

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2025-8-4-488-497>

Поступила 12.05.2025

Поступила после рецензирования 22.10.2025

Принята в печать 27.10.2025

© Сорокина Н. П., Смыков И. Т., Кучеренко И. В., Кураева Е. В., Дуганова А. Ю., 2025

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

Научная статья

Открытый доступ

ВЛИЯНИЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И КРИОПРОТЕКЦИИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КУЛЬТУР *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM*

Сорокина Н. П., Смыков И. Т., Кучеренко И. В.*, Кураева Е. В., Дуганова А. Ю.

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

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

лактобациллы,
лиофилизация,
криопротекторы,
выживаемость,
метаболическая
активность

Лиофилизация на протяжении многих лет признается эффективным методом сохранения коллекционных культур, бактериальных заквасок и пробиотиков. Для защиты бактериальных клеток от стрессовых воздействий в процессе замораживания и сушки, для повышения их выживаемости используются различные криопротекторы. Целью исследования была оценка влияния трех режимов замораживания перед лиофильной сушкой при температуре минус 20, 30 и 55 °C и растворов двух криопротекторов — сахарозы и трегалозы на выживаемость и сохранение метаболической активности мезофильных лактобацилл. Культуры выращивали в 10 % обезжиренном молоке, в опытных вариантах к исследуемой культуре добавляли 20 % раствор криопротектора в соотношении 4:1. Для определения влияния условий лиофильной сушки на выживаемость и метаболическую активность бактерий, были разработаны и проведены полные двухфакторные трёхуровневые эксперименты. В качестве представительных микроорганизмов лактобацилл исследовали два штамма вида *Lactiplantibacillus plantarum* из коллекции ВНИИМС, которые используются в составе бактериальных заквасок для сыров. Результаты оценки жизнеспособности бактерий после лиофилизации показали, что оба криопротектора повышают выживаемость культур при всех режимах замораживания, но лучшие показатели выживаемости получены с использованием трегалозы. Установлена штамм-зависимость эффективности лиофилизации исследованных образцов: у штамма *Lactiplantibacillus plantarum* 28 максимальная выживаемость была выявлена при использовании температуры замораживания минус 30 °C, у штамма *Lactiplantibacillus plantarum* 37 — при температуре минус 55 °C с добавлением криопротектора трегалозы к обоим штаммам. Для сохранения метаболической активности обеих культур наилучшим было предварительное замораживание при температуре минус 20 °C и также с трегалозой. Показано, что наибольшая эффективность действия сахарозы и трегалозы в качестве лиопротекторов при лиофильной сушке, для обоих штаммов бактерий находится в одном и том же диапазоне температур предварительного замораживания близкой к минус 30 °C. Выявленная штамм-зависимость эффективности лиофилизации должна учитываться при выборе режимов сушки различных коллекционных культур, предназначенных для длительного хранения, и предполагает индивидуальный подход к каждой культуре. Полученные результаты также могут быть использованы при лиофильной сушке бактериальной массы при производстве моновидовых бактериальных заквасок.

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 12.05.2025

Accepted in revised 22.10.2025

Accepted for publication 27.10.2025

© Sorokina N. P., Smykov I. T., Kucherenko I. V., Kuraeva E. V., Duganova A. Yu., 2025

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

Original scientific article

Open access

THE EFFECT OF LYOPHILIZATION AND CRYOPROTECTION ON SURVIVAL OF *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* STRAINS

Ninel P. Sorokina, Igor T. Smykov, Irina V. Kucherenko*, Elena V. Kuraeva, Anna Yu. Duganova

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

KEYWORDS:

vitamins, minerals,
polyunsaturated
fatty acids,
neuroinflammation,
cognitive function

ABSTRACT

Lyophilization has been recognized for many years as an effective method for storing collection cultures, bacterial starter cultures, and probiotics. Cryoprotectors are used to protect bacterial cells from stress during freezing and drying, and to increase their survival. The purpose of our study was to evaluate an effect of three freezing regimes before freeze-drying at temperatures of –20, –30, and –55 °C and solutions of two cryoprotectors, sucrose and trehalose, on the survival and preservation of the metabolic activity of mesophilic lactobacilli. The cultures were grown in 10 % skimmed milk, and in experimental versions, a 20 % cryoprotector solution was added to the culture in a 4:1 ratio. To determine an effect of freeze-drying conditions on bacterial survival and metabolic activity, complete two-factor, three-level experiments were developed and conducted. Two strains of the species *Lactiplantibacillus plantarum* from the VNIIMS collection, which are used in bacterial starter cultures for cheeses, were studied as representative microorganisms of lactobacilli. The results of assessing the viability of bacteria after lyophilization showed that both cryoprotectors increased the survival of cultures under all freezing conditions, but the best survival rates were obtained using trehalose. Strain-dependent effectiveness of lyophilization of the studied strains was established: in strain *Lactiplantibacillus plantarum* 28, the maximum survival was at a freezing temperature of –30 °C, in strain *Lactiplantibacillus plantarum* 37 — at a temperature of –55 °C with the addition of cryoprotector trehalose to both strains. Pre-freezing at –20 °C, also with trehalose, was the best method for preserving the metabolic activity of both cultures. It was shown that the greatest effectiveness of sucrose and trehalose as lyoprotectants during freeze-drying for both bacterial strains was found within the same pre-freezing temperature range of –30 °C. The identified strain-dependent effectiveness of lyophilization should be considered when selecting drying regimens for various collection cultures intended for long-term storage and requires an individual approach for each

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Сорокина, Н. П., Смыков, И. Т., Кучеренко, И. В., Кураева, Е. В., Дуганова, А. Ю. (2025). Влияние лиофилизации и криопротекции на выживаемость культур *Lactiplantibacillus plantarum*. *Пищевые системы*, 8(4), 488–497. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2025-8-4-488-497>

FOR CITATION: Sorokina, N. P., Smykov, I. T., Kucherenko, I. V., Kuraeva, E. V., Duganova, A. Yu. (2025). The effect of lyophilization and cryoprotection on survival of *Lactiplantibacillus plantarum* strains. *Food Systems*, 8(4), 488–497. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2025-8-4-488-497>

culture. The obtained results can also be used in freeze-drying of bacterial mass for the production of single-species bacterial starter cultures.

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

1. Введение

Сохранение коллекционного фонда микроорганизмов в течение длительного времени без потери их биологических и технологически важных свойств является важнейшей задачей как для производителей бактериальных заквасок, так и держателей биоресурсных коллекций. Современные методы консервации, способные тормозить процессы метаболизма, не нарушая целостность клеток, могут обеспечить длительное хранение штаммов без изменения их жизнеспособности, биохимической активности и производственно-ценных свойств.

Для хранения коллекционных культур, а также при изготовлении коммерческих заквасок и пробиотиков на протяжении многих десятилетий широко используется лиофилизация, которая является «щадящим» методом удаления влаги из бактериальных клеток, сохраняющая их жизнеспособность. Однако подходы к работе с коллекционными культурами отличаются от промышленных технологий консервации микробной массы, при которых, как правило, осуществляется pH-стати́рование для увеличения концентрации клеток, отделение бактериальных клеток от культуральной среды, суспендирование их в защитных средах, розлив в кюветы, замораживание и сушка. Консервация коллекционных штаммов основана на принципах, нацеленных на обеспечение максимального сохранения исходных свойств культур для их дальнейшего целевого использования [1]. Кроме этого, критически важно исключить контаминацию коллекционных культур посторонними микроорганизмами. В связи с этим все манипуляции с сохраняемыми штаммами минимизированы и сводятся к помещению образцов в стерильные емкости для лиофилизации с последующим герметичным укупориванием или запайкой после сушки для дальнейшего хранения.

Поскольку в процессе лиофильной сушки микроорганизмы сначала замораживают, а потом подвергают высушиванию под вакуумом, имеет место сочетание двух стрессов — и замораживания и высушивания, которые оказывают более негативное воздействие на клетки по сравнению с криоконсервацией (хранением в замороженном состоянии без высушивания). Факторы, влияющие на выживаемость микроорганизмов при замораживании и оттаивании, активно изучаются уже много десятилетий, но весь комплекс факторов и условий, которые вызывают необратимые изменения в клетках еще остаются до конца не раскрытыми [2,3]. Считается, что самый серьезный ущерб наносится цитоплазматическим мембранам и белкам. Кристаллообразование при замораживании делает клеточную мембрану более жесткой из-за снижения ее проницаемости, из-за чего увеличивается концентрация веществ внутри клетки. В результате возникает физиологический стресс, часть популяции гибнет [4].

Значительное влияние на выживаемость и сохранение свойств культур оказывают режимы замораживания и сушки: предварительная холодовая адаптация, скорость замораживания, окончательная температура замороженной бактериальной массы, температура десорбции, остаточная влажность и др. Эти параметры требуют индивидуального подбора для разных таксономических групп и даже отдельных штаммов [5–8].

