



Научная статья  
4.3.3 – Пищевые системы (технические науки)  
УДК 663.1

doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2024.02.005



## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *VACILLUS COAGULANS* И *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

Ашихмина Мария Сергеевна<sup>1</sup>, Краснова Василиса Федоровна<sup>2</sup>,  
Орлова Ольга Юрьевна<sup>3</sup>, Уласевич Светлана Александровна<sup>4</sup>,  
Скорб Екатерина Владимировна<sup>5</sup>

<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup> «Национальный исследовательский университет ИТМО» Санкт-Петербург, Россия

<sup>1</sup> ashikhmina@infochemistry.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8545-1051>

<sup>2</sup> krasnova@infochemistry.ru, <https://orcid.org/0009-0005-3725-261X>

<sup>3</sup> oousova@itmo.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2292-2236>

<sup>4</sup> saulasevich@itmo.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1753-911X>

<sup>5</sup> skorb@itmo.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0888-1693>

**Аннотация.** Микроорганизмы играют важную роль в различных областях, включая биотехнологию, пищевую промышленность, фармацевтику и экологию. Однако сохранение жизнеспособности и генетической стабильности микроорганизмов при хранении и транспортировке представляет собой сложную задачу. Для обеспечения эффективной работы и получения достоверных результатов необходимо разработать оптимальный метод консервации культур микроорганизмов. Целью исследования является разработка эффективной технологии лиофилизации и подбор криопротекторов для улучшения совместного культивирования *Vacilluscoagulans* и *Streptococcusthermophilus*. Совместное культивирование этих бактерий необходимо для получения высококачественных продуктов с желаемыми свойствами. Правильная технология лиофилизации и добавление криопротекторов позволили значительно снизить ущерб, наносимый замораживанием, и успешно совместно культивировать два штамма бактерий. Одним из наиболее эффективных криопротекторов в данном исследовании была признана сахароза. Наилучший результат она показала при ее добавлении в среду в соотношении 3:1 с бактериальной массой. Для оценки эффективности сахарозы как криопротектора были проведены квантово-химические расчеты. Результаты расчетов подтвердили, что сахароза является эффективным криопротектором для бактерий *Vacilluscoagulans* и *Streptococcusthermophilus*. Следует отметить, что разработка оптимального метода консервирования имеет решающее значение для эффективной работы и получения достоверных результатов при выращивании культур микроорганизмов. Проведенное исследование показало, что правильный выбор технологии лиофилизации и добавление криопротекторов, в частности сахарозы, позволяет значительно улучшить совместное культивирование *Vacilluscoagulans* и *Streptococcusthermophilus*. Этот вывод имеет практическое значение для пищевой промышленности и других областей, в которых используются микроорганизмы.

**Ключевые слова:** криопротектор, *Vacilluscoagulans*, *Streptococcusthermophilus*, пищевая промышленность, сахароза, замораживание, совместное выращивание, квантово-химические расчеты, микробные культуры.

**Благодарности:** Работа выполнена при поддержке РФФ № 23-16-00224.

**Для цитирования:** Разработка технологии лиофилизации и оптимизация криопротекторов для улучшения совместного культивирования бактерий *Vacillus Coagulans* и *Streptococcus Thermophilus* / М. С. Ашихмина [и др.] // Ползуновский вестник. 2024. № 2, С. 37–45. doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2024.02.005. EDN: <https://elibrary.ru/CNLNIL>.

Original article

## DEVELOPMENT OF LYOPHILIZATION TECHNOLOGY AND OPTIMIZATION OF CRYOPROTECTANTS TO IMPROVE CO-CULTIVATION OF *BACILLUS COAGULANS* AND *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* BACTERIA

Mariia S. Ashikhmina<sup>1</sup>, Vasilisa F. Krasnova<sup>2</sup>,  
Olga Yu. Orlova<sup>3</sup>, Sviatlana A. Ulasevich<sup>4</sup>, Ekaterina V. Skorb<sup>5</sup>

<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup> ITMO University, St. Petersburg, Russia

<sup>1</sup> ashikhmina@infochemistry.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8545-1051>

<sup>2</sup> krasnova@infochemistry.ru, <https://orcid.org/0009-0005-3725-261X>

<sup>3</sup> oousova@itmo.ru

<sup>4</sup> saulasevich@itmo.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1753-911X>

<sup>5</sup> skorb@itmo.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0888-1693>

