

*О.С. Прищепова, Н.С. Кравченко, С.Б. Борунова, С.Л. Василенко,
Н.Н. Фурик
РУП «Институт мясо-молочной промышленности»*

ИЗУЧЕНИЕ КРИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ КОМПОНЕНТОВ ЗАЩИТНЫХ СРЕД В ОТНОШЕНИИ КУЛЬТУР РОДА *LACTOBACILLUS*

Определено влияние сахарозы, фруктозы, инулина, аргинина, глицерина, натрия лимоннокислого и натрия уксуснокислого на выживаемость культур лактобацилл, различающихся чувствительностью к замораживанию.

Введение

Основой создания продуктов пробиотической направленности является закваска или бактериальный концентрат, состоящие из специально подобранных штаммов микроорганизмов, которые вносятся в подготовленное сырье.

Одним из способов консервирования микробной массы является замораживание бактериальных клеток при сверхнизких температурах. В настоящее время во всем мире активно проводятся исследования, направленные на разработку технологии производства замороженных бактериальных концентратов прямого внесения [4–0]. Преимущества данного метода консервации состоят в его простоте и удобстве, минимуме подготовительной работы, быстром извлечении хранимого материала для восстановления после замораживания. При использовании этого метода консервации довольно редки генетические изменения, а культуры микроорганизмов, сохраняемые таким методом, оказываются менее поврежденными и имеют более высокий уровень жизнеспособности, чем при высушивании и лиофилизации [4, 10, 3]. Исследования, направленные на отработку режимов криоконсервации, активно ведутся для целого ряда видов и штаммов микроорганизмов во всем мире. Однако универсальных способов криоконсервации нет – для каждого вида микроорганизмов необходимо подбирать индивидуальные.

Целью данного исследования являлся поиск веществ, обладающих криопротекторными свойствами на культуры лактобацилл, различающиеся чувствительностью к замораживанию (высокой, средней и низкой).

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись три штамма лактобацилл из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий: *L. plantarum* 2645 ML-O, *L. helveticus* 2389 LA-AV, *L. delbrueckii subsp. lactis* 2636 TL-A.

Культивирование микроорганизмов осуществляли в жидкой или агаризованной (содержала 0,15 % агара) MRS-среде [6], инкубировали в термостате при 34 ± 1 °C (*L. plantarum*), 37 ± 1 °C (*L. helveticus*) и 42 ± 2 °C (*L. delbrueckii* subsp. *lactis*).

Защитные среды. Исследуемые вещества в требуемой концентрации растворяли в дистиллированной воде, подогревали до полного растворения и стерилизовали при 121 ± 1 °C в течение 12 мин.

Для получения 16 ± 2 ч бактериальных культур суспензию лактобацилл в количестве 5 мл вносили в 500 мл жидкой среды MRS. Инкубировали в термостате при оптимальной температуре в течение 16 ± 2 ч.

Замораживание бактерий при сверхнизких температурах осуществляли следующим образом. 16 ± 2 часовые культуры лактобацилл осаждали центрифугированием на лабораторной центрифуге при 5 000 об/мин в течение 10 мин, в полученную биомассу добавляли исследуемый криопротектор в количестве 1:1, тщательно перемешивали и разливали по 1,2 мл в полипропиленовые пробирки. Пробирки с культурой, смешанной с криопротектором, помещали в жидкий азот, выдерживали в нем в течение 1 мин, после чего хранили в морозильной камере при температуре -25 ± 2 °C в течение 24 ± 2 ч.

Замороженные бактериальные культуры размораживали на водяной бане при 37 ± 1 °C в течении 2 мин и из соответствующих разведений делали высевы для определения количества жизнеспособных клеток.

Результаты и их обсуждение

Одним из методов увеличения количества клеток микроорганизмов при замораживании является использование в составе защитной среды веществ, обладающих криопротекторными свойствами. Использование криопротекторов ослабляет эффект кристаллизации, изменяя ее характер, препятствует слипанию и денатурации макромолекул, способствует сохранению целостности мембран клеток. В присутствии криопротектора вымораживание фракции воды и криозащитной среды протекает в широком диапазоне температур и завершается, когда концентрация невымерзшей воды достигает величины 20–30%. Увеличение исходной концентрации криопротектора приводит к снижению роста концентраций вне- и внутриклеточных солей. В присутствии криопротекторов соли либо вообще не концентрируются до повреждающих пределов, либо эти пределы достигаются в зоне температур, когда развитие повреждений протекает медленно. Возникающие при вымораживании воды и криозащитной среды гипертонические концентрации криопротектора вызывают обезвоживание клеток, что, в свою очередь, повышает концентрацию внутриклеточных коллоидов. Последние в высоких концентрациях проявляют криозащитные свойства: способствуют переохлаждению внутриклеточной среды и ее частичному переходу в стеклообразное состояние, исключаящее образование достаточно крупных

для повреждения клеток кристаллов льда [0].

