

- субкультивирование,
- хранение под минеральным маслом,
- хранение в воде и водно-солевых растворах,
- сушка на твердых носителях,
- замораживание.

Одним из самых старых и широко используемых в лабораториях и микробиологических производствах методов является периодический пересев бактерий в новую свежую жидкую или твердую питательную среду. Важными моментами для обеспечения сохранности культур при этом является состав питательной среды, условия культивирования, температура хранения, а также продолжительность хранения между перевивками [2]. Для различных таксономических групп микроорганизмов подбираются различные параметры субкультивирования, которые определяются их культуральными и физиолого-биохимическими свойствами. Этот метод обычно используется для кратковременного поддержания в жизнедеятельном состоянии рабочих культур при определении их таксономического положения (идентификации) и изучении свойств культур микроорганизмов, например при выделении из различных источников, отборе и подборе их в состав заквасочной микрофлоры. Метод субкультивирования используется также при сохранении культур, которые не выдерживают других методов хранения [3].

Ещё одним из относительно простых и недорогих методов является хранение под минеральным маслом, с помощью которого сохраняются месяцы и даже годы многие виды бактерий. Выращенные в пробирках с твердой питательной средой культуры заливают слоем минерального масла, например, вазелинового, высотой не менее 2 см. Масло понижает метаболизм бактерий и защищает сохраняемую культуру от высыхания [2]. Пересевать культуры под маслом можно 1–2 раза в год. Этот метод в практике кратковременного хранения молочнокислых бактерий обычно не используется. Практикуется также хранение микроорганизмов путём сушки на различных твердых носителях. Как правило метод высушивания применяется для споровых бактерий, так как многие бактериальные культуры вымирают уже в процессе высыхания.

Весьма распространено сохранение бактерий путём простого замораживания при температурах ниже точки замерзания воды. Содержание культур в замороженном виде обеспечивает более длительное сохранение жизнеспособных клеток, снижает опасность загрязнения посторонними микроорганизмами, что делает этот метод весьма эффективным при работе с большим числом штаммов [4,5].

По данным В. Д. Похиленко с соавторами [2] срок гарантированного хранения замороженных лактобактерий ограничивается месяцем для палочковидных форм и составляет до полугода для кокковых форм. У М. А. Кириленко с соавторами показана возможность более продолжительного хранения (до 24 месяцев) живых лактобацилл при температуре минус 20 °С, что, по их мнению, позволяет создавать банк длительного хранения бактерий с исключением значимой потери их активности [5].

Вопросам сохранности различных микроорганизмов, в том числе молочнокислых бактерий и бактериальных заквасок при различных способах консервации и хранения посвящено большое количество исследований [5,6,7], но эта проблема остаётся актуальной и по сей день, поскольку с использованием современных молекулярно-генетических методов исследований установлены факты накопления многочисленных мутаций в геномах бактерий в процессе длительного хранения.

Существует три способа перевода микроорганизмов в состояние анабиоза:

- ксенобиоз — высушивание путём удаления воды до минимального её содержания;
- криоанабиоз — замораживание, при котором клеточная вода превращается в лёд и становится невозможным её участие в процессах метаболизма;
- лиофилизация — высушивание из замороженного состояния в вакууме [2].

Современные представления о вреде замораживания для живых организмов, которое зависит от скоростей замораживания-оттаивания, сложились в результате исследований повреждающего действия образования льда на разные типы биологических клеток [8]. В соответствии с так называемой двухфакторной гипотезой повреждения и гибель клеток при замораживании происходят из-за кри-

сталлизации воды внутри или вне клеток, которое зависит от скорости охлаждения. При низких скоростях замораживания образование кристаллов льда происходит в первую очередь вне клеток. При этом увеличивается концентрация растворённых веществ во внешней среде, окружающая среда приобретает свойства гипертонического раствора, вызывает отток воды из клеток и их осмотическое сжатие (сублимационная дегидратация). При высоких скоростях охлаждения концентрирование веществ во внешней среде происходит быстро и внутренней воде недостаточно времени для перемещения по химическому градиенту из внутриклеточного пространства в сконцентрированную внеклеточную среду. Поэтому внутри клеток остается большее количество воды и при дальнейшем охлаждении формируются кристаллы льда. Собственно, при замораживании образуются мелкие кристаллы, но в процессе медленного отогрева происходит рекристаллизация и их размеры могут увеличиться. Это может вызвать повреждения цитоплазматических мембран и клеточных органелл [9].

Установлено, что обеспечить максимальную выживаемость разных видов клеток можно при различных скоростях замораживания-оттаивания. В частности, G.-Q. Wang с соавторами [10] при изучении влияния температур замораживания культур *L. plantarum* показали, что оптимальными для отдельных штаммов были различные температуры замораживания, которые оказали влияние на выживаемость за счёт изменения целостности и проницаемости клеточных мембран и активности лактатдегидрогеназы.

Имеются данные о различной продолжительности хранения микроорганизмов при разных температурных режимах замораживания, которые свидетельствуют об увеличении сохранности культур по мере снижения температуры хранения: от 6 месяцев до 10 лет и более при температурах от минус (15–20) °С до минус (70–80) °С и ниже [1]. Однако для этого требуется обеспечение стабильного режима хранения, поскольку даже непродолжительные изменения температуры хранения бактерий негативно сказываются на их жизнеспособности.

Хранение культур промышленных микроорганизмов в жидком азоте (температура минус 196 °С) в течение 15–20 лет подтвердило высокую сохранность количества жизнеспособных клеток без дополнительных изменений исходных морфологических, культуральных и биохимических свойств по сравнению со свойствами этих культур, размороженных непосредственно после замораживания [11].