**Abstract.** *Microorganisms play an important role in various fields, including biotechnology, food processing, pharmaceuticals and the environment. However, preserving the viability and genetic stability of microorganisms during storage and transportation is challenging. In order to ensure efficient operation and obtain reliable results, it is necessary to develop an optimal method for the preservation of microbial cultures. The aim of the study is to develop an effective lyophilization technology and selection of cryoprotectants to improve the co-culture of Bacillus coagulans and Streptococcus thermophilus. Co-culturing of these bacteria is essential to obtain high quality products with desired properties. Proper lyophilization technology and the addition of cryoprotectants have made it possible to significantly reduce the damage caused by freezing and to successfully culture the two bacteria. Sucrose is found to be one of the most effective cryoprotectants in this study. It showed the best result in a 3:1 ratio with the bacterial mass. Quantum chemical calculations were performed to evaluate the effectiveness of sucrose as a cryoprotectant. The results of the calculations confirmed that sucrose is an effective cryoprotectant for Bacillus coagulans and Streptococcus thermophilus bacteria. It should be noted that the development of an optimal method of preservation is crucial for effective work and reliable results in the cultivation of microbial cultures. The study showed that the correct choice of lyophilization technology and the addition of cryoprotectants, in particular sucrose, can significantly improve the co-cultivation of Bacillus coagulans and Streptococcus thermophilus. This finding has practical implications for the food industry and other fields in which microorganisms are used.*

**Keywords:** *cryoprotectant research, Bacillus coagulans, Streptococcus thermophilus, food industry, sucrose, freezing damage, co-culture, quantum-chemical calculations, optimal preservation methods, microbial cultures.*

**Acknowledgements:** *The work was carried out with the support of the RSF № 23-16-00224.*

**For citation:** Ashikhmina, M.S., Krasnova, V.F., Orlova, O.Yu., Ulasevich, S.A. & Skorb, E.V. (2023). Development of lyophilization technology and optimization of cryoprotectants to improve co-cultivation of Bacillus Coagulans and Streptococcus Thermophilus bacteria. *Polzunovskiy vestnik*, (2), 37-45. (In Russ). doi: 10/25712/ASTU.2072-8921.2024.02.005. EDN: <https://elibrary.ru/CNLNIL>.

### ВВЕДЕНИЕ

В научных исследованиях сохранение и выживаемость чистых культур микроорганизмов являются ключевыми факторами для успешной деятельности и получения достоверных результатов как в науке, так и в промышленности. Если культура микроорганизма не сохраняется должным образом, то это может привести к изменению свойств микроорганизма и, следовательно, к некорректным результатам исследования.

На сегодняшний день существует четыре основных метода сушки бактериальных культур: распылительная [1, 2], сублимационная, вакуумная [3–5] сушка и сушка в псевдооживленном слое [6–8].

Распылительная сушка обладает высокой производительностью и низкой стоимостью оборудования, но может негативно повлиять на выживаемость микроорганизмов из-за высоких температур и давлений. Кроме того, возможна потеря биологической актив-

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS COAGULANS* И *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

ности пробиотических культур. Сушка в псевдооживленном слое является быстрым и производительным методом, но не всегда эффективна для пробиотических культур, т. к. может привести к потере их биологической активности. В свою очередь, сублимационная и вакуумная сушка позволяют сохранить биологическую активность пробиотиков благодаря использованию низких температур и давлений. Но ограничивающим фактором может стать разработка веществ, которые позволяют защищать микроорганизмы при заморозке. При этом сублимационная или лиофильная и вакуумная сушки позволяют сохранить микроорганизмы в течение многих лет, не теряя их жизнеспособности и биологических свойств.

В связи с этим наиболее перспективным способом является лиофилизация микроорганизмов. Однако при замораживании и лиофилизации микроорганизмы подвергаются стрессу, который может привести к повреждению клеточных мембран [9–12], изменению ферментативной активности [13] и другим негативным последствиям [14–16]. Увеличению выживаемости бактерий при заморозке способствуют криопротекторные вещества [3, 17–19], которые защищают клетки от повреждений, предотвращают образование льда внутри клеток и уменьшают давление на клеточные стенки как с внешней, так и с внутренней стороны.

Разработка технологии лиофилизации и подбор криопротекторов позволяет улучшить совместное культивирование бактерий. Например, одной из сложностей использования *Bacillus coagulans* и *Streptococcus thermophilus* при совместном культивировании является подбор оптимальных условий для их роста и развития. Известно, что *Streptococcus thermophilus* накапливает биомассу при культивировании в среде МРС в течение 12–24 ч, в то время, как *B. Coagulans*, споровая культура, у которой активация клеток и накопление биомассы занимает от 30 до 48 ч.

В связи с этим целью данного исследования является подбор условий культивирования и лиофилизации *B. Coagulans* для совместного культивирования с *S. thermophilus*. Правильная технология лиофилизации позволит накопить рациональное количество биомассы и сократить длительность процесса.

### МЕТОДЫ

#### Процедура подготовки бактериальной массы

Накопление биомассы *S. Thermophilus* проводили в жидкой питательной среде МРС

(Ман, Порога, Шарп) (Hi Media Laboratories, Индия). Количество внесенной культуры нормировалось по оптической плотности ( $OD_{600} = 0,1$ ). Культивирование проводили в течение 19–20 ч при температуре  $37 \pm 1$  °С.