Повышение выживаемости микроорганизмов при сублимационной сушке достигается за счёт изменения условий культивирования, увеличения исходной концентрации бактериальных клеток, оптимизации режимов сублимационной сушки, добавления различных криопротекторов [9]. Rakchai с соавторами [10] продемонстрировали более высокую выживаемость лактобацилл при концентрации клеток 10^9 – 10^{10} КОЕ/г, чем при содержании клеток 10^8 КОЕ/г. Wang с соавторами [3] установили увеличение выживаемости при использовании в качестве криопротектора 10% обезжиренного молока и его смеси с наночастицами фитогликогена и эмульсии Пикеринга. В другой работе была показана эффективность нескольких криопротекторов: сахарозы, трегалозы, обезжиренного молока и обезжиренного молока с глутаматом натрия [11,12], как при лиофилизации, так и при хранении. Особое значение имеют режимы предварительного замораживания. Самую высокую жизнеспособность после сублимационной сушки при изучении влияния трех режимов замораживания (минус 20 °C, минус 80 °C и минус 196 °C) для молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus parvulus* и *Lactobacillus mali* выявили при температуре минус 196 °C [13]. Yang с соавторами [14] показали, что выживаемость культуры *Lactiplantibacillus*

plantarum lip-1 была выше при температуре замораживания минус 80 °C, чем при минус 20 °C. В отношении культур *Lactiplantibacillus plantarum* (далее *L. plantarum*) установлено влияние температуры замораживания на целостность и проницаемость клеточных мембран, активность лактатдегидрогеназы и, в целом, на выживаемость лактобацилл. При этом отмечена не только видовая, но и штаммовая специфичность этого эффекта [5,15].

Перспективным направлением в увеличении уровня выживаемости бактерий в процессе замораживания, сушки и хранения является использование различных криопротекторных веществ, обеспечивающих повышение стабилизирующих свойств компонентов клеточной мембраны и комплексной устойчивости клеток. Поиску криопротекторов для повышения выживаемости молочнокислых бактерий, в т. ч. лактобацилл, при лиофилизации посвящено большое количество исследований в связи с их широким использованием в составе бактериальных заквасок для производства пищевых продуктов и пробиотических препаратов [16–18]. Многие криопротекторы уже длительное время применяются в промышленных условиях, хотя механизм их защитного действия остаётся не до конца понятным, но эффективность подтверждена эмпирически. В одном из современных научных обзоров Rockinger с соавторами [2] констатируют, что еще нет однозначных подходов к вопросу защиты клеток от повреждений при сублимации и это научная область все еще основана на эмпирической проверке различных теорий и криопротекторов. И пока не существует универсального «защитного коктейля», не смотря на явные положительные эффекты различных веществ. Однако авторы отмечают, что наиболее универсальным средством в стабилизации не только бактерий, но и любого типа живых клеток при лиофильной сушке является трегалоза, хотя и сахароза или гидроксипропилкрахмал, по их мнению, показали хорошие результаты [2].

В качестве криопротекторов при сублимационной сушке молочнокислых бактерий используются различные вещества: обезжиренное молоко, сахароза, трегалоза, лактоза, глюкоза, сорбит, мальтодекстрин и др. [19–22]. Защитный эффект этих веществ обусловлен ингибированием образования кристаллов льда внутри бактериальных клеток и денатурации белков, что приводит к уменьшению повреждений и гибели клеток.

Часто в качестве криопротекторов используются дисахариды. Углеводы стабилизируют клеточные мембраны во время сушки за счёт вытеснения молекул воды. Согласно теории стеклования углеводы могут проникать в пространство между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной, в результате чего уменьшаются механические повреждения растущими кристаллами льда. Исходя из этого такие углеводы, как сахароза, трегалоза, лактоза и др., считаются хорошими криопротекторами при лиофилизации [8,13].

Исследования с использованием внеклеточных полисахаридов, внутриклеточных совместимых растворов, а также межмембранных защитных веществ и материалов, обволакивающих клеточную мембрану, позволили выявить различные механизмы уменьшения повреждений и повышения устойчивости бактерий в процессе лиофилизации. Кроме того установлено, что микроорганизмы в ответ на стрессовые воздействия, включая холод, запускают адаптивные механизмы, в частности, изменение состава жирных кислот клеточной мембраны и накопление совместимых веществ [1,10]. И при этом одним из самых распространённых способов адаптации к стрессу является внутриклеточное накопление дисахаридов трегалозы, лактозы, сахарозы [23,24].

Из технологических факторов процесса лиофилизации большое влияние на выживаемость бактерий оказывает температура замораживания. В различных исследованиях приводятся данные о различном влиянии режима замораживания и криопротекторных веществ, а также сочетания этих параметров. Но пока не сформировалось однозначное мнение о главенствующей роли одного из этих факторов в сохранении жизнеспособности и стабильности метаболической активности микроорганизмов [6,14,25].

Целью данной работы является изучение влияния различных режимов предварительного замораживания и криопротекции на выживаемость и сохранение метаболической активности мезофильных молочнокислых палочек вида *Lactiplantibacillus plantarum* при лиофилизации и последующем длительном хранении.

2. Объекты и методы

Объектами исследования были штаммы из коллекции ВНИИМС *L. plantarum* штамм 28 (далее PL28) и *L. plantarum* штамм 37 (далее PL37), как представительные микроорганизмы вида *Lactiplantibacillus*. Данные штаммы занимают важное место в составе коллекционного фонда, так как обладают ценными производственными свойствами и используются для изготовления бактериальных заквасок для сыров.

Подготовку культур к исследованию проводили путем культивирования в 10% восстановленном стерильном обезжиренном молоке, приготовленном из сухого обезжиренного молока (ГОСТ 52791–2007¹ АО «Учебно-опытный молочный завод» г. Вологда), с 0,2% дрожжевого автолизата и 0,1% твин 80 в течение 16 ч при температуре (37 ± 1) °C. Инокулятом служили культуры, выращенные в течение 16 ч при температуре (37 ± 1) °C в жидкой среде MRS — по ГОСТ 33951–2016².

В стерильные флаконы вносили молочные культуры в количестве 1 см³, флаконы закрывали стерильными вакуумными резиновыми пробками и замораживали в течение 1 часа при трёх температурных режимах: минус (20 ± 1) °C, минус (30 ± 1) °C, минус (55 ± 1) °C. Замораживание образцов проводили в низкотемпературном морозильнике с принудительной циркуляцией воздуха ILKA SGS300/1000 (VEB ELEKTRO-ANLAGENBAU, Германия). В вариантах с криопротекторами во флаконы вносили 0,8 см³ культуры и 0,2 см³ раствора криопротектора концентрацией 20% в соотношении 4:1. Замораживание проводили при тех же режимах.

Лиофильную сушку 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 в течение (5,5 ± 0,5) ч при заданных параметрах и досушивали в течение (2,5 ± 0,5) часов при температуре (25 ± 1) °C.

Количество жизнеспособных клеток в процессе проведения экспериментов перед замораживанием, после замораживания и после сушки определяли по ГОСТ 33951–2016 на среде MRS с культивированием в анаэробе «Small» (Schuett, Германия) в течение 72-х часов.

Реактивацию лиофилизированных культур осуществляли ресуспендированием в 5 см³ 10%-ного стерильного восстановленного обезжиренного молока и культивированием при температуре (37 ± 1) °C до сквашивания. Метаболическую активность оценивали после 2-х кратных перевивок реактивированной культуры по снижению активной кислотности молока при культивировании в течение 8 ч при температуре (37 ± 1) °C.

Активную кислотность молока определяли по ГОСТ 32892–2014³ на pH-метре STARTER2100 с пределом погрешности ±0,01 ед. pH (ОНАУС, Китай).

В экспериментах использовали три варианта криопротекторной защиты. В первом варианте (контрольном) криопротекторной защитой являлась сама среда культивирования на основе сухого обезжиренного молока, во втором варианте использовали раствор сахарозы (МСД Кемикал, г. Москва) и в третьем раствор трегалозы (Gold AS, Китай).

Для определения влияния условий лиофильной сушки на выживаемость и метаболическую активность молочнокислых палочек, были разработаны и проведены полные двухфакторные трёхуровневые эксперименты на двух этапах — после замораживания исследуемых культур и после завершения их лиофильной сушки. Выходными (определяемыми) величинами в эксперименте были выживаемость и метаболическая активность молочнокислых палочек. В качестве влияющих факторов в эксперименте первым фактором была выбрана и использована температура замораживания культуры: минус 20 °C, минус 30 °C, минус 55 °C. Вторым влияющим фактором являлось использование криопротекторов: отсутствие криопротектора (контроль), 20% раствор сахарозы в соотношении 4:1 и 20% раствор трегалозы в соотношении 4:1.

Статистический анализ полученных экспериментальных данных проводили с использованием программы Microsoft Office Excel, 2019. Влияние действующих факторов на выживаемость и метаболическую активность молочнокислых бактерий определяли двухфакторным дисперсионным анализом с повторениями.