Клетки лиофильно высушенных микроорганизмов могут длительное время сохраняться в жизнеспособном состоянии при соответствующих условиях — пониженной температуре (около 4 °С), без доступа кислорода и света. Это значительно упрощает практическую работу по поддержанию коллекционного фонда, поскольку позволяет хранить большое количество ампул с культурами на небольшой площади. Холодильные камеры для такого хранения значительно дешевле специализированных криохранилищ и более эффективны с точки зрения энергозатрат [2,12]. Но при этом способе хранения количество жизнеспособных клеток постепенно снижается и требуется периодическая «пересушка» культур. Кроме этого возможно, что лиофилизация приводит к отбору наиболее устойчивых клеток в культуре, которые могут и не обладать желаемыми свойствами [13].

Процесс лиофильной сушки подразделяется на три стадии: замораживание, первичное высушивание или собственно лиофилизация (сублимация) и вторичное высушивание или досушивание. На начальной стадии сушки удаляется путём перевода из твердого в газообразное состояние около 95% воды в материале. Фаза вторичной сушки направлена на удаление незамерзших молекул воды, поскольку лед был удален на этапе первичной сушки. При лиофилизации на клетки воздействуют низкие температуры и комплекс различных стрессовых физико-химических факторов, обусловленных фазовым переходом воды. Но все факторы, которые могут вызывать повреждения клеток во время замораживания, хранения и реактивации, до конца не изучены [14,15]. Главные условия успешной криоконсервации и лиофилизации опираются на два основных защитных механизма: перевод воды из жидкой в аморфную фазу и обратимую дегидратацию клеток. Применяющиеся в различных лабораториях и коллекциях методы консервации не являются абсолютно совершенными, что обуславливает трудности сохранения свойств культур.

Из всех таксономических групп микроорганизмов (прокариот, эукариот, вирусов) лиофилизацию переносят наиболее стойко бактерии, но выживаемость разных видов, даже отдельных штаммов в пределах одного вида и даже подвида может сильно различаться. Хотя сублимационная сушка является надёжным методом сохранения микроорганизмов, она всё-таки приводит к снижению активности бактерий. Кроме этого, культуры различаются по своей

чувствительности к лиофилизации. Следовательно, необходимо оптимизировать переменные, относящиеся к этому процессу. Восстановление лиофилизированных коллекционных культур после хранения также является важным моментом в обеспечении сохранности коллекционного фонда [13]. Выживаемость бактерий может существенно снизиться в силу окислительного действия кислорода, которое можно предотвратить в случае хранения штаммов в ампулах, запаянных под вакуумом.

Одним из самых критичных параметров процесса лиофильной сушки является температура предварительного замораживания, и пока нет полной ясности зависит ли выживаемость и сохранение свойств разных видов и штаммов от уровня температуры предварительного замораживания или криопротекторных веществ [10]. Существенное влияние на сохранение жизнеспособности бактерий при лиофилизации оказывают условия подготовки штаммов к лиофилизации. Результат сублимационной сушки определяется кроме режимов самого процесса консервации состоянием подготовленной культуры: концентрацией жизнеспособных клеток, составом среды культивирования, фазой развития клеточной популяции [2]. При подготовке штаммов к сублимации необходимо добиваться высоко-го содержания клеток — не менее 10^8 КОЕ/мл [3].

Многие из этих факторов учтены в инструкции по сушке и хранению заквасочных культур, в соответствии с которой осуществляется многолетнее сохранение коллекционного фонда экспериментальной биофабрики ВНИИМС. Однако, практический опыт коллекционной деятельности указывает на необходимость совершенствования методов их консервации с учётом видовой и штаммовой чувствительности к параметрам консервации, с индивидуальным подбором криопротекторов и режимов реактивации.

Целью данной работы является изучение влияния различных режимов предварительного замораживания на выживаемость и сохранение метаболической активности лактококков при лиофилизации и хранении.

2. Объекты и методы

Объектами исследований являлись следующие коллекционные культуры, которые используются при изготовлении бактериальных заквасок для ферментированных молочных продуктов:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (далее *L. lactis*) штаммы 357–3, 390–1, 549–5;
- *Lactococcus cremoris* (*L. cremoris*) штаммы 374–15, 417–3, 418–5;
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (далее *L. diacetylactis*) штаммы 1–1–3, 20–3, 82–6.

С целью проведения исследований лиофильную сушку коллекционных культур проводили на колпаковой лиофильной сушилке серии Scientz-10N/10ND в исполнении Top-Press (NINGBO Scientz Bio-technology CO, Китай) с температурой конденсатора до -55°C и предельным остаточным давлением 10 Па. Для замораживания и последующей сушки в стерильные флаконы вносили по 1 см^3 16-часовой культуры лактококка, закрывали стерильными резиновыми пробками для лиофильной сушки, замораживали в течение 1 часа при трёх режимах: минус $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, минус $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, минус $(55 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, затем флаконы с замороженными культурами переставляли в камеру сушилки. Культуры выдерживались в течение $(4,5 \pm 0,5)$ часов при заданных параметрах и досушивались в течение $(2,5 \pm 0,5)$ часов при температуре $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Затем производилась укупорка флаконов под вакуумом.

Реактивацию лиофилизированных культур осуществляли ресуспендированием в 5 см^3 10%-ного стерильного восстановленного обезжиренного молока и культивированием при температуре $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ до сквашивания.