Споры *B. coagulans* активировали ультразвуком с частотой вибрации 35 кГц и мощностью 80 Вт в течение 20–30 с при температуре 32–34 °С. Бактерии культивировали в жидкой питательной среде МРС с содержанием лактозы 1 масс. %. Количество внесенной культуры нормировали по оптической плотности ( $OD_{600} = 0,1$ ). Культивирование проводили в течение 20–21 ч при температуре  $37 \pm 1$  °С.

Бактериальные клетки собирали в асептических условиях в начале стационарной фазы культивирования. Затем проводили отделение биомассы от питательной среды центрифугированием (5000 об/мин) при 20–22 °С в течение 10 мин на центрифуге (Eppendorf, 5804 ФРГ). Ростовую среду (супернатант) декантировали, собранные клетки дважды промывали физиологическим раствором и асептической дистиллированной водой, отделяя биомассу центрифугированием. Каждый осадок ресуспендировали в экспериментальной защитной среде для получения клеточной суспензии, содержащей примерно  $1,0 \times 10^{11}$  КОЕ/мл. Аликвоты объемом по 3,5 мл каждой ресуспензии переносили в четыре стерилизованных флакона (10 мл) и замораживали при –18 °С один час и –80 °С в течение 17–18 ч. Затем образцы подвергали сублимационной сушке при температуре конденсора –55 °С при следующих параметрах: первичная сушка I (560 мин, –5,0 °С, 0,90 мбар), первичная сушка II (420 мин, 15,0 °С, 0,60 мбар), вторичная сушка I (240 мин, 25,0 °С, 0,40 мбар), вторичная сушка II (120 мин, 25,0 °С, 0,30 мбар), вторичная сушка III (120 мин, 25,0 °С, 0,10 мбар). Общее время сушки 24 ч в лиофилизаторе (Buchi Lyovapor L-200, Швейцария).

#### Определение жизнеспособности клеток

Количество жизнеспособных клеток определяли до и после лиофилизации в виде колониеобразующих единиц (КОЕ). Каждый образец бактерий с внесенным криопротектором перед замораживанием серийно разводили стерильным физиологическим раствором (0,85 масс.% NaCl) и проводили посеvy методом Коха с питательной средой МРС. Высушенные образцы ресуспендировали в 1 мл стерильной дистиллированной воды, инкубировали при температуре 37 °С в тече-

ние 15 мин и высевали на чашки, как описано выше. Чашки инкубировали при 37 °С в течение 48 ч перед подсчетом колоний.

#### Анализ эффективности ферментации

Для оценки эффективности ферментации высушенных бактерий, полученных путем лиофилизации в этом исследовании, навеску массой 0,02 г инокулировали в среде МРС бульоне (100 мл) при 37 °С в течение 17–18 ч. Биомассу, величину рН определяли в течение 72 ч.

#### Определение биомассы

Осадки клеток собирали центрифугированием ферментационного бульона при 5000 об/мин при 4 °С в течение 5 мин и добавляли стерильную дистиллированную воду для приготовления суспензии. Оптическую плотность суспензии при 600 нм ( $OP_{600}$ ) определяли с помощью спектрофотометра (Shimadzu UV-1800) и регистрировали для оценки биомассы.

#### Квантово-химический расчет для обоснования применения сахарозы

Расчеты энергии сольватации для сахарозы проводили с использованием программного обеспечения Orca 5.0.3. Полная оптимизация геометрии для структуры модели сахарозы была проведена на теоретическом уровне B3LYP-D3/def2-TVZP. Было использовано приближение RIJCOSX и вспомогательный базисный набор TVZP/C, а также аппроксимация с ограничением спина. Допуски на сходимость для оптимизации геометрии составляли изменение энергии =  $5,0 \times 10^{-6}$  Eh, максимальный градиент =  $3,0 \times 10^{-4}$  Eh/Bohr, среднеквадратичный градиент =  $1,0 \times 10^{-4}$  Bohr, максимальное смещение =  $4,0 \times 10^{-3}$  Bohr и среднеквадратичное смещение =  $2,0 \times 10^{-3}$  Bohr. Матрица Гауссиана была рассчитана для всех оптимизированных модельных структур, чтобы доказать правильность расположения стационарных точек на поверхностях потенциальной энергии (во всех случаях не было обнаружено мнимых частот) и оценить термодинамические свойства (а именно энтальпию, энтропию и свободную энергию Гиббса) для всех модельных систем при 298,15 K и 1 атм.

#### Статистический анализ

Жизнеспособность (%) = количество жизнеспособных клеток после лиофилизации (КОЕ/г) / количество жизнеспособных клеток до лиофилизации (КОЕ/г)  $\times$  100 %.

