

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ И СООБЩЕНИЯ

SCIENTIFIC REVIEWS AND REPORTS

DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-6-1008

EDN: YNAEBU

УДК 57.083.13



Обзорная статья

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ
БАКТЕРИЙ: ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ЛИОФИЛИЗАЦИИ
НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПРОБИОТИКОВ**

*М.С. Ашихмина, В.С. Филозон, М.О. Володарский,
С.А. Уласевич, Е.В. Скорб*

Аннотация

Обоснование. Сохранение бактериальных культур имеет важное значение в научных исследованиях и промышленном производстве, как пищевого, так и медицинского назначения. Исследование влияния процесса лиофилизации на выживаемость бактерий имеет важное значение для разработки эффективных методов применения пробиотиков. На основании анализа более трехсот публикаций отечественных и зарубежных исследовательских групп, выделено около тридцати ключевых факторов, оказывающих влияние на сохранность бактерий в процессе лиофилизации. Однако для уравнения, описывающего выживаемость бактерий при лиофилизации, были учтены семнадцать параметров, которые являются наиболее значимыми для обеспечения успешной лиофилизации бактериальных культур. Стоит отметить, что при детальном рассмотрении, многие факторы в общем уравнении выживаемости невозможно или очень сложно отследить. В связи с этим, в представленной работе были приняты допущения для упрощения уравнения. Выявление функции ценности, отражающей насколько ценно влияние введенного параметра на выживаемость микроорганизмов после криозаморозки позволит создать виртуальную модель процесса для исследования выживаемости бактерий.

Цель. Целью данного обзора является выявление и обобщение параметров, влияющих на выживаемость бактерий в процессе лиофилизации, а также поиск закономерностей между основными параметрами физических процессов и выживаемостью бактерий после лиофилизации и криоконсервации.

Материалы и методы. Поиск литературы был осуществлен с использованием следующих электронных баз данных: GoogleScholar, ScienceDirect, PudMed, КиберЛенинка. Поисковые запросы включали комбинации следующих фраз: «лиофилизация бактерий», «исследование пробиотиков», «криоконсервация», «уравнение выживаемости бактерий при лиофилизации», «функция ценности».

Результаты. Бактериальные культуры являются важным компонентом многих научных и медицинских исследований. Сохранение чистых культур важно для того, чтобы обеспечить их жизнеспособность и полезность для будущих исследований. Существует несколько методов сохранения бактериальных культур: охлаждение, замораживание и лиофилизацию. В работе основной фокус уделяется факторам, влияющим на накопление бактериальной массы при культивировании, а также факторам, влияющим на выживаемость бактерий при лиофилизации. На основе отобранных параметров найдено уравнение, включающее наиболее значимые параметры, влияющие на выживаемость бактерии при криоконсервации и лиофилизации. Однако при детальном рассмотрении уравнения были выявлены параметры, которые в большинстве исследований являются постоянными при работе с молочнокислыми бактериями. В работе представлен обзор параметров и режимов культивирования и лиофилизации, влияющих на выживаемость бактерий. Различные факторы, такие как подготовительные этапы, параметры культивирования и замораживание, оказывают влияние на функцию выживаемости бактерий при лиофилизации. Понимание этих факторов имеет ключевое значение для оптимизации процесса лиофилизации и повышения эффективности сохранения микроорганизмов. Дальнейшие исследования в этой области помогут улучшить качество консервированных пробиотиков и расширить область их применения.

Заключение. В рамках работы было проанализировано более трехсот публикаций отечественных и зарубежных исследовательских групп, из которых было отобран 31 наиболее важный фактор, влияющий на выживаемость бактерий при лиофилизации. Однако, много параметров в общем уравнении выживаемости значительно усложняют расчет, а порой влияют опосредованно. В связи с этим, в представленной работе были проведены исследования для упрощения уравнения. Таким образом, данный обзор позволит в дальнейшем получить функцию ценности для оптимизации процесса и повышения

эффективности сохранения микроорганизмов при криоконсервации и лиофилизации. Такой подход позволит сделать модель более удобной для анализа и применения на практике.