Микроскопический препарат готовили в соответствии с МР 2.3.2.2327–08¹. Изучение и фотографирование микроскопических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Levenhuk MED D10T LCD (USA) с цифровой камерой и ЖК-экраном с числом мегапикселей 5.

Метаболическую активность оценивали после 2-х пассажей (перевивок) по снижению активной кислотности после 6 ч культивирования в 10%-ном стерильном восстановленном обезжиренном молоке при температуре $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ и дозе инокулята 1%. Активную кислотность определяли в соответствии с ГОСТ Р 32892–2014².

Количество жизнеспособных клеток лактококков определяли в соответствии с ГОСТ 33951–2016³ в каждом образце перед замораживанием, после замораживания и по окончании полного цикла лиофилизации.

Достоверность полученных данных подтверждается проведением экспериментов не менее чем в 3-х кратной повторности с применением современных методов анализа, а также статистической обработкой полученных данных и построением графиков с использованием пакета программ «Microsoft Excel 2013». Для сравнения выборок разного размера и оценки статистически значимых различий между образцами применяли однофакторный дисперсионный анализ. Результаты математической обработки выполнены с доверительной вероятностью $p \leq 0,05$.

3. Результаты и обсуждение

Начальный этап работы заключался в изучении выживаемости лактококков после предварительного замораживания (первая стадия лиофилизации).

Полученные данные после экспозиции 3 штаммов *L. lactis* при испытанных температурах предварительного замораживания, представленные на Рисунке 1, выявили различное влияние температуры замораживания на выживаемость каждого штамма.

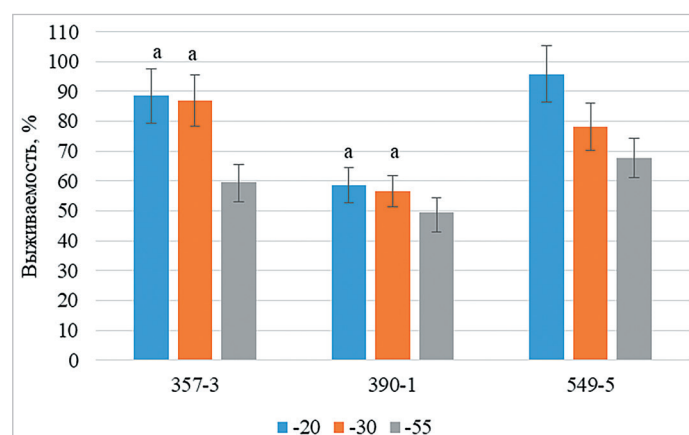


Рисунок 1. Выживаемость *L. lactis* после замораживания (различие значений, обозначенных буквенными индексами на каждой диаграмме, статистически не достоверно при $p \leq 0,05$)

Figure 1. Rate of survival of *L. lactis* after freezing (the difference between the values marked by the letter indices in each diagram is statistically negligible if $p \leq 0.05$)

Максимальная выживаемость у штаммов *L. lactis* наблюдалась при температуре замораживания минус $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ (от 58,6% до 85,8%) и минус $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ (от 56,7% до 87,1%). Все изученные штаммы *L. lactis* продемонстрировали самую низкую выживаемость при температуре минус $(55 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ (от 49,6% до 67,6%). Наиболее высокая гибель клеток при температуре замораживания минус $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ отмечалась у штамма *L. lactis* 390–1 (41,4%), в то время как у штамма 549–5 погибло только 4,2% клеток, а у штамма 357–3 вымерло 11,5% клеток. При температуре замораживания минус $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ выживаемость *L. lactis* 390–1 была ниже в 1,38 раза по сравнению с *L. lactis* 549–5 и в 1,53 раза по сравнению со штаммом 357–3.

Как показано на Рисунке 2, штамм *L. diacetylactis* 1–1–3 продемонстрировал самую высокую устойчивость при температуре минус $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ и минус $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ — 76,4% и 80,7% соответственно, не отмечено разницы в реакции штамма *L. diacetylactis* 20–3 на замораживание при этих температурных режимах.

Штамм *L. diacetylactis* 82–6 также, как и штаммы лактококков *L. lactis*, лучше выживал при температуре минус $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$.

Наиболее прихотливыми оказались штаммы *L. cremoris* (Рисунок 3) при всех использованных режимах замораживания, самая высокая выживаемость которых не превышала 61,9%.

Реакция штаммов 374–15 и 417–3 на температуру замораживания минус $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ и минус $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ была примерно одинаковой и сохранность клеток составила 22,8% и 20,5% для штамма 374–15 при этих температурах, а для штамма 417–3—46,6% и 48,8% соответственно. При этом у штамма *L. cremoris* 374–15 самая низкая гибель клеток происходила при температуре минус $(55 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ и составляла 47,1%,

¹ МР 2.3.2.2327–08 Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с атласом значимых микроорганизмов) от 07.02.2008

² ГОСТ Р 32892–2014 «Молоко и молочная продукция. Методы определения активной кислотности». М.: Стандартинформ, 2015. — 12 с.

³ ГОСТ 33951–2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов». — М.: Стандартинформ, 2016. — 10 с.