Каждый эксперимент проводился в трех биологических повторностях. Статистические

различия оцениваются с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием теста Дункана и программного обеспечения Origin Lab Corporation. Различия между группами с  $p < 0,05$  ( $n = 3$ ) считаются статистически значимыми.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кисломолочные продукты являются важным источником питания для человека. Помимо белков, жиров, углеводов, витаминов и минералов, они содержат молочнокислые бактерии, которые необходимы для поддержания здоровья и нормальной работы организма. Бактерии, используемые в производстве кисломолочных продуктов, в том числе такие, как *Bacillus coagulans*, *Streptococcus thermophilus*, имеют множество полезных свойств. Они помогают улучшить пищеварение, укрепить иммунную систему и предотвратить развитие инфекций. Наши предыдущие исследования показали, что *B. coagulans* проявляет низкую казеолитическую и фосфатазную активность, и, как следствие, при использовании штамма бактерии при заквашивании молока образуется слабый сгусток с высокой степенью синерезиса. Для улучшения потребительских и реологических свойств была подобрана вспомогательная заквасочная культура – *S. thermophilus*. При этом было также установлено, что наиболее приемлемое соотношение микроорганизмов в продукте составляет 1:4 (*S. thermophilus* : *B. coagulans*). Учитывая, что *B. coagulans* требует дополнительной операции, связанной с активацией спор, для уменьшения производственного цикла необходимо разработать технологию лиофилизации и подобрать состав криопротектора, который позволит проводить совместное культивирование *S. Thermophilus* и *B. coagulans* без активации спор.

Наращивание биомассы *B. coagulans* проводили в жидкой питательной среде. Активированные споры в асептических условиях помещали в жидкую питательную среду МРС. В качестве дополнительного ростового вещества использовали лактозу. Для определения рациональной дозы внесения проводили исследования с различной концентрацией лактозы (рис. 1, А). Количество внесённой культуры нормировали по оптической плотности ( $OD_{600} = 0,1$ ). Культивирование проводили в течение 72 ч при температуре  $37 \pm 1$  °С.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ  
 ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *VACILLUS COAGULANS*  
 И *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

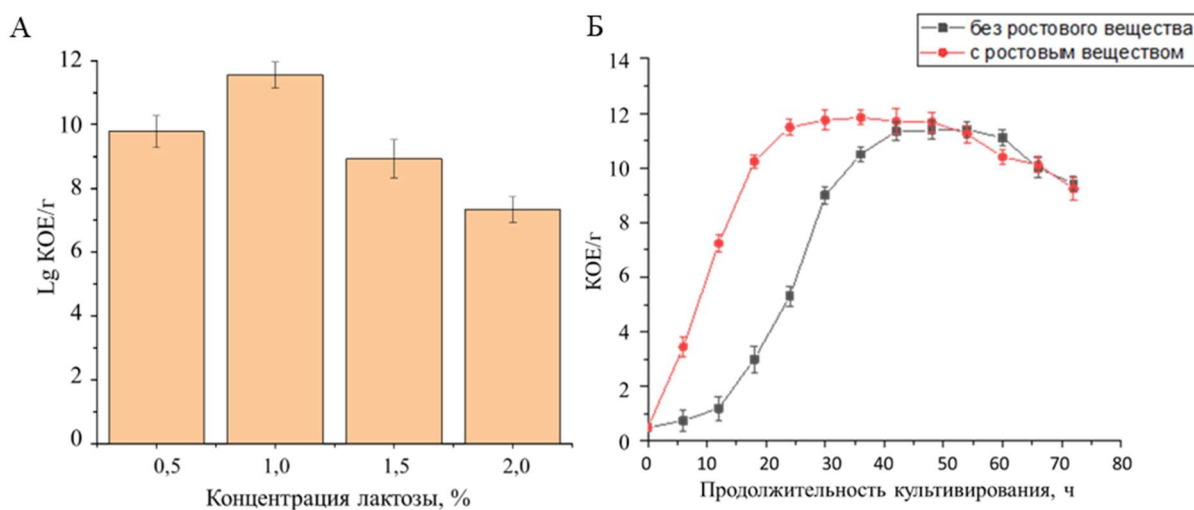


Рисунок 1 – Количество КОЕ в мл культуральной среды в зависимости от концентрации добавляемого дисахарида (А); кривая роста *B. coagulans* при содержании 1,0 % лактозы в питательной среде (Б)

Figure 1 - The amount of CFU in ml of culture medium depending on the concentration of the added disaccharide (A); the growth curve of *B. coagulans* with a content of 1.0% lactose in the nutrient medium (B)

Для определения внесения необходимого количества дисахарида были определены четыре различные концентрации выбранного сахара от 0,5 масс.% до 2,0 масс.%. В процессе культивирования отбирали 1 мл аликвоты для проведения посевов глубинным методом для построения кривой роста (рис. 1, Б). Добавление в питательную среду до 1,0 масс.% лактозы стимулирует рост бактерий, тогда как концентрация лактозы свыше 1,0 масс.% ингибирует рост *B. coagulans*. Вероятней, ингибирование роста происходит из-за повышения вязкости среды, что провоцирует более медленный перенос питательных веществ в бактериальную клетку. Кроме того, происходит избыток углеводов при недостатке азота, что сказывается на росте клеток.