Ключевые слова: бактериальные культуры; функция ценности; жизнеспособность бактерий; эффективность сохранений; уравнение выживаемости

Для цитирования. Ашихмина М.С., Филозоп В.С., Володарский М.О., Уласевич С.А., Скорб Е.В. Оптимизация лиофилизации бактерий: влияние параметров культивирования и лиофилизации на выживаемость пробиотиков // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 2024. Т. 16, №6. С. 515-534. DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-6-1008

Scientific review

OPTIMIZATION OF BACTERIAL LYOPHILIZATION PROCESS: INFLUENCE OF CULTIVATION AND LYOPHILIZATION PARAMETERS ON PROBIOTIC SURVIVAL RATE

*M.S. Ashikhmina, V.S. Filozop, M.O. Volodarskiy,
S.A. Ulasevich, E.V. Skorb*

Abstract

Background. The preservation of bacterial cultures plays an important role in scientific research and industrial production, both food and medical. The study of the influence of lyophilization process on bacterial survival is important for the development of effective methods of probiotic application. Based on the analysis of more than three hundred publications by domestic and foreign research groups, about thirty key factors influencing the survival of bacteria during the lyophilization process have been identified. However, for the equation describing the survival rate of bacteria during lyophilization, seventeen parameters were taken into account, which are the most significant for ensuring successful lyophilization of bacterial cultures. It is worth noting that when considered in detail, many factors in the overall survival equation are impossible or very difficult to trace. Therefore, in the presented work, conditions have been taken to simplify the equation. Identification of the value function reflecting how valuable the influence of the introduced parameter on the survival of microorganisms after cryofreezing will allow to create a virtual process model for the study of bacterial survival.

Purpose. The purpose of this review is to summarize and discuss the parameters affecting bacterial survival during lyophilization. Obtaining a value function is important for optimizing the process and improving the preservation efficiency of microorganisms. This paper discusses the role of various influencing factors on bacterial survival rate during multistage lyophilization and their impact on the quality of preserved probiotics.

Materials and methods. A literature search was performed using the following electronic databases: Google Scholar, Science Direct, PubMed, and CyberLeninka. Search queries included combinations of the following phrases: “bacterial lyophilization”, “probiotic research”, “cryopreservation”, “bacterial survival equation for lyophilization”, “value function”.

Results. Bacterial cultures are an important component of many scientific and medical studies. Preservation of bacterial cultures is important to ensure their viability and usefulness for future research. There are several methods of preserving bacterial cultures including refrigeration, freezing and lyophilization. This paper presents the factors affecting bacterial mass accumulation during cultivation and the factors affecting bacterial survival rate during lyophilization. Based on the selected parameters, an equation including the most significant parameters affecting bacterial survival rate during cryopreservation and lyophilization is presented. However, a detailed examination of the equation revealed parameters that are constant in most studies when dealing with lactic acid bacteria. This paper presents an overview of the parameters and modes of cultivation and lyophilization that affect the survival rate of bacteria. Various factors such as preparation steps, cultivation parameters and freezing affect the bacterial survival function during lyophilization. Understanding these factors is key to optimize the lyophilization process and improve microbial preservation efficiency. Further research in this area will help to improve the quality of preserved probiotics and broaden the scope of their application.

Conclusion. Thus, with an increase in infectious load or atrophic changes in the mucosa of the stomach does not exclude the exhaustion of reserve capacity of phagocytes, their modification, thus the transformation of precancerous condition in cancer.

Keywords: bacterial cultures; value function; bacterial viability; preservation efficiency; survival equation

For citation. Ashikhmina M.S., Filozop V.S., Volodarskiy M.O., Ulasevich S.A., Skorb E.V. Optimization of Bacterial Lyophilization Process: Influence of Cultivation and Lyophilization Parameters on Probiotic Survival Rate. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2024, vol. 16, no. 6, pp. 515-534. DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-6-1008

Введение

Бактериальные культуры являются важным компонентом многих научных и медицинских исследований. Сохранение бактериальных культур важно для того, чтобы обеспечить их жизнеспособность и полезность для будущих исследований. Существует несколько методов сохранения бактериальных культур, включая охлаждение, замораживание и лиофилизацию.

Выживаемость бактерий при лиофилизации является ключевым аспектом в области сохранения и устойчивости микроорганизмов. Исследование влияния процесса лиофилизации на жизнеспособность бактерий имеет важное значение для разработки эффективных методов консервации и применения пробиотиков в пищевой и фармацевтической промышленности [1]. Стоит учитывать, что на процесс выживания бактерий влияет не только сам процесс лиофилизации, но подготовительные этапы, такие как накопленная биомасса бактерий, параметры культивирования, замораживание и другие.