К криопротекторам относятся вещества, принадлежащие к разным классам химических соединений. Это спирты (этиленгликоль, глицерин), амиды (диметилацетамид), оксиды (диметилсульфоксид), искусственные полимеры (поливинилпирролидон, оксиэтилированный крахмал, полиэтиленгликоль), сахара (манноза, фруктоза, глюкоза, сахароза, трегалоза, крахмал), липиды (фосфолипиды, гликолипиды) и др. В последнее время особое внимание стало уделяться изучению естественных криопротекторов: различных гликопептидов, пептидов, свободных аминокислот, сахаров, спиртов и других веществ, встречающихся почти во всех жидкостях организма у видов, способных переносить воздействие низких температур [10, 0].

Вопрос о том, какими свойствами должен обладать эффективный криопротектор, до сих пор не имеет исчерпывающего ответа, но некоторые из основных свойств уже известны: криопротектор должен быть не токсичным, хорошо растворимым в воде, эффективно снижать количество вымораживаемой в виде чистого льда воды, предотвращать кристаллизацию и обладать способностью поддерживать в растворенном состоянии соли и белки. Полезным свойством является способность легко проникать через клеточную мембрану, но это не является обязательным, так как существует много достаточно эффективных защитных веществ, не проникающих внутрь клетки [0]. Таким образом, поиск веществ, способных предотвращать развитие повреждений биологического материала при его замораживании и последующем оттаивании, является важным моментом в вопросе сохранения жизнеспособности клеток при замораживании. Механизм действия веществ, входящих в состав защитных сред, не одинаков, и для микроорганизмов различных таксономических групп ни одна из сред не может быть использована как универсальная. Для оптимизации процесса замораживания культур различной видовой принадлежности необходим тщательный подбор протекторных сред [3, 0, 0].

Криопротекторы делятся на две группы – проникающие (то есть, способные проходить сквозь мембрану внутрь клетки), или эндоцеллюлярные, и непроникающие, или экзоцеллюлярные, которые действуют снаружи, осмотически вытягивая из клетки воду. К проникающим относятся глицерин, диметилсульфоксид, ацетамид, пропиленгликоль, этиленгликоль и некоторые другие. К непроникающим – полиэтиленгликоль, фиколл, сахароза, трегалоза и др. Последнее выгодно: чем меньше в клетке останется воды, тем меньше потом образуется льда. Но удаление воды приводит к повышению концентрации остающихся внутри клетки солей – вплоть до значений, при которых происходит денатурация белка. Эндоцеллюлярные же криопротекторы не только снижают температуру замерзания, но и разбавляют образующийся при кристаллизации «рассол», не давая белкам денатурироваться [4].

Для исследования влияния отдельных криопротекторов на выживаемость культур лактобацилл использовали сахарозу и фруктозу (в концентрациях 5, 10, 15, 20%), инулин (в концентрациях 2, 3, 4, 10%), аргинин (в концентрациях 0,5, 1, 2, 3%), глицерин (в концентрациях 5, 10, 20, 30, 40, 50%), а также буферные соли – натрий лимоннокислый и натрий уксуснокислый (в концентрациях 3, 5, 7, 10%). Для исследования выбраны штаммы лактобацилл, различающиеся чувствительностью к замораживанию (высокой, средней и низкой) [0].

В ходе работы определяли влияние веществ в различных концентрациях, наиболее часто используемых как компоненты защитных сред, на сохранность культур лактобацилл при замораживании в жидком азоте. В таблице приведены полученные в ходе работы данные по изменению количества выживших после замораживания клеток биомассы с криопротектором и количества выживших клеток биомассы без криопротектора.

Как видно из таблицы, для культур с низкой чувствительностью к замораживанию (*L. plantarum*) значительного криопротекторного влияния на сохранность микроорганизмов выявлено не было. Так, при использовании сахарозы в качестве защитной среды наблюдали максимальное увеличение сохранности бактериальных клеток по сравнению с контролем: добавление в соотношении 1:1 к биомассе даже 5 % раствора сахара повысило в 1,21 раза сохранность клеток при их замораживании, а повышение его концентрации до 20 % позволило увеличить сохранность бактериальных клеток в 1,43 раза по сравнению с контролем. Остальные исследованные вещества при их использовании в качестве защитной среды не оказывали достоверного увеличения количества клеток, за исключением 15 % и 20 % раствора фруктозы (сохранность микроорганизмов увеличилась в 1,37 и 1,3 раза соответственно), 3 % раствора аргинина (сохранность бактерий выросла в 1,26 раза) и 5 % раствора лимоннокислого натрия (сохранность бактерий повысилась в 1,29 раза).