Достоверность полученных результатов обеспечивали трехкратным повторением каждого эксперимента и оценке воспроизво-

димости полученных результатов с помощью критериев Кохрена и Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Изучение влияния температуры замораживания и криопротекции на выживаемость культуры PL28

Результаты определения влияния температуры замораживания и вида криопротектора на выживаемость культуры PL28 после предварительной стадии лиофильной сушки — замораживания приведены в Таблице 1. После завершения экспериментов были рассчитаны средние значения выживаемости бактерий и выборочные дисперсии для каждой группы полученных результатов.

Оценка воспроизводимости этого эксперимента была проведена с использованием G-критерия Кохрена для уровня значимости $p < 0,05$:

$$G_{\text{экс}} = \frac{S_{i \max}^2}{\sum_{i=1}^n S_i^2}, \quad (1)$$

где: $S_{i \max}^2$ — максимальное значение выборочной дисперсии по выживаемости в этом эксперименте.

Рассчитанное значение критерия Кохрена $G_{\text{экс}} = 0,26$, что меньше его табличного критического значения $G_{\text{кр}} = 0,4775$. Таким образом, подтверждается гипотеза об однородности дисперсий, т. е. эксперимент воспроизводим. Дисперсия воспроизводимости $S_{\text{воспр}}^2$ эксперимента в целом оценена как:

$$S_{\text{воспр}}^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n S_i^2, \quad (2)$$

Откуда $S_{\text{воспр}}^2 = 29,16$, т. е. стандартное отклонение (S_y) результата эксперимента на этом этапе его проведения составляет 5,4%.

Таблица 1. Влияние температуры замораживания и криопротекции на выживаемость культуры PL28 после замораживания

Table 1. Effect of freezing temperature and cryoprotection on survival of culture PL28 after freezing

Условия замораживания			Криопротектор					
			Контроль		Сахароза		Трегалоза	
Температура, °C	Параметр	KOE _{исх}	KOE	% выж.	KOE	%выж.	KOE	%выж.
минус (55 ± 1)	Y ₁₁	1280	1180	92,2	875	68,4	820	64,1
	Y ₁₂	1200	1020	85,0	850	70,8	800	66,7
	Y ₁₃	1050	980	93,3	738	70,2	688	65,5
	$\bar{Y}_1$	1177	1060	90,2	821	69,8	769	65,4
	S _i ²	—	—	20,4	—	1,7	—	1,7
минус (30 ± 1)	Y ₁₁	1350	820	60,7	750	55,6	1050	77,8
	Y ₁₂	1050	780	74,3	705	69,1	900	85,7
	Y ₁₃	1240	790	63,7	695	56,0	920	74,2
	$\bar{Y}_1$	1213	797	66,2	717	60,2	957	79,2
	S _i ²	—	—	50,8	—	58,6	—	34,7
минус (20 ± 1)	Y ₁₁	1410	1010	78,3	1062	75,4	738	52,3
	Y ₁₂	1540	1080	70,1	1100	71,4	625	40,6
	Y ₁₃	1380	990	71,7	1060	76,8	780	56,5
	$\bar{Y}_1$	1443	1027	73,4	1074	74,5	714	49,8
	S _i ²	—	—	18,6	—	7,8	—	68,2

где: KOE — количество колониеобразующих единиц, KOE_{исх} — исходное KOE, %выж — процент выживших KOE, Y_{ij} — значения выходных параметров, i — номер эксперимента, j — часть эксперимента. $\bar{Y}_i$ — средние значения параметра, S_i^2 — выборочные дисперсии значений выживаемости $\bar{Y}_i$.

Значимость и существование взаимосвязи влияния действующих факторов на выживаемость молочнокислых бактерий после замораживания определяли типовым двухфакторным дисперсионным анализом с повторениями. Результаты этого анализа представлены в Таблице 2.

¹ ГОСТ 52791–2007 «Консервы молочные. Молоко сухое. Технические условия». М.: Стандартинформ, 2008. — 10 с.

² ГОСТ 33951–2016 «Молоко и молочные продукты. Методы определения молочнокислых микроорганизмов». М.: Стандартинформ, 2016. — 15 с.

³ ГОСТ 32892–2014 «Молоко и молочная продукция. Метод измерения активной кислотности». М.: Стандартинформ, 2015. — 10 с.

Таблица 2. Значимость влияния температуры замораживания и криопротекции на выживаемость бактерий PL28 после замораживания

Table 2. Significance of an effect of freezing temperature and cryoprotection on survival of bacteria PL28 after freezing

Источник вариаций	F	p-значение	F-критическое
Температура	6,957	$5,772 \cdot 10^{-03}$	3,554
Криопротекторы	11,316	$6,570 \cdot 10^{-04}$	3,554
Взаимодействие	18,137	$3,979 \cdot 10^{-06}$	2,927

Исходя из результатов проведённого дисперсионного анализа можно сделать вывод о том, что температура замораживания бактерий и вид криопротектора имеют значимое влияние на выживаемость клеток ($p \ll 0,05$). Кроме того, значимое влияние имеет и сочетание определённой температуры с определённым криопротектором. Для визуальной оценки характера этого влияния на выживаемость клеток при замораживании приведён Рисунок 1.

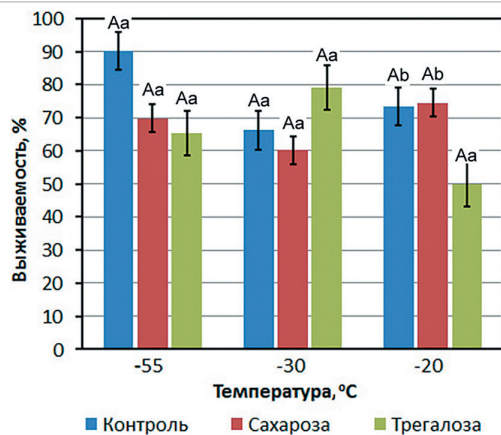


Рисунок 1. Влияние температуры замораживания и криопротекции на выживаемость бактерий PL28 после замораживания

Figure 1. Effect of freezing temperature and cryoprotection on survival of bacteria PL28 after freezing

Примечание: индексы (A) показывает статистически значимые различия ($p < 0,05$) внутри групп криопротекторов при различных температурах замораживания; индекс (a) показывают значимые различия ($p < 0,05$), (b) — отсутствие различий внутри групп криопротекторов при одинаковых температурах замораживания.

Как видно из приведенного Рисунка 1 и Таблицы 1, максимальное выживание бактерий PL28 при замораживании обеспечивается при температуре минус 55 °C без использования криопротектора. Отсюда следует, что характер действия трегалозы, как криопротектора, совершенно иной и наилучшие результаты при его использовании достигаются при температуре минус 30 °C.

В Таблице 3 приведены результаты определения влияния температуры предварительного замораживания и вида криопротектора на выживаемость и метаболическую активность культуры PL28 после окончания полного цикла лиофильной сушки. После завершения экспериментов были рассчитаны средние значения выживаемости бактерий и выборочные дисперсии для каждой группы полученных результатов.

Оценка воспроизводимости этого эксперимента в целом, также как и ранее, была проведена с использованием G-критерия Кохрена на уровне значимости $p < 0,05$ по формулам (1) и (2) отдельно для выживаемости и метаболической активности. Рассчитанное значение критерия Кохрена по этой таблице для оценки выживаемости бактерий $G_{\text{жс}} = 0,19$, что меньше его табличного критического значения $G_{\text{кр}} = 0,4775$. Также был рассчитан критерий Кохрена для оценки изменения метаболической активности бактерий после сушки, его значение $G_{\text{жс}} = 0,185$, что также меньше его табличного критического значения $G_{\text{кр}} = 0,4775$. Таким образом, подтверждается гипотеза об однородности дисперсий, т. е. эксперимент в целом воспроизводим.

Дисперсия воспроизводимости эксперимента в целом оценена по (2) и составляет $S^2_{\text{воспр}} = 14,39$ для выживаемости и $S^2_{\text{воспр}} = 0,001$ для метаболической активности. Откуда стандартное отклонение (S_y) результата эксперимента в целом по выживаемости бактерий составляет 3,8% и находится в пределах инструментальной погрешности прибора для измерения pH при оценке метаболической активности бактерий.