При криоконсервации и замораживании происходит повреждение клеток [2; 3], которое может быть вызвано как внутриклеточным, так и внеклеточным образованием кристаллов льда, также целостность клеток зависит от скорости охлаждения [4]. Вначале зарождение и образование льда происходят во внешней среде, но плазматическая мембрана предотвращает внутриклеточный рост кристаллов льда, сохраняя внутриклеточную воду незамерзшей и переохлажденной. При росте кристаллов концентрация растворителей увеличивается, образуя гипертонический раствор [2]. Этот дисбаланс компенсируется повышенным оттоком воды, что приводит к усыханию клеток, известному как «сублимационная дегидратация» [5; 6]. Образование внутриклеточного льда и острых кристаллов может привести к разрыву клеточных органелл и мембран, что обычно приводит к гибели клетки [7]. При высокой скорости охлаждения вода не успевает переместиться из более разбавленного внутриклеточного пространства в концентрированную внеклеточную среду, поэтому внутри клеток остается большее количество переохлажденной воды, которая кристаллизуется при дальнейшем охлаждении. Однако растворители легче витрифицируются, и клетки находятся в концентрированном гипертоническом растворе более короткое время [8; 9]. При более медленной скорости охлаждения вода успевает выйти из клеток, что приводит к более выраженному осмотическому стрессу и большей усадке (рис 1).

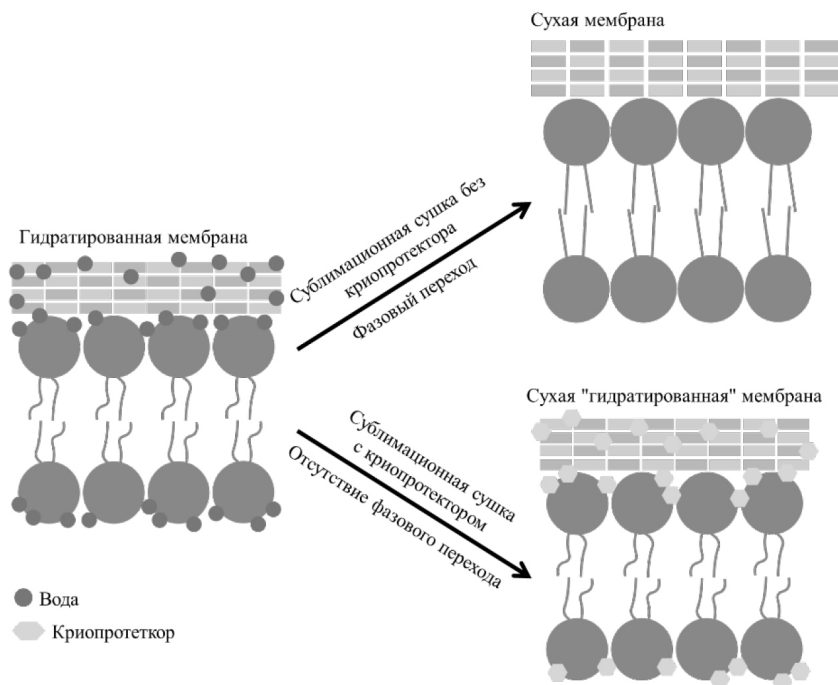


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая влияние дегидратации на фосфолипидный слой бактерий без и с криопротектором

Правильное регулирование параметров лиофилизации, таких как температура, влажность и длительность процесса, играет важную роль в обеспечении оптимального сохранения живых бактерий. Тщательное изучение и контроль этих параметров помогут обеспечить высокое качество бактериальных культур для будущих исследований.

Цель исследования

Целью данного обзора является обобщение и обсуждение параметров, влияющих на выживаемость бактерий в процессе лиофилизации. Получение функции ценности имеет важное значение для оптимизации процесса и повышения эффективности сохранения микроорганизмов. В данной статье рассматривается роль различных факторов, воздействующих на выживаемость бактерий при многоступенчатой лиофилизации и их влияние на качество консервированных пробиотиков.

Материалы и методы

Поиск литературы был осуществлен с использованием следующих электронных баз данных: GoogleScholar, ScienceDirect, PudMed, Кибер-Ленинка. Поискковые запросы включали комбинации следующих фраз: «лиофилизация бактерий», «исследование пробиотиков», «криоконсервация», «уравнение выживаемости бактерий при лиофилизации», «функция ценности». Поиск ограничивался материалами с 2016 по 2024 год, однако присутствуют и более ранние публикации, в которых отражены фундаментальные подходы к исследованию выживаемости бактерий при лиофилизации. В анализ включались статьи, опубликованные на русском и английском языках, содержащие эмпирические данные о культивировании, замораживании и лиофилизации бактерий.