Для культур с низкой (*L. helveticus*) и средней (*L. delbrueckii* subsp. *lactis*) чувствительностью к замораживанию установлено различное влияние криопротекторных веществ при замораживании на сверхнизких температурах.

Так, использование сахарозы в качестве защитной среды позволило повысить выживаемость указанных видов лактобацилл после замораживания, причем чем выше ее концентрация в защитной среде, тем больше количество выживших клеток. Использование 20 % раствора сахарозы в качестве криопротектора увеличило сохранность культур *L. helveticus* – в 18,07 раза, а *L. delbrueckii* subsp. *lactis* – в 20,13 раза (см. табл.).

Использование фруктозы в качестве защитной среды также позволило увеличить количество бактериальных клеток при

замораживании. Максимальное увеличение количества выживших клеток у штаммов *L. helveticus* и *L. delbrueckii* subsp. *lactis* по сравнению с контролем отмечено при использовании 10 % (в 10,57 раза) и 15 % (в 9,33 раза) растворов соответственно (см. табл.).

Использование инулина в качестве криопротектора оказалось эффективным лишь для бактерий *L. helveticus*: выживаемость микроорганизмов увеличивалась в 4,17–5,36 раза в зависимости от его концентрации в защитной среде. Для бактерий *L. delbrueckii* subsp. *lactis* регистрировали увеличение сохранности бактериальных клеток лишь при использовании 10 % раствора инулина (в 2,54 раза), при более низких концентрациях в защитной среде криопротекторного действия не выявлено (см. табл.).

Аргинин способствовал увеличению количества выживших клеток *L. helveticus* в 2,3–4,14 раза при его использовании в защитной среде во всех исследованных концентрациях. У бактерий *L. delbrueckii* subsp. *lactis* выживаемость культур после замораживания увеличивалась в 3,38 и 6,41 раза, соответственно при использовании 2 % и 3 % раствора аргинина (см. табл.).

При использовании глицерина в качестве защитной среды выявлены его криопротекторные свойства на культуры с низкой и средней чувствительностью к замораживанию. Максимальное увеличение выживаемости клеток при использовании глицерина в качестве криопротектора отмечено при его концентрации в растворе 30 %. При этом количество выживших бактериальных клеток удалось повысить в 16,98 и 12,94 раза, соответственно для культур *L. helveticus* и *L. delbrueckii* subsp. *lactis* по сравнению с контролем (табл. 1).

Эффективным оказалось использование раствора цитрата натрия в качестве защитной среды – наблюдалось увеличение количества выживших клеток *L. helveticus* и *L. delbrueckii* subsp. *lactis* при повышении его концентрации от 3 до 10 % в 9,81–11,82 раз и в 4,65–20,27 раз, соответственно (см. табл.).

Использование уксуснокислого натрия в качестве защитной среды при замораживании оказалось возможным только лишь для *L. helveticus* – смешивание биомассы с защитной средой, содержащей разные концентрации ацетата натрия, увеличивало сохранность клеток *L. helveticus* после замораживания по сравнению с контролем в 25,83–31,71 раза.

Таблица 1. Влияние веществ в различных концентрациях на выживаемость культур лактобацилл при замораживании

Компонент защитной среды и его концентрация, %	Увеличение количества КОЕ/мл по сравнению с контролем, замороженным без криопротектора, раз		
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
5–сахароза	1,21	13,41	3,33
10–сахароза	1,21	16,02	6,67
15–сахароза	1,3	17,05	6,67
20–сахароза	1,43	18,07	20,13
5–фруктоза	0,72	1,7	2,73
10–фруктоза	1,14	10,57	3,03
15–фруктоза	1,37	6,76	9,33
20–фруктоза	1,3	6,89	4,55
2–инулин	0,99	5,31	0,47
3–инулин	0,93	4,6	0,44
4–инулин	0,79	4,72	0,92
10–инулин	1,18	4,13	2,54
0,5–аргинин	0,9	4,14	0,35
1–аргинин	0,9	4,17	0,94
2–аргинин	1,09	5,58	3,38
3–аргинин	1,26	2,3	6,41
5–глицерин	1,06	4,89	3,25
10–глицерин	1,04	4,4	4,02
20–глицерин	1,16	7,08	4,5
30–глицерин	1,05	16,98	12,94
40–глицерин	1,03	1,43	7,18
50–глицерин	0,96	2,95	12,2
3–лимоннокислый натрий	1,01	9,81	4,65
5–лимоннокислый натрий	1,29	11,36	7,13
7–лимоннокислый натрий	1,05	15,45	20
10–лимоннокислый натрий	1,02	11,82	20,27
3–уксуснокислый натрий	0,79	27,54	0,28
5–уксуснокислый натрий	0,9	31,71	0,71
7–уксуснокислый натрий	0,73	25,83	0,91
10–уксуснокислый натрий	1,05	29,71	1,13