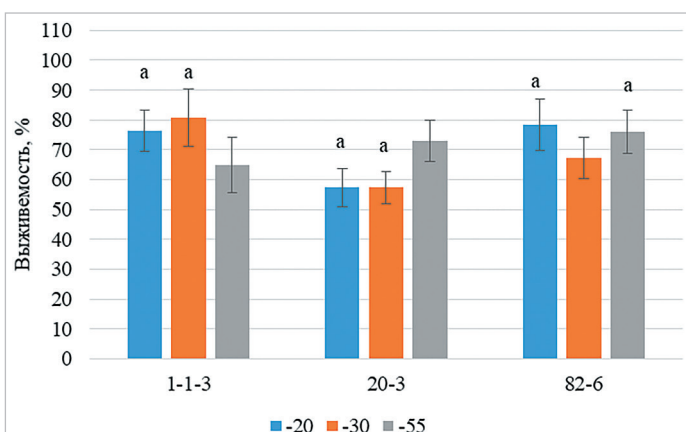


Рисунок 2. Выживаемость *L. diacetylactis* после замораживания (различие значений, обозначенных буквенным индексом на каждой диаграмме, статистически не достоверно $p \leq 0,05$)

Figure 2. Rate of survival of *L. diacetylactis* after freezing (the difference between the values marked by the letter indices in each diagram is statistically negligible if $p \leq 0.05$)

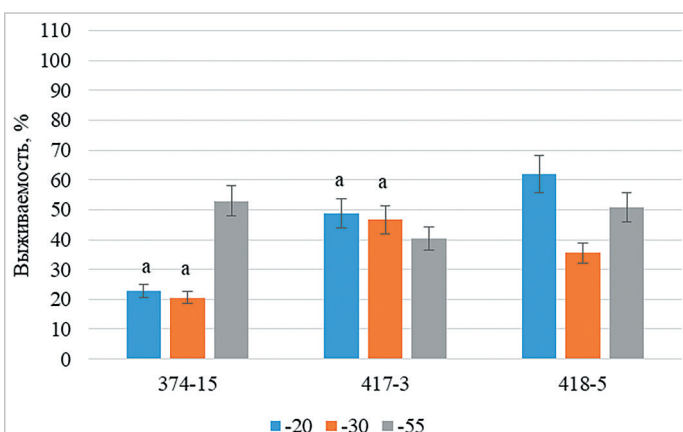


Рисунок 3. Выживаемость *L. cremoris* после замораживания (различие значений, обозначенных буквенными индексами на каждой диаграмме, статистически не достоверно при $p \leq 0,05$)

Figure 3. Rate of survival of *L. cremoris* after freezing (the difference between the values marked by the letter indices in each diagram is statistically negligible if $p \leq 0.05$)

в то время как штамм 418–5 продемонстрировал наибольшую выживаемость при температуре замораживания минус $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (61,9%), а самую низкую (35,5%) при температуре минус $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Влияние различных режимов предварительного замораживания на показатели выживаемости культур лактококков после завершения полного цикла лиофилизации показано на Рисунках 4, 5 и 6. Здесь выживаемость всех исследованных культур была ниже показателей выживаемости после предварительного замораживания. Это позволяет сделать вывод о том, что наибольшая гибель бактериальных клеток происходит на второй стадии лиофилизации.

Рисунок 4 отражает более значительное снижение количества жизнеспособных клеток штаммов *L. lactis* после завершения сушки по сравнению с показателями выживаемости после предварительного замораживания.

В частности, у штамма *L. lactis* 357–3 количество выживших бактериальных клеток при температуре предварительного замораживания минус $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ снизилось на 38,5%, в то время как гибель при замораживании составила всего 11,5%. У штаммов 390–1 и 549–5 гибель клеток возросла в процессе сушки с замораживанием при температуре минус $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 20,1% и 21,1% соответственно. Следует отметить, что у штаммов лактококков *L. lactis* самая высокая выживаемость установлена при температуре замораживания минус $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ как после замораживания, так и после завершения полного цикла лиофилизации на уровне от 38,5 до 64,7%. Из этого можно сделать вывод о предпочтительности данного режима предварительного замораживания для лиофилизации коллекционных культур *L. lactis*.

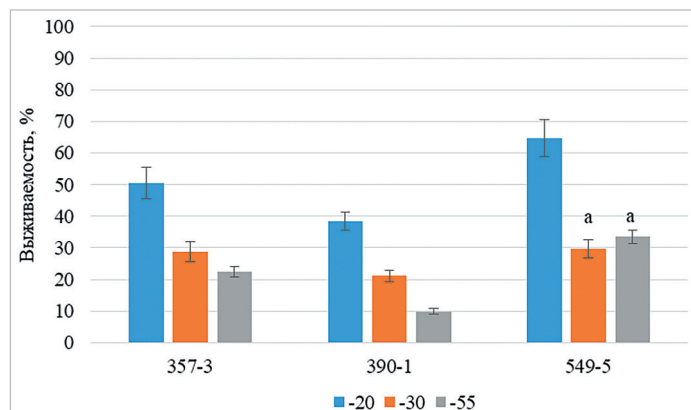


Рисунок 4. Выживаемость штаммов *L. lactis* после лиофилизации при разных температурах предварительного замораживания (различие значений, обозначенных буквенными индексами на каждой диаграмме, статистически не достоверно при $p \leq 0,05$)

Figure 4. Rate of survival of *L. lactis* after lyophilization at different temperatures of pre-freezing (the difference between the values marked by the letter indices in each diagram is statistically negligible if $p \leq 0.05$)