Результаты и обсуждения исследования

Лиофилизация бактерий многоступенчатый этап. На выживаемость бактерий влияют несколько факторов, связанных с культивированием бактерий (рис. 2). Для успешного культивирования бактерий в лаборатории необходимо учитывать ряд факторов. Во-первых, состав питательной среды должен включать в себя необходимые питательные вещества, такие как углеводы, белки, липиды и минералы, а также иметь оптимальное соотношение между ними. Во-вторых, pH среды играет важную роль, поскольку большинство бактерий предпочитает нейтральную или слабощелочную среду. Изменение pH может негативно повлиять на рост и размножение бактерий. Третий фактор – температура культивирования, каждый вид бактерий имеет свой оптимальный диапазон температур для роста и размножения. Четвертый фактор – газовая среда, например кислород. Некоторые бактерии требуют кислорода для роста, а другие – наоборот, не могут размножаться в присутствии кислорода. Продолжительность культивирования также может влиять на количество бактериальной массы. Наличие ингибиторов роста, некоторые компоненты питательной среды могут содержать ингибиторы роста бактерий, что может снизить количество бактериальной массы.

Кроме вышеперечисленных факторов, при культивировании бактерий также необходимо учитывать состав мембраны бактерий, поскольку он может влиять на проницаемость мембраны и способность бактерий к поглощению питательных веществ. Также важен выбор правильного метода пассажа, который позволяет сохранить стабильность генетического материала бактерий при последовательных пересевах. Вид и штамм бактерий также могут влиять на эффективность культивирования, поскольку раз-

личные виды и штаммы могут иметь разные требования к условиям культивирования и чувствительность к антибиотикам и ингибиторам роста.

При культивировании бактерий важную роль играет состав питательной среды (А), вид и штамм бактерий (В), а также другие характеристики, связанные с непосредственно самой клеточной культуры (пассаж, генотип, грамположительные, грамотрицательные, споровые бактерии или иные клетки). Помимо перечисленных факторов, на биомассу бактерий оказывает влияние соотношение объема питательной среды (V_A) к массе бактерий (V_B) от температуры ($T_{\text{рост}}$) и продолжительности культивирования ($\tau_{\text{рост}}$).

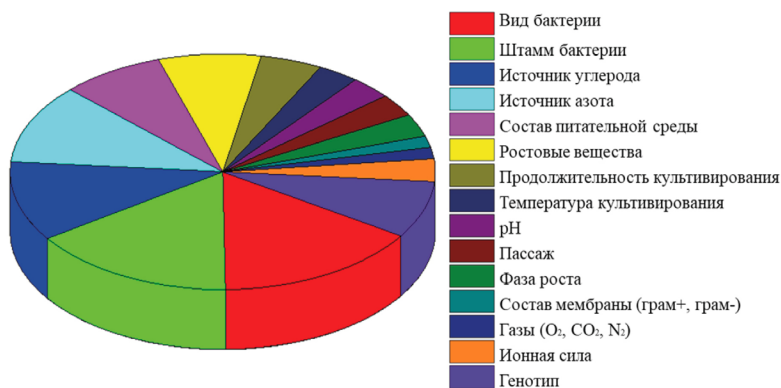


Рис. 2. Факторы, влияющие на накопление бактериальной массы при культивировании

С целью сохранения видового состава, стабилизации бактериальных клеток, уменьшения энергозатрат при хранении проводят лиофильную сушку. Лиофильная сушка является наиболее распространенным методом сохранения биологических объектов, в том числе молочнокислых бактерий, что облегчает их хранение и транспортировку без трудоемкой и дорогостоящей холодильной цепи. На процесс лиофилизации влияет множество факторов: скорость заморозки, тип криопротектора, изначальная концентрация микроорганизмов и другие, представленные на рисунке 3.

Важным аспектом является отделение бактериальной массы (V_B) от питательной среды. При использовании центрифуги важно учитывать скорость (g) и продолжительность ($\tau_{\text{центр}}$), а также температуру ($T_{\text{центр}}$) центрифугирования.

После завершения процесса центрифугирования и отделения бактериальной массы от питательной среды, следующий этап включает заморозку

бактерий для последующей лиофилизации. Заморозка бактерий проводится с криопротектором (К), в соотношенит (объем) (V_K). Необходимо учитывать продолжительность ($\tau_{зам}$) и температура ($T_{зам}$) заморозки, а также далее параметры лиофилизации, которые важно учитывать давление ($p_{суш}$), температура ($T_{суш}$), и продолжительность сушки ($\tau_{суш}$).



Рис. 3. Факторы, влияющие на выживаемость бактерий при лиофилизации

В данном разделе описаны наиболее важные переменные, влияющие на выживаемость бактерий при лиофилизации.