Таблица 3. Влияние температуры замораживания и криопротекции на выживаемость и метаболическую активность культуры PL28 после лиофильной сушки

Table 3. Effect of freezing temperature and cryoprotection on survival and metabolic activity of culture PL28 after freeze-drying

Условия эксперимента	Вид криопротектора	Параметр						
			Контроль	Сахароза	Трегалоза			
Температура замораживания, °C		Параметр	%выж.	ΔpH	%выж.	ΔpH	%выж.	ΔpH
минус (55 ± 1)		Y_{11}	25,78	0,34	41,25	0,4	32,03	0,36
		Y_{12}	23,33	0,29	37,5	0,35	33,33	0,37
		Y_{13}	23,81	0,38	45,24	0,43	26,19	0,41
		$\bar{Y}_1$	24,31	0,337	41,33	0,393	30,52	0,38
		S^2_i	1,686	0,002	14,98	0,002	14,46	$7 \cdot 10^{-04}$
минус (30 ± 1)		Y_{11}	28,15	0,36	52,78	0,33	68,52	0,37
		Y_{12}	33,33	0,42	57,52	0,42	61,9	0,43
		Y_{13}	33,87	0,4	50,64	0,39	62,09	0,41
		$\bar{Y}_1$	31,78	0,393	53,65	0,38	64,17	0,403
		S^2_i	9,974	$9 \cdot 10^{-04}$	12,4	0,002	14,2	$9 \cdot 10^{-04}$
минус (20 ± 1)		Y_{11}	41,84	0,32	50,35	0,38	46,1	0,45
		Y_{12}	35,06	0,41	40,58	0,43	36,49	0,42
		Y_{13}	40,57	0,37	46,37	0,41	39,13	0,4
		$\bar{Y}_1$	39,16	0,367	45,77	0,407	40,57	0,423
		S^2_i	12,99	0,002	24,14	$6 \cdot 10^{-04}$	24,65	$6 \cdot 10^{-04}$

где: КОЕ — количество колониеобразующих единиц, %выж — процент выживших КОЕ, ΔpH — изменение метаболической активности, Y_{ij} — значения выходных параметров, i — номер эксперимента, j — часть эксперимента. $\bar{Y}_i$ — средние значения параметра, S^2_i — выборочные дисперсии значений $\bar{Y}_i$.

Значимость и существование взаимосвязи влияния действующих факторов на выживаемость молочнокислых бактерий и изменение метаболической активности после замораживания и окончательной лиофильной сушки также определяли двухфакторным дисперсионным анализом с повторениями. Результаты этого анализа представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Значимость влияния температуры замораживания и криопротекции на выживаемость и метаболическую активность бактерий PL28 после замораживания и лиофилизации

Table 4. Significance of the effect of freezing temperature and cryoprotection on survival and metabolic activity of bacteria PL28 after freezing and freeze-drying

Источник вариаций	F	p-значение	F-критическое
Выживаемость			
Температура	49,798	$4,611 \cdot 10^{-08}$	3,554
Криопротекторы	42,876	$1,423 \cdot 10^{-07}$	3,554
Взаимодействие	16,020	$9,413 \cdot 10^{-06}$	2,927
Метаболическая активность			
Температура	1,593	0,230	3,554
Криопротекторы	2,547	0,106	3,554
Взаимодействие	0,888	0,490	2,927

Результаты проведённого дисперсионного анализа позволяют сделать вывод о том, что температура замораживания бактерий и вид криопротектора имеют значимое влияние на выживаемость клеток после их лиофильной сушки ($p \ll 0,05$). Значимое влияние имеет и сочетание определённой температуры с определённым криопротектором. Визуальную оценку характера этого влияния на выживаемость клеток после замораживания и их лиофильной сушки можно сделать по Рисунку 2.

Как видно из Рисунка 2 и Таблицы 3, максимальное выживание бактерий PL28 после замораживания и лиофильной сушки обеспечивается при температуре –30 °C с использованием трегалозы. Без использования криопротектора результаты наихудшие. Отсюда следует, что характер действия трегалозы, как криопротектора, остается неизменным как при замораживании, так и при сушке, в то время

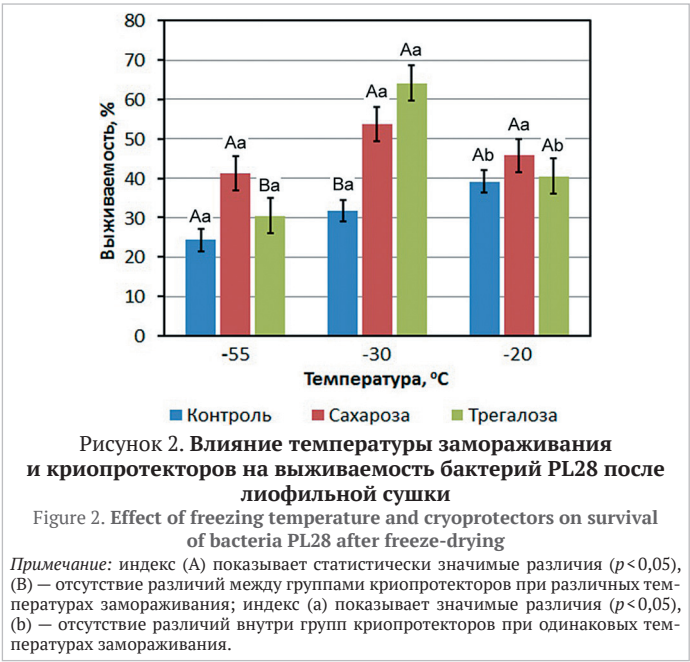


Рисунок 2. Влияние температуры замораживания и криопротекторов на выживаемость бактерий PL28 после лиофильной сушки

Figure 2. Effect of freezing temperature and cryoprotectors on survival of bacteria PL28 after freeze-drying

Примечание: индекс (A) показывает статистически значимые различия ($p < 0,05$), (B) — отсутствие различий между группами криопротекторов при различных температурах замораживания; индекс (a) показывает значимые различия ($p < 0,05$), (b) — отсутствие различий внутри групп криопротекторов при одинаковых температурах замораживания.

как отсутствие криопротектора отрицательно сказывается именно на этапе лиофильной сушки. Использование сахарозы даёт промежуточные результаты.

Влияние температуры и криопротекции на метаболическую активность бактерий PL28 при лиофильной сушке далее не рассматривается, так как дисперсионный анализ (Таблица 4) показал отсутствие статистической значимости результатов этой части эксперимента, $p > 0,05$.

Результаты, полученные в ходе этого эксперимента, позволяют оценить свойства использованных криопротекторов в качестве лиопротекторов, т. е. веществ, повышающих выживаемость бактерий непосредственно в процессе лиофильной сушки. Для этого из результатов по выживаемости после замораживания (Таблица 1) вычитали аналогичные результаты после сушки (Таблица 3) и формировали Таблицу 5.

Таблица 5. Величины гибели бактерий PL28 при лиофильной сушке

Table 5. Levels of death of bacteria PL28 upon freeze-drying

Условия эксперимента		Криопротектор		
		Контроль	Сахароза	Трегалоза
Температура, °C	Параметр	Гибель, %	Гибель, %	Гибель, %
минус (55 ± 1)	Y ₁₁	66,42	27,15	32,07
	Y ₁₂	61,67	33,3	33,37
	Y ₁₃	69,49	24,96	39,31
	Y ₁	65,89	28,47	34,88
	S _i ²	—	—	—
минус (30 ± 1)	Y ₁₁	32,55	2,82	9,28
	Y ₁₂	40,97	11,58	23,8
	Y ₁₃	29,83	5,36	12,11
	Y ₁	34,42	6,55	15,03
	S _i ²	—	—	—
минус (20 ± 1)	Y ₁₁	36,46	25,05	6,2
	Y ₁₂	35,04	30,82	4,11
	Y ₁₃	31,13	30,43	17,37
	Y ₁	34,24	28,73	9,23
	S _i ²	—	—	—

На основе полученных расчётов были построены графики, наглядно демонстрирующие влияние криопротекторов на гибель клеток PL28 при лиофильной сушке (Рисунок 3).

Как видно из Таблицы 5 и Рисунка 3 в любом случае максимальная гибель при лиофилизации наблюдается у клеток культуры PL28, замороженных при минус 55 °C и достигает 60% для клеток без криопротекторов. Использование криопротекторов в тех же условиях почти в два раза снижает гибель, а при замораживании клеток при минус 30 °C снижает гибель более, чем в пять раз. Таким образом, криопротекторы сахароза и трегалоза являются эффективными лиопротекторами для бактерий PL28, предварительно замороженных при температуре минус 3 °C.

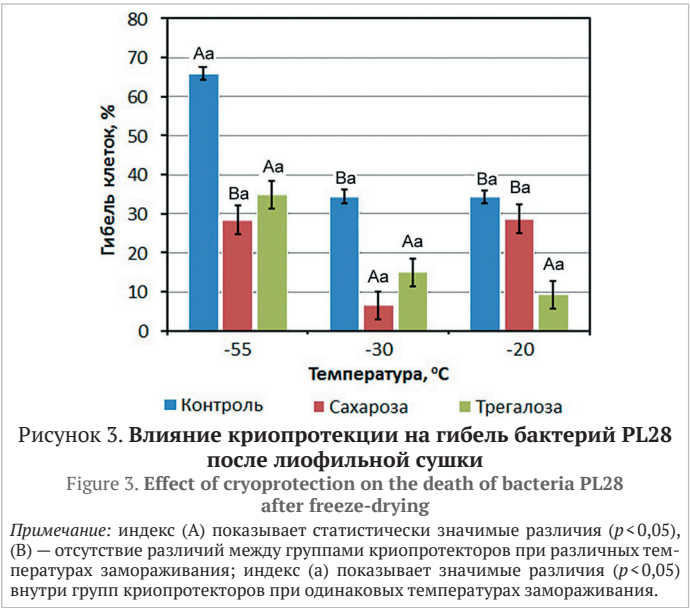


Рисунок 3. Влияние криопротекции на гибель бактерий PL28 после лиофильной сушки

Figure 3. Effect of cryoprotection on the death of bacteria PL28 after freeze-drying

Примечание: индекс (A) показывает статистически значимые различия ($p < 0,05$), (B) — отсутствие различий между группами криопротекторов при различных температурах замораживания; индекс (a) показывает значимые различия ($p < 0,05$) внутри групп криопротекторов при одинаковых температурах замораживания.