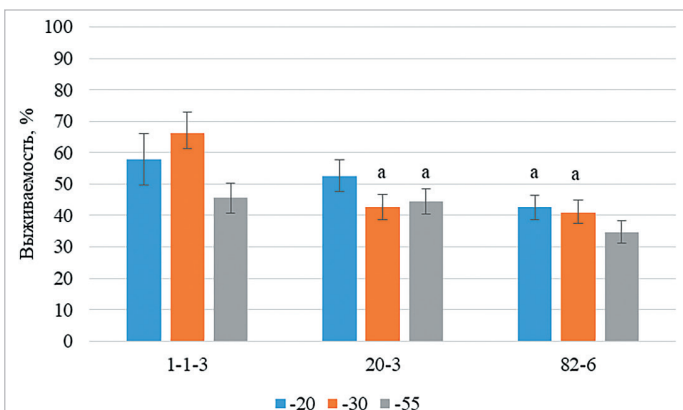


Рисунок 5. Выживаемость штаммов *L. diacetylactis* после лиофилизации при разных температурах предварительного замораживания (различие значений, обозначенных буквенными индексами на каждой диаграмме, статистически не достоверно при $p \leq 0,05$)

Figure 5. Rate of survival of *L. diacetylactis* after lyophilization at different temperatures of pre-freezing (the difference between the values marked by the letter indices in each diagram is statistically negligible if $p \leq 0.05$)

Наиболее высокая выживаемость после завершения полного цикла лиофильной сушки среди всех исследованных видов лактококков установлена у вида *L. diacetylactis* (штаммы 1–1–3 и 20–3 (Рисунок 5) при температуре предварительного замораживания минус (20±1) °C и минус (30±1) °C.

Самым устойчивым к лиофилизации при всех вариантах замораживания обладал штамм *L. diacetylactis* 1–1–3, выживаемость которого в условиях замораживания при температуре минус (20±1) °C, минус (30±1) °C и минус (55±1) °C составила 57,9%, 66,1% и 45,5% соответственно. Самая низкая устойчивость характерна для штамма 82–6, его выживаемость была существенно ниже и составила от 34,7 до 42,6%. Следовательно, для культур *L. diacetylactis* приемлемыми режимами предварительного замораживания являются минус (20±1) °C и минус (30±1) °C. Об индивидуальной реакции на замораживание и сублимационную сушку у различных видов и штаммов бактерий свидетельствуют и результаты других исследований [5,7,10,16].

Лактококки вида *L. cremoris* оказались самыми чувствительными не только к замораживанию, но и к лиофильной сушке при всех режимах предварительного замораживания (Рисунок 6).

После завершения полного цикла лиофилизации при предварительном замораживании при температуре минус (20±1) °C выживаемость у всех штаммов *L. cremoris* была самой высокой, но значительно ниже, чем у культур *L. lactis* и *L. diacetylactis* и не превысила 15,7%. Наибольшей чувствительностью к лиофилизации обладал штамм *L. cremoris* 418–5 при всех режимах замораживания, выживаемость которого составила всего от 3,1 до 5,2%. Самой благоприятной температурой замораживания для лактококков вида *L. cremoris* можно считать минус (20±1) °C также, как для культур *L. lactis*.

Одной из причин столь низкой сохранности клеток *L. cremoris* может быть более низкая исходная концентрация жизнеспособных клеток в культурах *L. cremoris*. По литературным данным выживаемость бактерий определяется целым рядом факторов, в том числе исходной концентрацией клеток. О. А. Савкина с соавторами показали, что увеличение концентрации клеток перед криоконсервацией путём центрифугирования исходных культур привело к повышению выживаемости молочнокислых бактерий с 72,1–85,3% до 81,9–97,4%. При этом предполагают, что защита бактериальных клеток от повреждений обусловлена тем, что при высокой плотности высушиваемой культуры лизированные в процессе культивирования и замораживания клетки и клеточные вещества могут выполнять защитную роль [17]. Кроме этого, *L. cremoris* является менее метаболически активным видом лактококков и более чувствительным к условиям окружающей среды [18]. Как видно из результатов, представленных в Таблице 1, среднее количество жизнеспособных клеток у *L. cremoris* в 2,02 раза меньше, чем в культурах *L. lactis* и в 2,59 раза меньше, чем в культурах *L. diacetylactis*.

После реактивации лиофильно высушенных лактококков была проведена проверка на аутентичность, которая показала хорошую метаболическую активность всех штаммов и отсутствие каких-либо отклонений по морфологическим свойствам по сравнению с исходными культурами.

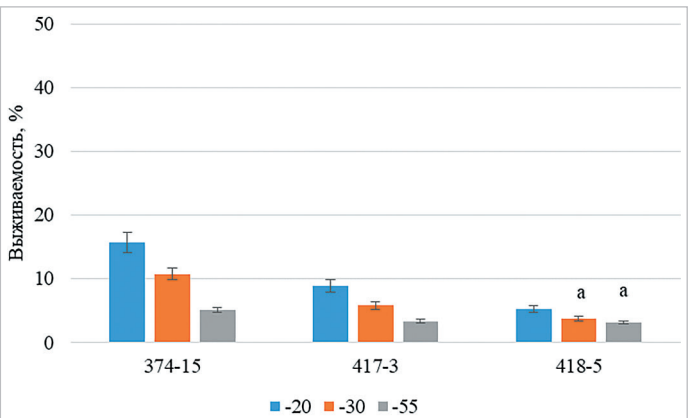


Рисунок 6. Выживаемость *L. cremoris* после лиофилизации при разных температурах предварительного замораживания (различие значений, обозначенных буквенными индексами на каждой диаграмме, статистически не достоверно при $p \leq 0,05$)

Figure 6. Rate of survival of *L. cremoris* after lyophilization at different temperatures of pre-freezing (the difference between the values marked by the letter indices in each diagram is statistically negligible if $p \leq 0,05$)