Таким образом, получаем параметры, которые в большей степени влияют на выживаемость бактерий (xx):

$$x = (A, B, V_A, V_B, T_{\text{рост}}, \tau_{\text{рост}}, V'_B, K, V_K, T_{\text{зам}}, \tau_{\text{зам}}, P_{\text{суш}}, T_{\text{суш}}, \tau_{\text{суш}}, \tau_{\text{центр}}, g, T_{\text{центр}})$$

Допущение 1

$$\tau_{\text{рост}}(B) = \text{const}$$

$$T_{\text{рост}} = 37 \pm 1^\circ\text{C} = \text{const}$$

Продолжительность и температура культивирования молочнокислых бактерий выбирается в зависимости от вида и штамма бактерий. Важно отметить, для большинства молочнокислых бактерий идеальные условия

для роста и размножения обычно устанавливаются в пределах от 30 до 42°C. Некоторые из наиболее распространенных молочнокислых бактерий (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* и другие) хорошо развиваются при температуре около 37°C [10–21].

Продолжительность культивирования может варьироваться от нескольких часов до нескольких дней в зависимости от цели культивирования. Важно, чтобы криоконсервация микроорганизмов была произведена в поздней экспоненциальной фазе/ранней стационарной: именно в этой фазе клеточная структура имеет максимальный объем, а, значит, обезвоживание будет происходить с заметно более низкой скоростью (рис. 4). Тогда при определенных оптимальных условиях, продолжительность культивации составляет от 15 до 19 часов, но может доходить до 24 ч.

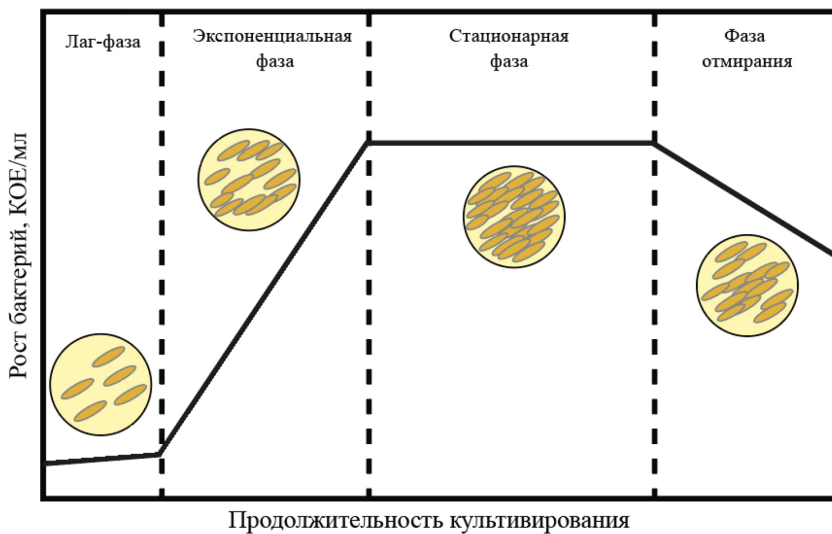


Рис. 4. Общая динамика развития и роста бактерий

Допущение 2

$$\tau_{\text{центр}} = \text{const}$$

$$g = \text{const}$$

$$T_{\text{центр}} = \text{const}$$

При отделении биомассы бактерий от питательной среды важно подобрать оптимальные параметры центрифугирования. Одним из наиболее

простых и быстрых методов отделения биомассы в лабораторных условиях является центрифугирование. Для минимизирования повреждения и изменения структуры клеточных мембран при осаждении биомассы важно учитывать тип клеток и их чувствительность.

В целом, при извлечении биомассы из культуральной среды центробежное ускорение используется для разделения жидкой и твердой фаз биомассы. Чем больше ускорение, тем быстрее происходит разделение фаз, однако страдает жизнеспособность клеток. Применение более низких скоростей и более коротких времен центрифугирования может помочь в сохранении целостности клеток.

Температура также играет важную роль при отделении биомассы. Высокая температура может ускорить процесс разделения фаз, но может также повредить клетки и уменьшить выход биомассы. Низкая температура опасна при центрифугировании для клеток, так как вода может начать кристаллизоваться, и повреждать клеточные структуры или изменять функциональность клеток.

Продолжительность процесса извлечения биомассы зависит от штамма культуры. Некоторые культуры могут быть быстро отделены от среды, в то время как другие требуют длительного процесса разделения фаз.

На основании литературных данных и экспериментов определены средняя скорость центрифугирования равная 3000–5000 об/мин и оптимальное время –7 минут при температуре 20–25°C [22–26].