3.2. Изучение влияния температуры замораживания и характера криопротекции на выживаемость и метаболическую активность культуры PL37

Во второй части эксперимента исследовали культуру *L. plantarum* PL37. Для этого были проведены такие же, как и в первой части работы, двухфакторные трёхуровневые эксперименты с повторениями с теми же влияющими факторами. Результаты первого этапа этого эксперимента приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Результаты определения влияния температуры замораживания и характера криопротекции на выживаемость PL37 после замораживания

Table 6. Results of determining an effect of freezing temperature and character of cryoprotection on survival on PL37 after freezing

Условия замораживания		Криопротектор					
		Контроль		Сахароза		Трегалоза	
Температура, °C	Параметр	KOE _{исх}	KOE	%выж	KOE	%выж	KOE
минус (55 ± 1)	Y ₂₁	1400	1081	77,21	1311	93,65	1550
	Y ₂₂	1295	1015	78,38	1175	90,75	1363
	Y ₂₃	1350	988	73,22	1192	88,28	1420
	Y ₂	1348	1028	76,27	1226	90,89	1444
	S _i ²	—	—	7,31	—	7,22	—
минус (30 ± 1)	Y ₂₁	1530	1308	85,48	850	55,55	809
	Y ₂₂	1670	1383	82,82	890	53,32	804
	Y ₂₃	1570	1254	79,85	799	50,90	791
	Y ₂	1590	1315	82,72	846	53,26	801
	S _i ²	—	—	7,93	—	5,41	—
минус (20 ± 1)	Y ₂₁	1740	1466	84,24	954	54,82	663
	Y ₂₂	1825	1628	89,23	905	49,62	850
	Y ₂₃	1780	1535	86,22	860	52,75	880
	Y ₂	1782	1543	86,56	906	52,40	798
	S _i ²	—	—	6,31	—	6,85	—

где: KOE — количество колониеобразующих единиц, %выж — процент выживших KOE, ΔpH — изменение метаболической активности, Y_{ij} — значения выходных параметров, i — номер эксперимента, j — часть эксперимента. Y_i — средние значения параметра, S_i² — выборочные дисперсии значений Y_i.

Оценка воспроизводимости этого эксперимента также была проведена с использованием G-критерия Кохрена по формуле (1) для уровня значимости α = 0,05. Рассчитанное значение критерия Кохрена G_{крит} = 0,31, что меньше его табличного критического значения G_{кр} = 0,4775. Таким образом, подтверждается гипотеза об однородности дисперсий, т. е. эксперимент воспроизводим. Дисперсия воспроизводимости эксперимента в целом определена по формуле (2),

её значение $S_{воспр}^2 = 37,74$ т. е. стандартное отклонение (S_y) результата на этом этапе эксперимента составляет 6,15 %.

Значимость и существование взаимосвязи влияния действующих факторов на выживаемость молочнокислых бактерий (PL37) после замораживания также определяли двухфакторным дисперсионным анализом с повторениями. Результаты этого анализа представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Значимость влияния температуры замораживания и криопротекторов на выживаемость бактерий PL37 после замораживания

Table 7. Significance of an effect of freezing temperature and cryoprotectors of survival of bacteria PL37 after freezing

Источник вариаций	F	p-значение	F-критическое
Температура	222,52	$2,02 \cdot 10^{-13}$	3,554
Криопротекторы	181,32	$1,18 \cdot 10^{-12}$	3,554
Взаимодействие	109,75	$2,19 \cdot 10^{-12}$	2,927

Полученные результаты дисперсионного анализа показывают, что температура замораживания бактерий и вид криопротектора имеют значимое влияние на выживаемость клеток, $p \ll 0,05$. Также значимое влияние имеет и сочетание определённой температуры с определённым криопротектором. Для иллюстрации характера этого влияния на выживаемость клеток после замораживания приведён Рисунок 4.

Как видно из Рисунка 4 и Таблицы 6, максимальная выживаемость бактерий PL37 при замораживании обеспечивается при температуре -55°C с использованием криопротектора сахарозы. Отсюда следует, что характер действия трегалозы на выживаемость PL37 при замораживании совпадает с действием сахарозы, но это действие несколько слабее. При более высоких температурах замораживания действие этих криопротекторов ослабевает и при температуре -20°C наилучшая выживаемость достигается без их использования.

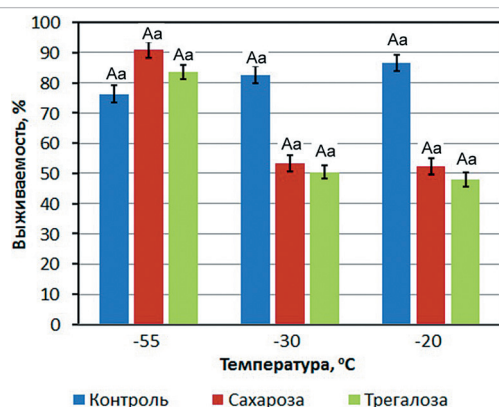


Рисунок 4. Влияние температуры замораживания и криопротекции на выживаемость бактерий PL37 после их замораживания

Figure 4. Effect of freezing temperature and cryoprotection on survival of bacteria PL37 after their freezing

Примечание: индекс (A) показывает статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами криопротекторов при различных температурах замораживания; индекс (a) показывает значимые различия ($p < 0,05$) внутри групп криопротекторов при одинаковых температурах замораживания.

Если сравнивать результаты влияния вида криопротекторов при различных температурах при замораживании на выживаемость культур PL28 и PL37, то нетрудно заметить, что условия их максимальной выживаемости различаются, что предполагает штаммовое разнообразие в устойчивости бактериальных культур к замораживанию.

В Таблице 8 приведены результаты определения влияния температуры замораживания и характера криопротекции на выживаемость и метаболическую активность молочнокислых бактерий (PL37) после окончания лиофильной сушки. После завершения экспериментов были рассчитаны средние значения выживаемости бактерий и выборочные дисперсии для каждой группы полученных результатов.

Оценка воспроизводимости этого эксперимента в целом была проведена с использованием G-критерия Кохрена на уровне значимости $p < 0,05$ по формулам (1) и (2). Рассчитанное значение критерия Кохрена по этой таблице для оценки выживаемости бактерий $G_{экс} = 0,19$, что меньше его табличного критического значения $G_{кр} = 0,4775$. Таким образом, подтверждается гипотеза об однородности дисперсий, т. е. эксперимент в целом воспроизводим.

Таблица 8. Влияние температуры замораживания и характера криопротекции на выживаемость и метаболическую активность культуры PL37 после лиофильной сушки

Table 8. Effect of freezing temperature and character of cryoprotection on survival and metabolic activity of culture PL37 after freeze-drying

Условия замораживания			Криопротектор					
			Контроль		Сахароза		Трегалоза	
Температура, °C	Параметр	КОЕисх	КОЕ	%выж	КОЕ	%выж	КОЕ	%выж
минус (55 ± 1)	Y ₂₁	1400	753	53,80	975	56,84	707	50,51
	Y ₂₂	1295	597	46,10	796	53,55	676	52,2
	Y ₂₃	1350	695	51,45	733	54,32	651	48,25
	Ȳ ₂	1348	682	50,45	835	54,90	678	50,32
	S _i ²	—	—	15,57	—	2,96	—	3,92
минус (30 ± 1)	Y ₂₁	1530	395	41,95	793	51,86	761	49,74
	Y ₂₂	1670	530	38,54	799	47,82	775	46,85
	Y ₂₃	1570	490	44,15	858	54,65	831	52,95
	Ȳ ₂	1590	472	41,55	817	51,44	789	49,85
	S _i ²	—	—	7,99	—	11,79	—	9,31
минус (20 ± 1)	Y ₂₁	1740	290	20,94	535	30,72	560	32,19
	Y ₂₂	1825	380	23,25	814	34,50	618	33,88
	Y ₂₃	1780	325	24,85	634	35,64	645	36,25
	Ȳ ₂	1782	332	23,01	661	33,62	608	34,11
	S _i ²	—	—	3,86	—	6,63	—	4,15

где: KOE — количество колониеобразующих единиц, %выж — процент выживших KOE, ΔpH — изменение метаболической активности, Y_{ij} — значения выходных параметров, i — номер эксперимента, j — часть эксперимента. $\bar{Y}_i$ — средние значения параметра, S_i^2 — выборочные дисперсии значений Y_i

Дисперсия воспроизводимости эксперимента в целом оценена по (2) и составляет $S_{воспр}^2 = 14,39$ для выживаемости. Откуда стандартное отклонение (S_y) результата этого эксперимента в целом по выживаемости бактерий составляет 3,8 %.