Таблица 1. Исходная концентрация жизнеспособных клеток лактококков

Table 1. Initial concentration of the viable lactococci cells

Вид лактококка	№ штамма	Исходное количество жизнеспособных клеток, млрд. КОЕ/см ³
<i>L. lactis</i>	357–3	2,18±0,22
	390–1	3,12±0,43
	549–5	1,70±0,37
	Среднее	2,12±0,44
<i>L. cremoris</i>	374–15	1,07±0,08
	417–3	1,32±0,26
	418–5	0,78±0,12
	Среднее	1,05±0,15
<i>L. diacetylactis</i>	1–1–3	2,42±0,49
	20–3	2,70±0,14
	82–6	3,05±0,21
	Среднее	2,72±0,28

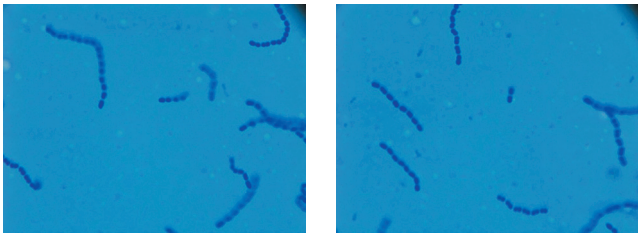
Не смотря на низкую выживаемость *L. cremoris*, оставшегося количества жизнеспособных клеток оказалось достаточным для оживления культур. Однако продолжительность оживления у *L. cremoris* была значительно выше, чем у лактококков *L. lactis* и *L. diacetylactis*. Реактивация лиофилизированных культур в обезжиренном молоке у штаммов *L. cremoris* происходила в среднем в течение 23,5 часов, а у *L. lactis* и *L. diacetylactis* за 18,5 часов.

Метаболическая активность исследованных штаммов лактококков после 2 перевивок оживлённых культур не имела достоверных отличий от их исходной активности. Микроскопическая картина исходных и реактивированных культур также была идентичной. На Рисунок 7 для примера представлены микрофотографии *L. cremoris* 417–3 до сушки с температурой замораживания минус (20±1) °C и после реактивации, на которых видно, что микроскопическая картина типична для этого вида лактококков — клетки расположены в виде коротких и средних цепочек в обоих вариантах, отсутствуют единичные кокки, а также скученность и неоднородные по размеру клетки.

Таким образом, проведённые исследования свидетельствуют о том, что показатели выживаемости коллекционных культур лактококков видов *L. lactis*, *L. cremoris* и *L. diacetylactis* можно улучшить путём изменения температуры предварительного замораживания для каждого вида несмотря на то, что реакция у разных штаммов варьирует. Снижение температуры замораживания до минус 55 °C не дало положительного эффекта у всех видов лактококков. Использование температур замораживания минус 20 °C и минус 30 °C является более экономичным с точки зрения энергетических затрат и не требует дорогостоящего низкотемпературного морозильного оборудования.

Леофилизированные культуры лактококков заложены на длительное хранение при температуре (4±2) °C. Выживаемость и метаболическую активность штаммов планируется исследовать ежегодно.

Полученные нами данные о выживаемости лактококков при различных режимах предварительного замораживания основаны на культивировании в обычно используемой твёрдой питательной среде. Считается, что бактерии вымерли, если они не образуют колонии на твёрдых питательных средах или не приводят к помутнению жидких сред. Однако в последние годы этот постулат признан



Исходная культура

Реактивированная культура

Рисунок 7. Микропрепараты *L. cremoris* 417–3 до и после лиофилизации при температуре замораживания минус (20±1) °C, объектив 40×

Figure 7. Micropreparations of *L. cremoris* 417–3 before and after lyophilization at freezing temperature minus (20±1) °C, lens 40×

упрощённым в связи с тем, что доказано сохранение жизнеспособности и потенциальная способность к восстановлению при потере «культивируемости». Появились новое понятие «жизнеспособное, но некультивируемое» состояние и новое направление исследований в общей и медицинской микробиологии. Особое внимание этой физиологической форме бактерий уделяется в медицине [19,20], что обусловлено опасностью возникновения инфекционных заболеваний при наличии некультивируемых патогенных бактерий, у которых выявлено сохранение патогенности в этой форме существования. Имеются сведения о переходе молочнокислых и бифидобактерий в некультивируемую форму в лиофилизированных пробиотических препаратах [21], а также и лактококков [22].

Исходя из этого можно предположить, что некультивируемые клетки лактококков имели место и в наших объектах исследований, поскольку переход в некультивируемую форму происходит в результате воздействия различных неблагоприятных стрессовых факторов, включая лиофилизацию. Изучение этого состояния выживания может дать объяснение в том числе и более сильной реакции *L. cremoris* на режимы замораживания и сублимационной сушки и подтвердить, что низкая культивируемость не однозначно свидетельствует о гибели существенной части исходных клеток лактококков. Одним из методов таких исследований является проточная цитометрия с использованием флуоресцентных красителей. Учитывая, что целью сохранения коллекционных штаммов является возможность повторного выращивания клеток, перспективным направлением исследований с точки зрения сохранности культур является разработка методов реактивации как культивируемых, так и некультивируемых клеток.

В связи с тем, что количество жизнеспособных культивируемых клеток коллекционных культур неизбежно снижается в процессе длительного хранения при всех известных режимах, чрезвычайно важно для сохранения производственно-ценных штаммов лактококков провести исследования для увеличения их выживаемости при лиофилизации путём повышения исходной клеточной концентрации, подбора криопротекторных средств и совершенствования методов реактивации.