Допущение 3

$$T_{\text{зам}} = \text{const}$$

$$t_{\text{зам}} = \text{const}$$

Известно, что заморозка приостанавливает биологические процессы, в том числе предотвращающие разрушение клеток. При замораживании бактерий можно выделить несколько этапов: подготовка, включающая в себя добавление криопротектора; замораживание, где образцы помещаются в морозильник с температурой –80°C и меньше или замораживаются с помощью жидкого азота до –196°C; лиофилизация или хранение в замороженном виде, без существенной потери жизнеспособности.

Обычно замораживание проводят, снижая температуру от –80°C до –196°C быстро (в течение нескольких минут) или медленно (до нескольких часов). Продолжительность замораживания может быть увеличена для более крупных объемов культуры или для более чувствительных к замораживанию бактерий, требующих плавного снижения температуры среды.

По мере снижения температуры, снижается и кинетическая энергия внутри клетки. Быстрые скорости охлаждения не дают достаточно времени, чтобы оптимальное количество воды вышло из переплазматического пространства, отсюда увеличивается вероятность кристаллизации, что, как было описано ранее, приведет к большей вероятности клеточной гибели. Оптимальной температурой и временем заморозания было выбрано -80°C и 15 часов [27–34].

Допущение 4

$$P_{\text{суш}} = \text{const}$$

$$T_{\text{суш}} = \text{const}$$

$$\tau_{\text{суш}} = \text{const}$$

В процессе лиофилизации в камере создается вакуум, чтобы снизить давление вокруг образца и способствовать сублимации льда. Далее необходимо подобрать правильные параметры: длительность, интервал температур и давления, для уменьшения возможных повреждений клеточных структур, так как давление, температура и продолжительность лиофилизации могут существенно влиять на выживаемость бактерий.

Давление. Высокое давление может повредить клеточные мембраны и снизить выживаемость. Используя низкое давление можно уменьшить время лиофилизации и существенно улучшить сохранение бактерий. Установлено, что оптимальное давление для сушки находится в интервале от 0,08 Па до 70 Па.

Температура. Высокая температура может привести к денатурации белков и других молекул, что может снизить выживаемость бактерий. Однако низкая температура может замедлить процесс лиофилизации и увеличить время, необходимое для сохранения бактерий. Изучив условия лиофилизации в публикациях, можно определить оптимальную температуру в начале процесса и скорость повышения температуры в следующих стадиях. Выявлено, что первичную сушку предпочтительно осуществлять при температуре $-40^{\circ}\pm 5^{\circ}$ с повышением температуры $2,5\text{--}5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$.

Продолжительность лиофилизации. Длительная лиофилизация может привести к повреждению клеточных структур и снижению выживаемости бактерий. Однако слишком короткое время лиофилизации может не обеспечить полное удаление воды из образца, что также может привести к снижению выживаемости. Продолжительность варьируется от 19 до 30 часов и зависит от других параметров лиофильного высушивания.

Таким образом, оптимальные условия лиофилизации должны быть определены для каждого типа бактерий в зависимости от их особенностей и требований к хранению [35].

Допущение 5

$$V_A = \text{const}$$

$$V_B = \text{const}$$

Соотношение объема питательной среды и биомассы зависит от многих факторов, таких как вид микроорганизма, условия окружающей среды, наличие питательных веществ и т.д. В общем случае, чем больше объем питательной среды, тем больше биомассы может быть выращено. Однако, если среда будет слишком питательной, то это может привести к перерастанию микроорганизмов и неправильному формированию клеток. С другой стороны, если среда будет недостаточно питательной, то это может замедлить рост и развитие микроорганизмов. Поэтому оптимальное соотношение объема питательной среды и биомассы должно быть подобрано индивидуально для каждого конкретного случая. В большинстве работ начальный объем питательной среды составляет 100 мл, инокулируют суспензией микроорганизмов, объемом 1 мл 0,1 OD₆₀₀, такая стартовая культура позволяет наращивать достаточное количество клеток для исследования их криозащиты и не затрачивать большое количество ресурсов.

Принимая во внимание все указанные допущения, получаем функцию:

$$x = (A, B, V'_B, K, V_K)$$

На основании предыдущих исследований (рис. 5) и литературного обзора найдено, что объем криопротектора по отношению к биомассе составляет 3:1 или 4:1 [36]. Такое соотношение позволяет достичь оптимальной защиты клеток от повреждений при замораживании и последующей сушки. Увеличение массы (объема) криопротектора приведет к увеличению продолжительности замораживания и лиофилизации из-за высокой теплоемкости воды. Отношение криопротектора к биомассе обусловлено тем, что при такой концентрации криопротекторы эффективно снижают температуру фазового перехода воды, меняя при этом кристаллическую структуру льда, предотвращают гидратацию и образование эвтектики.