После культивирования отделение бактериальной массы от питательной среды проводили методом центрифугирования. Центрифугирование для осаждения биомассы проводили в течение 5 мин с количеством оборотов 5000 об/мин. Установлено, что данный режим позволяет качественно выделить бактериальную массу, отделив супернатант, а также сохранить жизнеспособность клеток, не повредив клеточную стенку бактерий.

Подбор криопротектора для бактерий является важным этапом в сохранении их жизнеспособности при хранении в замороженном состоянии. Криопротекторы также играют важную роль при лиофилизации бактерий, которая является методом сохранения

микроорганизмов в сухом состоянии. В процессе лиофилизации бактерии замораживаются и затем высушиваются при помощи вакуума, что позволяет сохранить их жизнеспособность на длительное время. Выбор криопротектора зависит от многих факторов, таких как тип бактерии, условия замораживания и требования к долгосрочному хранению.

Для успешной лиофилизации бактерий криопротекторы должны быть добавлены в культуру перед замораживанием. Они защищают клетки от повреждения при замораживании и высушивании, а также помогают сохранить их жизнеспособность при длительном хранении.

Наиболее распространенными криопротекторами для лиофилизации бактерий являются сахароза, трегалоза, глицерин и ДМСО. Глицерин и ДМСО также могут использоваться в качестве криопротекторов при лиофилизации бактерий, но они могут вызывать негативные побочные эффекты на рост и выживаемость некоторых видов бактерий. Сахароза и трегалоза обладают высокой способностью защиты клеток от повреждений при замораживании и высушивании, а также не оказывают негативного воздействия на рост и выживаемость большинства видов бактерий.

Однако подбор рациональных и оптимальных концентраций криопротекторов и их соотношение с бактериальной массой для разных культур отличаются. Для клеточных

культур *B. coagulans* и *S. thermophilus* были выбраны пять криопротекторов (рис. 2, А). Для предварительных экспериментов была выбрана концентрация всех криопротекторов 10 масс. %. Следует отметить, что все образцы были подвержены одинаковым условиям стерилизации – автоклавированию при 121 °С и давлении – 1,1 атм в течение 15 мин. Вероятно, низкая выживаемость бактерий при использовании глицерина и альбумина была связана со стерилизацией. Наибольшая вы-

живаемость была получена при использовании сахарозы. Помимо выживаемости бактерий, важным является соотношение бактерий и их совместное культивирование.

В результате в качестве криопротектора для заморозки и лиофилизации была выбрана сахароза. Для определения оптимальной концентрации были проведены дополнительные исследования, результаты которых приведены на рисунке 2, Б.

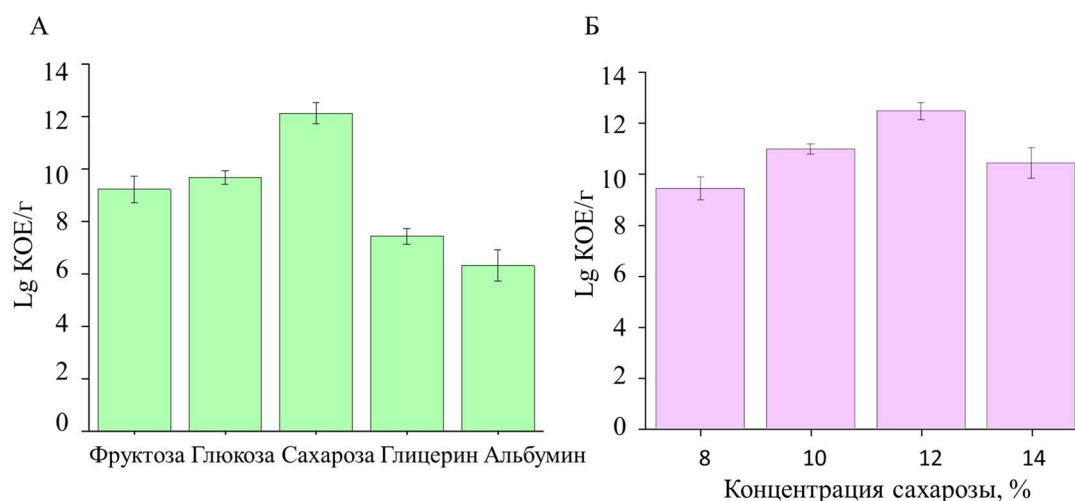


Рисунок 2 – Количество КОЕ после лиофилизации бактерий при различных криопротекторных веществах (А); количество КОЕ при оптимизации массовой доли сахарозы в среде (Б)