4. Выводы

Проведённые исследования позволяют сделать следующие выводы:

- установлены достоверные межвидовые и межштаммовые различия в выживаемости лактококков *L. lactis*, *L. cremoris* и *L. diacetylactis* в процессе лиофилизации с предварительным замораживанием при температуре минус 20 °С, минус 30 °С и минус 55 °С;
- наибольшая устойчивость к лиофилизации наблюдается у культур *L. diacetylactis* при всех режимах предварительного замораживания, самая низкая характерна для *L. cremoris*, у которых количество жизнеспособных клеток снизилось практически на 2 порядка и выживаемость составила от 3,1% до 15,7%;
- выявлена различная реакция микроорганизмов видов *L. lactis* и *L. diacetylactis* на замораживание при испытанных режимах: наиболее высокая выживаемость у штаммов *L. lactis* наблюдается при температуре замораживания минус 20 °С — от 38,5% до 64,7%, у культур *L. diacetylactis* при температурах замораживания минус 20 °С — от 42,6% до 57,9% и минус 30 °С — от 40,9% до 66,1%;
- в связи с низкой выживаемостью культур *L. cremoris* на их реактивацию в обезжиренном молоке потребовалось в среднем на 5 часов времени больше, чем для *L. lactis* и *L. diacetylactis*;
- не выявлено различий в метаболической активности исследованных культур всех видов после 2 пассажей (перевивок) оживлённых культур.

Таким образом, представленные результаты подтверждают возможность увеличения показателей выживаемости коллекционных культур лактококков видов *L. lactis*, *L. cremoris* и *L. diacetylactis* путём изменения температуры предварительного замораживания для каждого вида несмотря на то, что реакция у разных штаммов варьирует. Установленные наиболее благоприятные температуры предварительного замораживания обеспечивают достаточно высокую выживаемость лактококков *L. lactis* и *L. diacetylactis*. Выявлена целесообразность проведения дополнительных исследований для повышения устойчивости штаммов *L. cremoris* к лиофилизации и совершенствования методики реактивации.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

1. Gherna, R. L. (2010). Culture preservation. Chapter in a book: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology. John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA. 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib249>
2. Похиленко, В. Д., Баранов, А. М., Детушев, К. В. (2009). Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки, 4(12), 99–121. [Pokhilenko, V.D., Baranov, A.M., Detushev, K.V. (2009). Methods for long-term storage of collection (housing) cultures of microorganisms and trends of development. University Proceedings. Volga Region. Medical Sciences, 4(12), 99–121. (In Russian)]
3. Утепешева, А. А., Сопрунова, О. Б. (2019). Влияние условий хранения на выживаемость коллекционных бактериальных штаммов. Естественные и технические науки, 10 (136), 95–98. [Utepeshcheva, A.A., Soprunova, O.B. (2019). Influence of storage conditions on survivability of collectible bacterial strains. Natural and Technical Sciences, 10 (136), 95–98. (In Russian)]
4. Кучеренко, И.В., Масежная, Е.С., Дуганова, А.Ю. (2023). Сохранение жизнеспособности и свойств коллекционных культур молочнокислых бактерий при длительном хранении. Сыроделье и маслоделие, 4, 92–97. [Kucherenko, I.V., Masеzhnaya, E.S., Duganova, A. Yu. (2023). Properties of stock cultures of lactic acid bacteria during long-term storage. Cheese- and Buttermaking, 4, 92–97. (In Russian)] <https://doi.org/10.21603/2073-4018-2023-4-13>
5. Кириленко, М. А., Кузнецов, О. Ю., Дмитриева, Ж. М. (2019). Влияние криоконсервации на выживаемость комплекса аутоштаммов лактобактерий при хранении и процессах биотехнологического масштабирования. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова, 15(2), 5–11. [Kirilenko, M. A., Kuznetsov, O. Yu., Dmitrieva, J. M. (2019). The effect of cryopreservation on the survival of a complex of lactic acid bacterial autostains during storage and biotechnological scaling processes. Bulletin of Biotechnology and Physico-Chemical Biology Named After Yu. A. Ovchinnikov, 15(2), 5–11. (In Russian)]
6. Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. Journal of Applied Microbiology, 105, 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x>
7. Малик, Н.И., Гулейчик, И. А., Малик, Е. В., Чупахина, Н.А., Русанов, И.А., Самохвалова, Н.С. и др. (2021). Оценка жизнеспособности культур молочнокислых микроорганизмов при их замораживании и низкотемпературном хранении. Аграрная наука, 6, 6–11. [Malik, N.I., Guleychik, I.A., Malik, E.V., Chupahina, N.A., Rusanov, I.A., Samohvalova, N.S. et al. (2021). Assessment of the viability of cultures of lactic acid microorganisms during their freezing and low-temperature storage. Agrarian Science, 6, 6–11. (In Russian)] <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-6-11>
8. Rockinger, U., Funk, M., Winter, G. (2021). Current approaches of preservation of cells during (freeze-) drying. Journal of Pharmaceutical Sciences, 110(8), 2873–2893. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.018>
9. Пучков, О. Е. (2017). Биогенное управление образованием льда. Природа, 2 (1218), 27–37. [Puchkov, O.E. (2017). Biogenic management of ice formation. Nature, 2(1218), 27–37. (In Russian)]
10. Wang, G.-Q., Pu, J., Yu, X.-Q., Xia, Y.-J., Ai, L.-Z. (2020). Influence of freeze-drying temperature before freeze-drying on the viability of various Lactobacillus plantarum strains. Journal Dairy Sciences, 103(4), 3066–3075. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685>
11. Tsutsaeva, A. A., Anan'ina, A. E., Balyberdina, L. M., Stepanyuk, L. V., Pavlenko, N. V. (2008). Long-term storage of industrial microbial strains. Microbiology, 77(5), 621–624. <https://doi.org/10.1134/S0026261708050172>
12. Степанова, А. П., Ловцова, Л. Б., Григорьева, Ж. А. (2022). К вопросу о возможности длительного хранения молочнокислых штаммов без утраты их основных свойств. Вестник Всероссийского научно-исследовательского института жиров, 1–2, 52–55. [Stepanova, A.P., Lovtsova, L.B., Grigorieva, Zh.A. (2022). On issue of possibility of long-term storage of lactic acid strains without loss of their basic properties. Bulletin of All-Russian Scientific Research Institute of Fats, 1–2, 52–55. (In Russian)] <https://doi.org/10.25812/VNIIG.2022.70.27.003>
13. Абзалов, А. А., Асеева, М. А., Атабаев, М. М., Белов, П. С., Беляева, С. В., Бердзенишвили, И. Г. и др. (2018). Результаты исследований естественных и точных наук: междисциплинарный подход и сверхаддитивный эффект. Самара: ООО НИЦ «Поволжская научная корпорация», 2018. [Abzalov, A. A., Aseeva, M. A., Atabaev, M. M., Belov, P. S., Belyaeva, S. V., Berdzenishvili, I. G. et al. (2018). Results of researches in natural and exact sciences: Interdisciplinary approach and super additive effect. Samara: Volga Scientific Corporation SRC LLC, 2018. (In Russian)]
14. Грачева, И. В., Осин, А. В. (2016). Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред. Проблемы особо опасных инфекций, 3, 5–12. [Gracheva, I.V., Osin, A.V. (2016). Mechanisms of damaging bacteria during lyophilization and protective activity of shielding media. Problems of Particularly Dangerous Infections, 3, 5–12. (In Russian)]
15. Wang, J., Chen, L. (2021). Impact of a novel nano-protectant on the viability of probiotic bacterium Lactobacillus casei K17. Foods, 10(3), Article 529. <https://doi.org/10.3390/foods10030529>
16. Archacka, M., Bialas, W., Dembczyński, R., Olejnik, A., Sip, A., Szymanowska, D. et al. (2019). Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of Lactococcus lactis: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. Food Chemistry, 274, 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.033>
17. Савкина, О. А., Терновской, Г. В., Локачук, М. Н., Павловская, Е. Н., Сафронова, В. И. (2014). Криоконсервация — перспективный метод хранения промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей. Сельскохозяйственная биология, 49(4), 112–119. [Savkina, O. A., Ternovskoi, G. V., Lokachuk, M. N., Pavlovskaya, E. N., Safronova, V. I. (2014). Cryopreservation to be a progressive method for keeping up valuable strains of lactic acid bac-