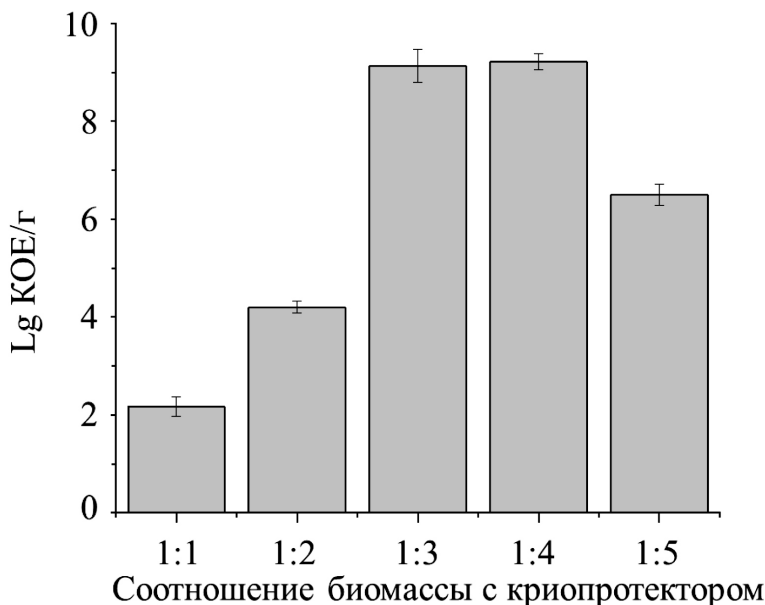


Рис. 5. Сравнительная характеристика соотношения биомассы и криопротектора при замораживании

Следовательно, функция принимает вид:

$$V_K = 3V'_B$$

$$x = (A, B, V'_B, K, 3V'_B)$$

Масса бактерий после центрифугирования зависит от начальных параметров культивирования (состава питательной среды, вида бактерий, соотношения бактерий и объема среды, температуры и продолжительности культивирования и других параметров):

$$V'_B = (A, B, V_A, V_B, T_{\text{рост}}, \tau_{\text{рост}})$$

Так образом, получаем следующие параметры, которые позволяют оценивать и регулировать количество живых бактерий в процессе лиофилизации:

$$x = (A, B, V'_B, K, V_K)$$

$$V'_B = (A, B, V_A, V_B, T_{\text{рост}}, \tau_{\text{рост}})$$

$$V_K = 3V'_B$$

Заключение

Бактериальные культуры играют ключевую роль в научных и медицинских исследованиях. Методы сохранения бактериальных культур, включая лиофилизацию, имеют важное значение для обеспечения стабильности и устойчивости микроорганизмов. Исследование влияния процесса лиофилизации на выживаемость бактерий может найти свое применение для разработки эффективных методов консервации и применения пробиотиков в пищевой и фармацевтической промышленности. Различные факторы, такие как подготовительные этапы, параметры культивирования и замораживание, оказывают влияние на функцию выживаемости бактерий при лиофилизации. Дальнейшие исследования в этой области помогут улучшить качество консервированных пробиотиков и расширить область их применения.

В рамках работы было проанализировано более трехсот публикаций отечественных и зарубежных исследовательских групп, из которых было отобран 31 наиболее важный фактор, влияющий на выживаемость бактерий при лиофилизации. Однако, многие факторы в общем уравнении выживаемости невозможно или очень сложно отследить. В связи с этим, в представленной работе были приняты допущения для упрощения уравнения. Таким образом, данный обзор позволит в дальнейшем получить функцию ценности для оптимизации процесса и повышения эффективности сохранения микроорганизмов при криоконсервации и лиофилизации. Такой подход позволит сделать модель более удобной для анализа и применения на практике.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация о спонсорстве. Работа выполнена при поддержке РФФ № 23-16-00224

Список литературы / References

1. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 3. С. 5–12. (Gracheva I.V., Osin A.V. Mechanisms of bacterial damage during lyophilization and protective effect of protective media. *Problems of especially dangerous infections*, 2016, no. 3, pp. 5-12). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-5-12>
2. Merivaara A. et al. Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm. *Journal of Controlled Release*, 2021, vol. 336, pp. 480–498. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.042>