Значимость и существование взаимосвязи влияния действующих факторов на выживаемость молочнокислых бактерий (PL37) после замораживания и лиофильной сушки также определяли двухфакторным дисперсионным анализом с повторениями. Результаты этого анализа представлены в Таблице 9.

Таблица 9. Значимость влияния температуры замораживания и криопротекторов на выживаемость бактерий PL37 после замораживания и лиофилизации

Table 9. Significance of an effect of freezing temperature and cryoprotectors on survival of bacteria PL37 after freezing and lyophilization

Источник вариаций	F	p-значение	F-критическое
Температура	160,74	$3,31 \cdot 10^{-12}$	3,554
Криопротекторы	23,25	$1,02 \cdot 10^{-5}$	3,554
Взаимодействие	3,53	0,026	2,927

Полученные результаты дисперсионного анализа показывают, что температура замораживания бактерий и вид криопротектора имеют значимое влияние ($p \ll 0,05$) на выживаемость клеток после лиофилизационной сушки. Также значимое влияние имеет и сочетание определённой температуры с определённым криопротектором. Для иллюстрации характера этого влияния на выживаемость клеток после замораживания приведён Рисунок 5.

Из приведённого Рисунка 5 видно, что для бактерий PL37 зависимость выживаемости от использования криопротекторов или их отсутствия при лиофилизации имеет схожий характер, при этом несколько большая выживаемость наблюдается с использованием сахарозы, а наилучший результат, в любом случае, получен при замораживании минус 20°C .

Оценка действия криопротекторов как лиопротекторов была проведена также, как и в первой части работы. Для этого из результатов по выживаемости после замораживания (Таблица 6) вычитали аналогичные результаты после лиофильной сушки (Таблица 8), а полученные результаты сводили в таблицу (Таблица 10).

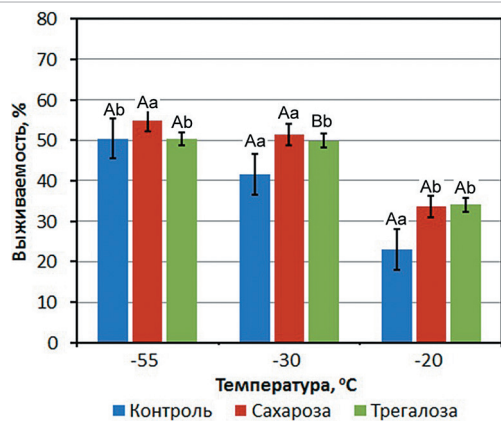


Рисунок 5. Влияние температуры замораживания и криопротекторов на выживаемость бактерий PL37 после лиофильной сушки

Figure 5. Effect of freezing temperature and cryoprotectors on survival of culture PL37 after freeze-drying

Примечание: индекс (A) показывают статистически значимые различия ($p < 0,05$), (B) — отсутствие различий между группами криопротекторов при различных температурах замораживания; индекс (a) показывает значимые различия ($p < 0,05$), (b) — отсутствие различий внутри групп криопротекторов при одинаковых температурах замораживания.

Таблица 10. Величины гибели бактерий PL37 при лиофильной сушке

Table 10. Levels of death of bacteria PL37 upon freeze-drying

Условия эксперимента		Криопротектор		
Температура, °C	Параметр	Контроль	Сахароза	Трегалоза
		Гибель, %	Гибель, %	Гибель, %
минус (55 ± 1)	Y_{11}	23,41	36,81	35,64
	Y_{12}	32,28	37,20	31,07
	Y_{13}	21,77	33,96	32,80
	$\bar{Y}_1$	25,82	35,99	33,17
минус (30 ± 1)	Y_{11}	43,53	3,69	3,13
	Y_{12}	44,28	5,50	1,29
	Y_{13}	35,7	0,00	0,00
	$\bar{Y}_1$	41,17	3,06	1,47
минус (20 ± 1)	Y_{11}	63,3	24,10	15,40
	Y_{12}	65,98	15,12	12,70
	Y_{13}	61,37	17,11	13,17
	$\bar{Y}_1$	63,55	18,78	13,76

На основе данных Таблицы 10 были построены графики, демонстрирующие влияние криопротекторов на гибель клеток PL37 при лиофильной сушке (Рисунок 6).

Как видно из Таблицы 10 и Рисунка 6, максимальная гибель при лиофилизации наблюдается для клеток без криопротекторов, замороженных при минус 55 °C и составляет более 60 %. Использование криопротекторов резко меняет зависимость уровня гибели клеток от температуры замораживания. Действие криопротекторов имеет сходный характер и достигает максимального эффекта для клеток, замороженных при температуре -30 °C, снижая их гибель до единиц процентов. В тоже время замораживание клеток при минус 55 °C сопровождается повышенной гибелью бактерий при использовании криопротекторов. Таким образом, для бактериальной культуры PL37 криопротекторы сахароза и трегалоза являются эффективными лиопротекторами при температуре замораживания близкой к -30 °C.

Таблица 11. Наилучшие условия лиофилизации лактобацилл

Table 11. The best conditions of lyophilization of lactobacilli

Номер штамма	Стадия лиофилизации	Выживаемость		Метаболическая активность	
		Температура, °C	Протектор	Температура, °C	Протектор
PL28	Замораживание	минус (55 ± 1)	Без протектора	—	—
	Сушка	минус (30 ± 1)	Трегалоза	минус (20 ± 1)	Трегалоза
PL37	Замораживание	минус (55 ± 1)	Без протектора	—	—
	Сушка	минус (55 ± 1)	Трегалоза	минус (20 ± 1)	Трегалоза

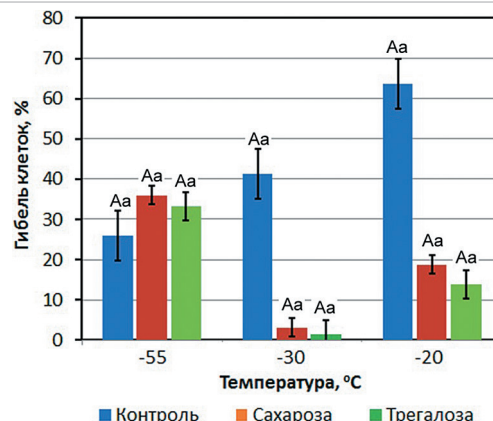


Рисунок 6. Влияние криопротекции на гибель бактерий PL37 после лиофильной сушки

Figure 6. Effect of cryoprotection on death of bacteria PL37 after freeze-drying

Примечание: индекс (A) показывает статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами криопротекторов при различных температурах замораживания; индекс (a) показывает значимые различия ($p < 0,05$) внутри групп криопротекторов при одинаковых температурах замораживания.

Как показали проведенные исследования наибольшая эффективность действия сахарозы и трегалозы в качестве лиопротекторов при лиофильной сушке, для обоих штаммов бактерий (PL28 и PL37) находится в одном и том же диапазоне температур предварительного замораживания.

По результатам проведенных исследований составлена итоговая таблица по наилучшим условиям замораживания и лиофильной сушке молочнокислых палочек *L. plantarum* (Таблица 11). После замораживания выживаемость культуры PL28 при температуре минус 55 °C без криопротектора составляла 90,2 %, а культуры PL37 при этих же условиях — 90,89 %. После завершения лиофилизации сохранность обоих штаммов снизилась и составила 64,2 % для культуры PL28 при температуре минус 30 °C с добавлением трегалозы и 54,9 % для культуры PL37 при температуре минус 55 °C с добавлением трегалозы.

Из полученных результатов проведенных исследований следует, что выживаемость и метаболическая активность изученных культур мезофильных молочнокислых палочек существенно зависят от условий лиофильной сушки и имеют штаммовый характер.

Вместе с тем зависимости от влияющих факторов для них различны, максимальная выживаемость не всегда совпадает с максимальной метаболической активностью. В связи с этим целесообразно ввести обобщенный показатель (18) эффективности процесса лиофильной сушки.

$$K_{эф} = K_{ма} \frac{K_v}{100}, \quad (3)$$

где: $K_{ма}$ — коэффициент метаболической активности, K_v — коэффициент выживаемости.

В Таблице 12 приведены результаты расчета этого коэффициента по результатам анализа данных, полученных в экспериментах.