Figure 2 -The amount of CFU after lyophilization of bacteria with various cryoprotective substances (A); the amount of CFU when optimizing the mass fraction of sucrose in the medium (B)

В результате исследований в качестве используемого криопротектора была выбрана сахароза с массовой долей 12 масс.%. Образование внутриклеточного льда и острых кристаллов льда может привести к разрыву клеточной стенки, что приводит к гибели клетки. Одним из важных параметров замораживания является скорость заморозки. Известно, от скорости заморозки зависит кинетика зарождения и образования льда как внутри, так и во внеклеточном пространстве. Работа непроникающих криопротекторов основана на осмотическом давлении. При высокой скорости охлаждения не хватает времени для выхода воды из клеточного пространства во внешнюю среду [20].

При более медленной скорости охлаждения вода успевает выйти из клетки, что может привести к осмотическому стрессу и усадке клетки. Однако при медленном замораживании повреждение клетки может происходить из-за уменьшения объема окружающей среды, который уменьшается по мере увеличения количества внеклеточной замо-

роженной воды. В связи с этим важно выбрать оптимальную скорость замораживания и концентрацию криопротектора, что приведёт к оптимальному балансу между образованием внутриклеточного льда и осмотическим процессом.

Таким образом, были проведены шесть экспериментов, связанных со скоростью и условием замораживания биомассы с криопротектором. Стоит отметить, что во всех случаях количество биомассы и объем криопротектора были одинаковыми и составляли 1:3 соответственно.

Охлаждение и заморозку образцов проводили следующим образом (табл. 1). После культивирования проводили отделение биомассы от питательной среды методом центрифугирования, затем сразу же добавляли раствор сахарозы 12 масс.%. Подготовленные образцы помещали в холодильную камеру. Второй, четвертый и пятый образцы дополнительно помещали в криобокс с изопропиловым спиртом.

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ  
ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS COAGULANS*  
И *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS***

Для определения режимов заморозки были проведены шесть исследований с различным протоколом замораживания (табл. 1, рис. 3).

Заморозку бактериальной смеси с криопротектором проводили в течение 17–18 ч. Все образцы доходили до заморозки при температуре –80 °С.

Таблица 1 – Характеристики параметром обработки образцов перед замораживанием

Table 1 - Characteristics of the sample processing parameter before freezing

Номер образца	Криобокс	4–6 °С	–18 ÷ –20 °С	–80 °С
1				
2				
3				
4				
5				
6				

**Примечание**

Образец 1 сразу после внесения криопротектора помещали в морозильную камеру при –80 °С и выдерживали в течение 17–18 ч.

Образец 2 сначала помещали в криобокс с изопропиловым спиртом, затем ставили в холодильную камеру при 4–6 °С на 30 мин, затем помещали в морозильную камеру при –18 ÷ –20 °С на 1 ч. По истечении одного часа образец помещали в морозильную камеру при –80 °С на 17–18 ч.

Образец 3 после добавления криопротектора помещали в морозильную камеру при –18 ÷ –20 °С, также на 1 час, а затем помещали в –80 °С и выдерживали в течение 17–18 ч.

Образец 4 после добавления криопротектора помещали в криобокс с изопропиловым спиртом и затем ставили в морозильную камеру при –18 ÷ –20 °С, на 1 час, а затем помещали в –80 °С и выдерживали в течение 17–18 ч.

Образец 5 после добавления криопротектора помещали в криобокс с изопропиловым спиртом и затем ставили в морозильную камеру в –80 °С на 17–18 ч.

Образец 6 после добавления криопротектора помещали в холодильную камеру при 4–6 °С на 30 мин, затем помещали в морозильную камеру при –18 ÷ –20 °С на один час. По истечении одного часа образец помещали в морозильную камеру при –80 °С на 17–18 ч.

Для системы *Bacilluscoagulans* и *Streptococusthermophilus* в соотношении 4 : 1 с криопротектором сахарозой концентрацией 12 масс.% и соотношением бактериальной массы : криопротектор – 1 : 3 наилучший результат показал третий способ заморозки (рис. 3). После добавления криопротектора фалькон сразу помещали в морозильную камеру при –18 ÷ –20 °С на один час, а затем помещали в морозильник при –80 °С на 17–18 ч. Далее проводили лиофилизацию.

Для подтверждения эффективности применения сахарозы качестве криопротектора и антифриза был применен квантово-химический расчет, который позволил рассчитать свободную энергию связывания воды с гидроксильными группами выбранного криопротектора – сахарозой (рис. 4).

Расчеты показали, что взаимодействие молекул воды с молекулами сахарозы приводит к образованию водородных связей между ними, которые усложняют процесс кристаллизации воды и замедляют образование льда.