Вывод

Таким образом, установлено, что влияние криопротекторных веществ на выживаемость клеток зависит от их концентрации и вида замораживаемых культур. Определены компоненты, оказывающие положительное влияние на выживаемость клеток лактобацилл при замораживании на сверхнизких температурах для каждой из групп культур

и определены их концентрации, позволяющие максимально повысить количество выживших после замораживания в среде жидкого азота клеток. Для культур с низкой чувствительностью к замораживанию увеличение количества клеток обеспечивали 20 % раствор сахарозы, 15 % раствор фруктозы, 10 % раствор инулина, 3 % раствор аргинина, 20 % раствор глицерина и 5 % раствор цитрата натрия. У культур со средней чувствительностью к замораживанию максимальную сохранность клеток при замораживании регистрировали при использовании 20 % раствора сахарозы, 10 % раствора фруктозы, 2–10 % растворы инулина, 2 % раствора аргинина, 30 % раствора глицерина, 7 % раствора цитрата натрия и раствора уксуснокислого натрия в концентрациях от 3 до 10%. Для культур с низкой устойчивостью к замораживанию защитными средами, оказывающими протекторное влияние на выживаемость микроорганизмов, являлись 20 % раствор сахарозы, 15 % раствор фруктозы, 10 % раствор инулина, 4 % раствор аргинина, 30 % раствор глицерина и 10 % раствор цитрата натрия.

Литература

1. Биохимия мембран: учеб. пособие для биол. и мед. спец. ВУЗов / под ред. А.А. Болдырева. – М.: Высшая школа. 1987. – КН.3: Замораживание и криопротекция / А.Н. Белоус, Е.А. Гордиенко, Л.Ф. Розанов. – 1987. – 80 с.
2. Прищепова, О.С. Изучение устойчивости лактобацилл разных видов к замораживанию / О.С. Прищепова [и др.] // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья. РУП «Институт мясо-молочной промышленности»; редкол.: А.В. Мелещеня [и др.] – Минск: РУП «Институт мясо-молочной промышленности», 2012. – Вып. 6.
3. Рахуба, Д.В. Криоконсервация пробиотических микроорганизмов: научные основы практического использования / Д.В. Рахуба, Г.И. Новик // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. – Минск, 2007. — Т. 1. – С. 268–275.
4. Сидоренко, А.В. Влияние сверхбыстрого охлаждения на жизнеспособность бактерий рода *Bifidobacterium* / А.В. Сидоренко, Г.И. Новик // Микроорганизмы и биосфера: материалы междунар. конф. — Москва, 2007 – С. 108–109.
5. Сидякина, Т.М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур. Консервация генетических ресурсов / Т.М. Сидякина // Методы. Проблемы. Перспективы. – Пущино, 1991. – 159 с.
6. Стоянова, Л.Г. Сравнение способов хранения молочнокислых бактерий / Л.Г. Стоянова, З.А. Аркадьева // Микробиол. – 2000. – Т. 69, № 1. – С. 98–104.
7. Цуцаева, А.А. Криоконсервирование клеточных суспензий / А.А. Цуцаева [и др.]. – Киев: Навук. думка, 1983. – 240 с.
8. De Man, J.C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J.C. De

Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.

9. Mirabet, V. Use of liquid nitrogen during storage in a cell and tissue bank: contamination risk and effect on the detectability of potential viral contaminants / V. Mirabet // Cryobiology. – 2012 – Vol. 64, № 2. – P. 121–123.

10. Odintsova, N. Cryopreservation of primary cell cultures of marine invertebrates / N. Odintsova, K. Kiselev, N. Sanina, E. Kostetsky // Cryolett. – 2001. – Vol. 22. – P. 299–310.

11. Rothrock, MJ. Jr. Long-term preservation of anammox bacteria / M.J. Jr. Rothrock // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 92, № 1. – P. 147–57.

12. Uzunova-Doneva, Ts. Anabiosis and conservation of microorganisms / Ts. Uzunova-Doneva, T. Donev // J. Cult. Coll. – 2004-2005. – Vol. 4 – P. 17–28.

*O.S. Pryshchepava, N.S. Kravchenko, S.B. Barunova,
S.L. Vasylenko, N.N. Furik*

**CRYOPROTECTIVE PROPERTIES INVESTIGATION OF THE
PROTECTIVE MEDIA COMPONENTS FOR LACTOBACILLUS
STRAINS**

Summary

The effect of sucrose, fructose, inulin, arginine, glycerol, sodium citrate and sodium acetate was determined on survival of *Lactobacillus* strains which differ on sensitivity to freezing.