Из Таблицы 12 видно (выделено жирным шрифтом), что при сушке культуры PL28 наибольшая эффективность процесса осуществляется при температуре заморозки минус 30 °C в присутствии криопротектора трегалозы, что соответствует его максимальной выживаемости. При сушке штамма PL37 наибольшая эффективность процесса при температуре минус 55 °C в присутствии трегалозы, что также соответствует максимальной выживаемости этих бактерий.

Леофилизированные культуры заложены на хранение с целью наблюдения за сохранением количества жизнеспособных клеток и метаболической активности в процессе длительного хранения.

Таблица 12. Коэффициенты эффективности процесса лиофильной сушки

Table 12. Coefficients of effectiveness of the freeze-drying process

Условия эксперимента		$K_{эф}$ PL28	$K_{эф}$ PL37
Температура замораживания, °C	Вид криопротектора		
минус (30 ± 1)	трегалоза	0,199	0,205
минус (20 ± 1)	трегалоза	0,183	0,231
минус (55 ± 1)	трегалоза	0,168	0,256
минус (30 ± 1)	сахароза	0,178	0,183
минус (20 ± 1)	сахароза	0,161	0,216
минус (55 ± 1)	сахароза	0,144	0,247
минус (30 ± 1)	отсутствует	0,158	0,163
минус (20 ± 1)	отсутствует	0,14	0,201
минус (55 ± 1)	отсутствует	0,122	0,237

3.3. Обсуждение

Сравнение результатов по влиянию температуры замораживания бактерий и характера криопротекции на их выживаемость после замораживания и результатов выживаемости после полного цикла лиофилизации, показало, что наилучшие результаты по выживаемости разных штаммов получены в различных условиях. Так после замораживания максимальная сохранность клеток культуры PL28 составила 90,2% при температуре замораживания минус 55 °C без добавления криопротектора, а после сушки максимально выживало 64,2% при температуре замораживания минус 30 °C с добавлением криопротектора трегалозы. В присутствии сахарозы после сушки наибольшая сохранность жизнеспособности культуры PL28 составила 53,7%. Для штамма PL37 после замораживания выявлена максимальная выживаемость на уровне 90,9% при тех же условиях, но сохранность после сушки была наиболее высокой при температуре минус 55 °C в присутствии трегалозы и составила 54,9%. То есть из двух использованных в эксперименте дисахаридов лучший эффект обеспечило добавление трегалозы, что согласуется с данными других исследователей [11,23].

По-видимому, это связано с тем, что на этапе замораживания происходит кристаллизация влаги вокруг клеток и внутри, а в зависимости от скорости кристаллизации образуются крупные или мелкие кристаллы льда, повреждающие бактериальные клетки. Очевидно, что при очень низких температурах, т. е. высокой скорости замораживания, образуются более мелкие кристаллы, наносящие меньшие повреждения, а отсутствие криопротекторной защитной оболочки также способствует более высокой скорости замораживания.

После замораживания при лиофильной сушке происходит сублимация воды с поверхности бактериальных клеток в условиях низкого давления и подогрева и, возможно, непосредственно из бактериальных клеток, что может вызывать их гибель. В этом случае, наличие эффективного криопротектора, защищающего клетки бактерий от излишнего удаления из них воды, обеспечивает их более высокую сохранность. По сравнению с этим температура замораживания уже оказывает меньшее влияние. Для обоих исследованных штаммов лактобацилл превалирующим фактором на этапе лиофильной сушки является вид криопротектора (или его отсутствие), а не температура замораживания.

Степень выживаемости культур PL28 и PL37 после сушки при разных условиях в нашем исследовании согласуется с результатами других исследований. По данным G.-Q. Wang с соавторами [25] для трёх штаммов *L. plantarum* также показан наибольший защитный эффект трегалозы, самая высокая выживаемость выявлена у двух штаммов после сушки с предварительной температурой замораживания минус 60 °C, а у одного штамма была примерно одинаковой при температуре минус 20, 30 и 60 °C. Показатели выживаемости после сушки также были значительно ниже, чем при замораживании, и также отмечены существенные различия между штаммами. Однако при этом у одного штамма сохранение жизнеспособности было выше, чем у наших культур и достигло около 80% [25]. Другими авторами установлена максимальная криозащита при добавлении 15% трегалозы [26].

В другом исследовании криопротекторы также положительно влияли на выживаемость мезофильных молочнокислых палочек *L. fermentum* после сушки и, что интересно, при длительном хранении. Но наибольший защитный эффект установлен при добавлении к отмытым клеткам лактобацилл 10% обезжиренного молока с 5% глю-

тамата, который составил 100% непосредственно после сушки и 87% после 1 года хранения. Немного меньший эффект получен с 10% обезжиренным молоком (96% и 74% соответственно), а трегалоза практически не оказала защиты — выживаемость составила всего 7% [11].

Имеются данные и о значительном защитном эффекте других видов и концентраций криопротекторов. Kavak с соавторами [27] выявили самую высокую выживаемость пробиотического штамма *L. plantarum* NBC99 при лиофильной сушке с комплексной защитной средой, содержащей 25% обезжиренного молока, 8,71% мальтодекстрина и 1,13% сахарозы. Спектр криопротекторов продолжает расширяться. В 2022 г. впервые был оценен защитный потенциал различных биомасс микроводорослей для пробиотических лактобацилл (*L. acidophilus* La-05 и *L. casei* Lc-01) при сублимации и хранении. Биомасса микроводорослей обладала таким же или более выраженным криопротекторным потенциалом в части предотвращения повреждения целостности мембран клеток и выживаемости, чем признанный криопротектор — фруктоолигосахарид, и эти эффекты варьировались у исследуемых штаммов [28]. В других случаях установлено улучшение защитного действия обезжиренного молока при добавлении различных веществ: 1% экстракта кожуры граната при сублимации *Lactobacillus gasseri* H87 [29]; 2% диоксида кремния [30]. При исследовании в качестве криопротекторов 10% сиропа агавы и смесей, состоящих из 5% сахарозы и 5% трегалозы; 10% обезжиренного молока, 1% глюкозы и 0,5% дрожжевого экстракта; 0,1% пептона и 1,2% сорбита, при сублимационной сушке *L. plantarum* ATCC14917 было обнаружено улучшение выживаемости в вариантах с первыми тремя протекторами с высоким содержанием сахаров и/или белка [31]. Была определена способность рисового белка, дополненного различными пребиотиками, защищать *L. plantarum* TISTR2075 при лиофильной сушке и последующем хранении, при этом комбинация рисового белка и фруктоолигосахаридов обеспечивала наилучшую стабильность при хранении с наименьшей удельной скоростью гибели клеток [32].

Это свидетельствует о необходимости индивидуального подбора криопротекторов не только к различным видам микроорганизмов, но и к индивидуальным штаммам и согласуется с мнением Rockinger с соавторами [2] об отсутствии универсальных криопротекторов. С учётом того, что в наших условиях бактериальные клетки культивировали в 10% обезжиренном молоке с 0,2% дрожжевого автолизата и 0,1% твин 80 и не отделяли их от молочной среды, в экспериментах не использовали комплексных защитных сред, добавление отдельных дисахаридов было вполне обоснованным и дало положительный эффект по сравнению с сушкой культур в молоке без криопротекторов.

4. Заключение

Проведённые исследования позволили выявить различия во влиянии режимов предварительного замораживания и характера криопротекции на коллекционные культуры *L. plantarum* 28 и 37, их выживаемость и метаболическую активность.

Определено, что превалирующим фактором, влияющим на сохранение жизнеспособности этих культур, является вид криопротектора или его отсутствие. Температура предварительного замораживания менее значима и специфична для каждого штамма. Лучшие показатели выживаемости получены с применением в качестве криопротектора 20% раствора трегалозы в соотношении 4:1 при лиофилизации обоих исследуемых штаммов *L. plantarum*. Максимальная выживаемость культур *L. plantarum* 28 достигается в присутствии трегалозы при замораживании при температуре минус 30 °C, культуры *L. plantarum* 37 также в присутствии трегалозы при замораживании при температуре минус 55 °C.

Исследования показали возможность увеличения выживаемости коллекционных культур в процессе лиофилизации за счет добавления определённых криопротекторов и использования оптимальных режимов предварительного замораживания при их консервации.

Полученные результаты важны не только для разработки индивидуальных режимов лиофилизации и сохранения ценных коллекционных культур, но и для практического использования в промышленной технологии при производстве моновидовых бактериальных заквасок, так как именно исследованные штаммы и входят в состав этих заквасок.