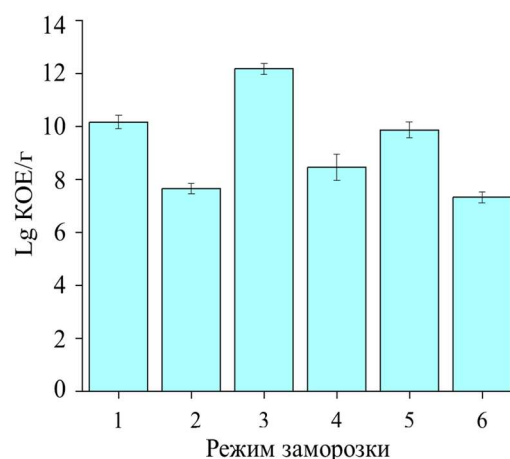


Рисунок 3 – Количество КОЕ после лиофилизации бактерий при различных протоколах заморозки

Figure 3 - The number of CFU after lyophilization of bacteria under various freezing protocols

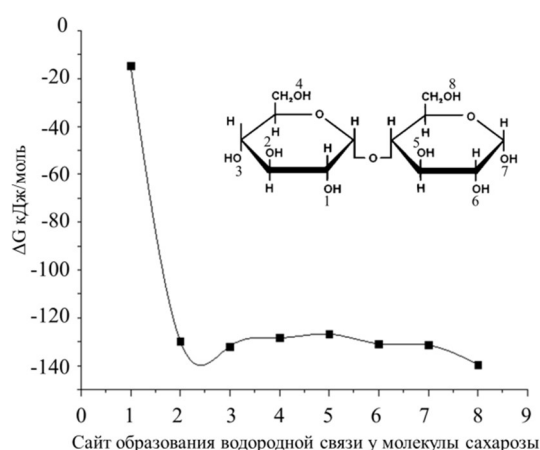


Рисунок 4 – График зависимости энергии Гиббса от сайта образования водородной связи у молекулы сахарозы

Figure 4 - Graph of the Gibbs energy dependence on the site of hydrogen bond formation in a sucrose molecule

Таким образом, добавление сахарозы к бактериям может быть использовано в качестве криопротектора, который защищает биологические объекты от повреждений при замораживании и лиофилизации.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология подготовки *Bacillus coagulans* и *Streptococcus thermophilus* к замораживанию и лиофилизации. Представленная технология позволяет проводить совместное культивирование двух бактерий. Квантово-химическими расчетами оценена эффективность использования сахарозы в качестве криопротектора для совместного культивирования молочнокислых бактерий *Bacillus coagulans* и *Streptococcus thermophilus*. Результаты показали, что добавление сахарозы к биомассе в соотношении 3 : 1 значительно уменьшает повреждения клеток, вызванные замораживанием.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Sompach, G., Rodklontan, A., Nitisinprasert, S., Chitprasert, P. Microencapsulating Role of Whey Protein Isolate and Sucrose in Protecting the Cell Membrane and Enhancing Survival of Probiotic Lactobacilli Strains during Spray Drying, Storage, and Simulated Gastrointestinal Passage. *Food Research International* 2022, 159, 111651. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111651>.
2. Huang, S., Vignolles, M.-L., Chen, X.D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., Jeantet, R. Spray Drying of Probiotics and Other Food-Grade Bacteria: A Review. *Trends Food Sci Technol* 2017, 63, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>.

3. Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., Valkonen, S., Korhonen, O., Fernandes, F.M., Yliperttula, M. Preservation of Biomaterials and Cells by Freeze-Drying: Change of Paradigm. *Journal of Controlled Release* 2021, 336, 480-498. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.042>.

4. Estilarte, M.L., Tymczyszyn, E.E., Seradell, M. de los Á., Carasi, P. Freeze-Drying of Enterococcus Durans: Effect on Their Probiotics and Biopreservative Properties. *LWT* 2021, 137, 110496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110496>.

5. Bellali, S., Bou Khalil, J., Fontanini, A., Raoult, D., Lagier, J.-C. A New Protectant Medium Preserving Bacterial Viability after Freeze Drying. *Microbiol Res* 2020, 236, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126454>.

6. Câmara Júnior, A. de A., Nguyen, T.D., Jossier, A., Endrizzi, A., Saurel, R., Simonin, H., Husson, F. Improving Total Glutathione and Trehalose Contents in *Saccharomyces Cerevisiae* Cells to Enhance Their Resistance to Fluidized Bed Drying. *Process Biochemistry* 2018, 69, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.013>.

7. Mohideen Batcha, M.F., Amirordin, S.H., Md Yudin, A.S. Fluidized Bed Dryers. In *Drying Technology in Food Processing*; Elsevier, 2023; pp. 67-122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819895-7.00006-7>.

