

Криоконсервирование производственных штаммов пробиотиков *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Lactobacillus bulgaricus* 1Z 03501 в различных защитных средах

А.Е. АНАНЫНА, А.В. ШЕГЛОВ, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Production Strains of Probiotics *Bifidobacterium Bifidum* 1 and *Lactobacillus Bulgaricus* 1Z 03501 in Different Cryoprotective Media

A.E. ANANYINA, A.V. SHCHEGLOV, I.P. VYSEKANTSEV

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Криоконсервирование – один из наиболее надежных способов долгосрочного хранения микроорганизмов. Помимо хранения микробных культур в коллекциях, криоконсервирование все чаще применяют для создания запасов посевного материала с последующим посевом в ферментеры криоконсервированных стартовых культур. В связи с этим актуальна разработка максимально унифицированных методов криоконсервирования микроорганизмов из различных таксонов, имеющих разную исходную криоустойчивость, на которую влияют видовые особенности строения, физиологии и культивирования.

Изучали влияние режимов охлаждения и состава сред криоконсервирования на жизнеспособность и пролиферативные свойства производственных штаммов пробиотиков *B. bifidum* 1 и *L. bulgaricus* 1Z 03501. Образцы замораживали со скоростями охлаждения 1, 5, 10, 15 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот и непосредственным погружением криопробирок в жидкий азот (-196°C). В качестве сред криоконсервирования использовали ростовую среду Блаурокка, среды СМЛ-1 и СМЛ-2 (водные растворы сахарозы, обезжиренного молока и лактозы в различной концентрации), 0,5 и 1%-е растворы альгината натрия.

Показано, что замораживание бактерий *B. bifidum* 1 со скоростью 1 град/мин во всех защитных средах, кроме среды Блаурокка, обеспечивало сохранность клеток на исходном уровне. Было установлено, что бактерии *L. bulgaricus* 1Z 03501 более устойчивы к повреждающему действию низких температур. При замораживании в средах Блаурокка и СМЛ-2 со всеми изучаемыми скоростями охлаждения сохранялось исходное количество жизнеспособных клеток. Замораживание со скоростью 5 град/мин в среде Блаурокка и в 1%-м растворе альгината натрия обеспечивало исходную жизнеспособность обеих бактерий. После замораживания по всем режимам наблюдали увеличение продолжительности lag- и начала log-фаз роста периодических культур. Время выхода этих культур в стационарную фазу роста и прирост биомассы не отличались от показателей контрольных культур.

Криоконсервирование не влияло на морфологические и культуральные свойства изучаемых микроорганизмов.

Cryopreservation is one of the most reliable methods for long-term storage of microorganisms. Except the storage of microbial cultures in collections the cryopreservation is more often applied for creating the stock of inoculum with the following inoculation of cryopreserved starter cultures into bioreactors. Herewith it is actual to develop maximally unified cryopreservation methods for microorganisms of different taxons with various initial cryoresistance, which is affected by specific peculiarities in structure, physiology and culturing.

The effect of cooling regimens and cryopreservation media composition on viability and proliferative features of technological probiotic strains *B. bifidum* 1 and *L. bulgaricus* 1Z 03501 was studied. The samples were frozen with the cooling rates of 1, 5, 10, 15 deg/min down to -40°C with following plunging into liquid nitrogen and direct plunging of cryovials into liquid nitrogen (-196°C). We used Blaurock growth medium, media SML-1 and SML-2 (aqueous solution of sucrose, skimmed milk and lactose of different concentration), 0.5 and 1% sodium alginate solutions as the cryopreservation media.

It has been shown that freezing of bacteria *B. bifidum* 1 with the rate of 1 deg/min in all the cryoprotective media except Blaurock medium provided the cell survival at primary level. We have established that bacteria *L. bulgaricus* 1Z 03501 are more resistant to the damage effect of low temperatures. Initial number of viable cells was preserved during freezing in Blaurock and SML-2 media with all the studied cooling rates. Freezing with the rate of 5 deg/min in Blaurock medium and 1% sodium alginate preserved the initial viability of both bacteria. After freezing according all the regimens we observed the increased duration of lag-phase and of the log-phase start in growth of periodic cultures. Yield time of these cultures in stationary growth phase and biomass increase did not differ from the indices of the control cultures.

Cryopreservation did not affect the morphological and cultural properties of the studied microorganisms.