В перспективе дальнейших исследований планируется проведение экспериментальных работ по выработке бактериальных концентрированных заквасок в производственных условиях, на основании которых будут разработаны рекомендации по выбору режимов предварительного замораживания и характера криопротекции других штаммов и видов коллекционных культур.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Охупкина, В. Ю. (2009). Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лиофилизация. *Теоретическая и прикладная экология*, 4, 21–32. [Okhapkina, V. Yu. (2009). Methods of microbe cultures maintenance. Part 2. Liophilisation. *Theoretical and Applied Ecology*, 4, 21–32. (In Russian)]
- 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>
- 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>
- Papadimitriou, K., Alegria, A., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobetti, M., Kleerebezem, M. et al. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837–890. <https://doi.org/10.1128/mmr.00076-15>
- Cheng, Z., Yan, X., Wu, J., Weng, P., Wu, Z. (2022). Effects of freeze drying in complex lyoprotectants on the survival, and membrane fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum* L1 and *Lactobacillus fermentum* L2. *Cryobiology*, 105, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.01.003>
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x>
- Ge, S., Han, J., Sun, Q., Zhou, Q., Ye, Z., Li, P. et al. (2024). Research progress on improving the freeze-drying resistance of probiotics: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 147, Article 104425. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104425>
- Reddy, K.B.P.K., Awasthi, S.P., Madhu, A.N., Prapulla, S.G. (2009). Role of cryoprotectants on the viability and functional properties of probiotic lactic acid bacteria during freeze drying. *Food Biotechnology*, 23(3), 243–265. <https://doi.org/10.1080/08905430903106811>
- Синева, А.Н., Терехова, Л.П. (2018). Долгосрочное хранение микроорганизмов. Глава в книге: Результаты исследований естественных и точных наук: междисциплинарный подход и сверхаддитивный эффект. Самара: Поволжская научная корпорация, 2018. [Sineva, A.N., Terekhova, L.P. (2018). Long-term storage of microorganisms. Chapter in a book: Results of the study of natural and exact sciences: Interdisciplinary approach and superadditive effect. Samara: Volga Region's Scientific Corporation, 2018. (In Russian)]
- Rakchai, N., Maneerat, S. (2022). Improved survival of freeze-dried *Lactobacillus pentosus* Sy130 and applied as a Co-culture starter with *Lactobacillus plantarum* KJ03 for fermenting stink bean (Sataw-Dong). *Indian Journal of Microbiology*, 62(2), 215–224. <https://doi.org/10.1007/s12088-021-00997-5>
- Stefanello, R.F., Nabeshima, E.H., Iamanaka, B.T., Ludwig, A., Fries, L.L.M., Bernardi, A.O. et al. (2019) Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, 115, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.044>
- Nguyen, T. H., Kim, J.-S., Kwon, H.-J., Kang, C.-H. (2023). The effect of a glutathione (Gsh)-Containing cryo-protectant on the viability of probiotic cells using a freeze-drying process. *Fermentation*, 9(2), Article 187. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020187>
- Polo, L., Manes-Lazaro, R., Olmeda, I., Cruz-Pio, L.E., Medina, Á., Ferrer, S. et al. (2017). Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1603–1614. <https://doi.org/10.1111/jam.13465>
- Yang, Y., Wang, R.-X., Yang, Y.-X., E, J.-J., Wang, J.-G. (2022). Effects of different prefreezing temperatures on the freeze-drying survival rate and stability during room temperature storage of *Lactiplantibacillus plantarum* LIP-1. *Food Bioscience*, 50, Article 102087. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102087>
- Chen, Z., E, J., Ma, R., Zhang, J., Yao, C., Wang, R., Zhang, Q. et al. (2022). The effect of aspartic acid on the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 and its inherent mechanism. *LWT*, 155, Article 112929. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112929>
- Heravi, R.M., Ghiasvand, M., Rezaei, E., Kargar, F. (2022). Assessing the viability of three *Lactobacillus* bacterial species protected in the cryoprotectants containing whey and maltodextrin during freeze-drying process. *Letters in Applied Microbiology*, 74(4), 505–512. <https://doi.org/10.1111/lam.13631>
- Li, X.-m., Che, L.-h., Wu, Y., Li, C., Xu, B.-c. (2024). An effective strategy for improving the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus curvatus* and its potential protective mechanism. *Food Bioscience*, 58, Article 103794. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103794>
- Haiping, L., Pei, Z., Shuhai, Z., Dengyun, Z., Herong, F., Su, Y., et al. (2019). Protective effect of polysaccharides from *Pholiota nameko* on *Lactobacillus casei* ATCC334 subjected to freeze-drying. *LWT*, 115, Article 108463. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108463>
- 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), 5–10. [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. *Yu. A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*, 15(2), 5–10. (In Russian)]
- Archacka, M., Białas, 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>
- Lee, S.-B., Kim, D.-H., Park, H.-D. (2016). Effects of protectant and rehydration conditions on the survival rate and malolactic fermentation efficiency of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* Jh287. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 7853–7863. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7509-5>
- Oluwatosisin, S. O., Tai, S. L., Fagan-Endres, M. A. (2021). Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic-towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic. *Biotechnology Reports*, 33, Article e00696. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00696>
- Cui, S., Hu, M., Sun, Y., Mao, B., Zhang, Q., Zhao, J. et al. (2023). Effect of trehalose and lactose treatments on the freeze-drying resistance of lactic acid bacteria in high-density culture. *Microorganisms*, 11(1), Article 48. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010048>
- Gao, X., Kong, J., Zhu, H., Mao, B., Cui, S., Zhao, J. (2022). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Lactococcus* response to environmental stress: Mechanisms and application of cross-protection to improve resistance against freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 802–821. <https://doi.org/10.1111/jam.15251>
- Wang, G.-Q., Pu, J., Yu, X.-Q., Xia, Y.-J., Ai, L.-Z. (2020). Influence of freezing 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>
- Yuste, A., Arosemena, E. L., Calvo, M. (2021). Study of the probiotic potential and evaluation of the survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* lyophilized as a function of cryoprotectant. *Scientific Reports*, 11(1), Article 19078. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98723-0>
- Kavak, A.E., Zent, I., Özdemir, A., Dertli, E. (2024). Optimization of cryoprotectant formulation to enhance the viability of *Lactiplantibacillus plantarum* NBC99 isolated from human origin. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 54(7), 958–966. <https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2312450>
- Mafaldo, M., de Medeiros, V.P.B., da Costa, W.K.A., da Costa Sassi, C.F., da Costa Lima, M., de Souza, E.L. et al. (2022). Survival during long-term storage, membrane integrity, and ultrastructural aspects of *Lactobacillus acidophilus* 05 and *Lactocaseibacillus casei* 01 freeze-dried with freshwater microalgae biomass. *Food Research International*, 159, Article 111620. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111620>
- Qu, Y., Yu, C., Gan, T., Huang, B., Huang, S., Yu, J. et al. (2023). Protective effect of cryo by-products on *Lactobacillus gasseri* H87 during freeze-drying and storage. *Drying Technology*, 41(10), 1595–1604. <https://doi.org/10.1080/07373937.2023.2167828>
- Явников, Н.В. (2022). Влияние различных криопротекторных компонентов на выживаемость пробиотических микроорганизмов после лиофильной сушки. *Международный вестник ветеринарии*, 1, 69–73. [Yavnikov, N.V. (2022). The effect of various cryoprotective components on the survival of probiotic microorganisms after freeze drying. *International Journal of Veterinary Medicine*, 1, 69–73. (In Russian)] <https://doi.org/10.52419/issn2072-2419.2022.1.69>
- Marcial-Coba, M.S., Cieplak, T., Cahú, T.B., Blennow, A., Knøchel, S., Nielsen, D.S. (2018). Viability of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, storage and *in vitro* simulated upper gastrointestinal tract passage. *Food and Function*, 9(11), 5868–5879. <https://doi.org/10.1039/c8fo01331d>
- Savedboworn, W., Teawsomboonkit, K., Surichay, S., Riansa-Ngawong, W., Rittisak, S., Charoen, R. et al. (2019). Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 795–805. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0523-x>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Сорокина Нинель Петровна — кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник, отдел микробиологических исследований, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, ул. Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-485-329-82-05 E-mail: n.sorokina@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-1108-3695 Смыков Игорь Тимофеевич — доктор технических наук, главный научный сотрудник, отдел физико-химических исследований, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, ул. Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-485-329-81-21 E-mail: i.smykov@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5663-3662 Кучеренко Ирина Валентиновна — старший научный сотрудник, отдел микробиологических исследований, 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 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 Дуганова Анна Юрьевна — младший научный сотрудник, аспирант, лаборатория селекции микроорганизмов, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, ул. Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-485-329-82-33 E-mail: a.duganova@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-9033-5928	Ninel P. Sorokina, Candidate of Technical Sciences, Leading Researcher, Department of Microbiological Research, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-485-329-82-05 E-mail: n.sorokina@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-8251-992X Igor' T. Smykov, Doctor of Technical Sciences, Chief Researcher, Department of Physico-chemical Research, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-485-329-81-21 E-mail: i.smykov@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5663-3662 Irina V. Kucherenko, Senior Researcher, Department of Microbiological Research, 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 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 Anna Yu. Duganova, Junior Researcher, Graduate Student, Microorganism Selection Laboratory, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-485-329-82-33 E-mail: a.duganova@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-9033-5928
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	The authors are equally involved in writing the manuscript and are equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.