teria and yeasts. *Agricultural Biology*, 49(4), 112–119. (In Russian)] <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2014.4.112rus>

18. Гудков А. В. (2004). Сыроделие: технологически, биологические и физико-химические аспекты. М.: ДеЛи принт, 2004 [Gudkov, A.V. (2004). Cheese making: Process-related, biological and physico-chemical aspects. Moscow: DeLi Print, 2004. (In Russian)]

19. Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P. (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5, Article 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>

20. Пахомов, Ю.Д., Блинкова, Л.П. (2019). Биоопасность жизнеспособных некультивируемых микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, 96(3), 83–91. [Pakhomov, Y.D., Blinkova, L.P. (2019). Biohazard caused by viable but nonculturable microorganisms. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 96(3), 83–91. (In Russian)] <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-3-83-91>

21. Blinkova, L., Martirosyan, D.M., Pakhomov, Y., Dmitrieva, O., Vaugman, R., Altshuler, M. (2014). Nonculturable forms of bacteria in lyophilized probiotic preparations. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(2), 66–76. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v4i2.29>

22. Ganesan, M., Stuart, M. R., Weimer, B. C. (2007). Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2498–2512. <https://doi.org/10.1128/AEM.01832-06>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Кучеренко Ирина Валентиновна — старший научный сотрудник, участник коллекции микроорганизмов и бактериофагов, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, ул. Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-485-329-82-21 E-mail: i.kucherenko@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-8251-992X * автор для контактов	Irina V. Kucherenko , Senior Researcher, Collection Area of Microorganisms and Bacteriophages, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-485-329-82-21 E-mail: i.kucherenko@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-8251-992X * corresponding author
Кураева Елена Вячеславовна — старший научный сотрудник, лаборатория селекции микроорганизмов, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, ул. Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-485-329-82-84 E-mail: e.kuraeva@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-0710-3083	Elena V. Kuraeva , Senior Researcher, Microorganism Selection Laboratory, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-485-329-82-84 E-mail: e.kuraeva@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-0710-3083
Масежная Елена Сергеевна — младший научный сотрудник, участок коллекции микроорганизмов и бактериофагов, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, ул. Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7485-329-82-21 E-mail: mikrob.biofabrika@mail.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-1381-9344	Elena S. Masegnaya , Junior Researcher, Collection Area of Microorganisms and Bacteriophages, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-485-329-82-21 E-mail: mikrob.biofabrika@mail.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-1381-9344
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	The author has the sole responsibility for writing the manuscript and is responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.