8. Vorländer, K., Bahlmann, L., Kwade, A., Finke, J.H., Kampen, I. Effect of Process Parameters, Protectants and Carrier Materials on the Survival of Yeast Cells during Fluidized Bed Granulation for Tableting. *Pharmaceutics* 2023, 15 (3), 884. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030884>.

9. Wolkers, W.F., Oldenhof, H., Tang, F., Han, J., Bigalk, J., Sieme, H. Factors Affecting the Membrane Permeability Barrier Function of Cells during Preservation Technologies. *Langmuir* 2019, 35 (23), 7520-7528. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02852>.

10. Mizuno, M., Matsuzaki, T., Ozeki, N., Katanoh, H., Koga, H., Takebe, T., Yoshikawa, H.Y., Sekiya, I. Cell Membrane Fluidity and ROS Resistance Define DMSO Tolerance of Cryopreserved Synovial MSCs and HUVECs. *Stem Cell Res Ther* 2022, 13 (1), 177. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02850-y>.

11. Mazur, P., Leibo, S.P., Chu, E.H.Y. A Two-Factor Hypothesis of Freezing Injury. *Exp Cell Res* 1972, 71 (2), 345-355. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90303-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90303-5).

12. Murray, K.A., Gibson, M.I. Chemical Approaches to Cryopreservation. *Nat Rev Chem* 2022, 6 (8), 579-593. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00407-4>.

13. Alves, N.J., Turner, K.B., Medintz, I.L., Walper, S.A. Protecting Enzymatic Function through Directed Packaging into Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Sci Rep* 2016, 6 (1), 24866. <https://doi.org/10.1038/srep24866>.



РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ  
ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *VACILLUS COAGULANS*  
И *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

14. Yang, J., Pan, C., Zhang, J., Sui, X., Zhu, Y., Wen, C., Zhang, L. Exploring the Potential of Biocompatible Osmoprotectants as Highly Efficient Cryoprotectants. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017, 9 (49), 42516-42524. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b12189>.

15. Zachariassen, K.E., Kristiansen, E. Ice Nucleation and Antinucleation in Nature. *Cryobiology* 2000, 41 (4), 257-279. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2289>.

16. Gao, W., Smith, D.W., Li, Y. Effects of Freezing on the Survival of Escherichia Coli and Bacillus and Response to UV and Chlorine After Freezing. *Water Environment Research* 2007, 79 (5), 507-513. <https://doi.org/10.2175/106143006X115426>.

17. Raju, R., Bryant, S.J., Wilkinson, B.L., Bryant, G. The Need for Novel Cryoprotectants and Cryopreservation Protocols: Insights into the Importance of Biophysical Investigation and Cell Permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2021, 1865 (1), 129749. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129749>.

18. Hasan, M., Fayter, A.E.R., Gibson, M.I. Ice Recrystallization Inhibiting Polymers Enable Glycerol-Free Cryopreservation of Microorganisms. *Biomacromolecules* 2018, 19 (8), 3371-3376. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00660>.

19. Kommineni, N., Butreddy, A., Sainaga Jyothi, V.G.S., Angsantikul, P. Freeze-Drying for the Preservation of Immunoengineering Products. *i Science* 2022, 25 (10), 105127. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105127>.

20. Dumont, F., Marechal, P.-A., Gervais, P. Cell Size and Water Permeability as Determining Factors for Cell Viability after Freezing at Different Cooling Rates. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70 (1), 268-272. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.268-272.2004>.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare that there is no conflict of interest.*

*Статья поступила в редакцию 14 октября 2023; одобрена после рецензирования 29 февраля 2024; принята к публикации 06 мая 2024.*

*The article was received by the editorial board on 14 Oct 2023; approved after editing on 29 Feb 2024; accepted for publication on 06 May 2024.*

**Информация об авторах**

*М. С. Ашихмина – аспирант научно-образовательного центра инфохимии Университета ИТМО.*

*В. Ф. Краснова – магистрант научно-образовательного центра инфохимии Университета ИТМО.*

*О. Ю. Орлова – к.т.н. доцент научно-образовательного центра инфохимии Университета ИТМО.*

*С. А. Уласевич – к.х.н. научно-образовательного центра инфохимии Университета ИТМО.*

*Е. В. Скорб – д.х.н. профессор научно-образовательного центра инфохимии Университета ИТМО*

**Information about the authors**

*M.S. Ashikhmina - postgraduate student of the Scientific Infochemistry Center of ITMO University.*

*V.F. Krasnova - Master's student of the Scientific Infochemistry Center of ITMO University of ITMO University.*

*O.Y. Orlova - Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Scientific Infochemistry Center of ITMO University of the ITMO University.*

*S.A. Ulasevich - Candidate of Chemical Sciences of the Scientific Infochemistry Center of the ITMO University ITMO University.*

*E.V. Skorb - Doctor of Chemical Sciences, Professor of the Scientific Infochemistry Center of ITMO University of the ITMO University.*