3. Murray K.A., Gibson M.I. Chemical approaches to cryopreservation. *Nat Rev Chem.*, 2022, vol. 6, no. 8, pp. 579–593. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00407-4>
4. Wolkers W.F., Oldenhof H. *Principles Underlying Cryopreservation and Freeze-Drying of Cells and Tissues*. 2021, pp. 3–25. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_1
5. Bellali S. et al. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiol Res.*, 2020, vol. 236, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126454>
6. Peiren J., Hellemans A., De Vos P. Impact of the freeze-drying process on product appearance, residual moisture content, viability, and batch uniformity of freeze-dried bacterial cultures safeguarded at culture collections. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, vol. 100, no. 14, pp. 6239–6249. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7359-1>
7. Hauptmann A., Hoelzl G., Loerting T. Optical cryomicroscopy and differential scanning calorimetry of buffer solutions containing cryoprotectants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2021, vol. 163, pp. 127–140. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.03.015>
8. Broeckx G. et al. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm.*, 2016, vol. 505, no. 1–2, pp. 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.002>
9. Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiol.*, 2008, vol. 25, no. 3, pp. 429–441. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.12.004>
10. Briggs M. et al. The Preservation of Lactobacilli by Freeze-drying. *J Gen Microbiol.*, 1955, vol. 12, no. 3, pp. 503–512. <https://doi.org/10.1099/00221287-12-3-503>
11. Meng F.-B. et al. Effect of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus acidophilus fermentation on antioxidant activity and metabolomic profiles of loquat juice. *LWT*, 2022, vol. 171, 114104. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114104>
12. Anh Ngoc Le T., Jie Lin Lee J., Ning Chen W. Stimulation of lactic acid production and Lactobacillus plantarum growth in the coculture with Bacillus subtilis using jackfruit seed starch. *J Funct Foods*, 2023, vol. 104, 105535. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105535>
13. Wang T. et al. Food-grade expression system of Lactobacillus plantarum using β -galactosidase small subunit as selection marker and lactose as screening condition. *LWT*, 2023, vol. 182, 114922. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114922>

14. Tian J., Yin G., Zhang J. Combined metabolomic and proteomic analyses reveal the aerobic and respirative life-style of *Lactobacillus plantarum* SXC48. *LWT*, 2023, vol. 185, 115216. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115216>
15. Zong C. et al. Klebsiella as an α -tocopherol source facilitating *Lactobacillus plantarum* fermentation in rice straw silage1. *J Integr Agric.*, 2024, vol. 23, no. 12, pp. 4186-4202. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2023.11.036>
16. Anh Ngoc Le T., Jie Lin Lee J., Ning Chen W. Stimulation of lactic acid production and *Lactobacillus plantarum* growth in the coculture with *Bacillus subtilis* using jackfruit seed starch. *J Funct Foods*, 2023, vol. 104, 105535. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105535>
17. Renschler M.A. et al. Using nitrous acid-modified de Man, Rogosa, and Sharpe medium to selectively isolate and culture lactic acid bacteria from dairy foods. *J Dairy Sci.*, 2020, vol. 103, no. 2, pp. 1215–1222. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17041>
18. Thomas R.M. et al. Nutritional and sensory quality of Ofada rice sourdough bread made with selected lactic acid bacteria strains. *Heliyon*, 2023, vol. 9, no. 10, e20828. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20828>
19. Spacova I. et al. Development of a live biotherapeutic throat spray with lactobacilli targeting respiratory viral infections. *Microbial Biotechnology*, 2023, vol. 16, no. 1, pp. 99–115. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14189>
20. Li D. et al. Quercetin-enriched *Lactobacillus aviarius* alleviates hyperuricemia by hydrolase-mediated degradation of purine nucleosides. *Pharmacol Res.*, 2023, vol. 196, 106928. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106928>
21. Phengnoi P. et al. Characterization of levansucrase produced by novel *Bacillus siamensis* and optimization of culture condition for levan biosynthesis. *Heliyon.*, 2022, vol. 8, no. 12, e12137. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12137>
22. Duong T. et al. Characterization of the *tre* Locus and Analysis of Trehalose Cryo-protection in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 2, pp. 1218–1225. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1218-1225.2006>
23. Teng D. et al. Stabilization of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130T with the addition of disaccharides, polymers, and their mixtures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017, vol. 81, no. 4, pp. 768–773. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1279852>
24. Coghetto C.C. et al. *Lactobacillus plantarum* BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, vol. 47, no. 4, pp. 941–948. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.003>
25. Fossi B.T. et al. Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional cameroonian palm wine and corn beer exhibiting cholesterol lowering activity. *Heliyon.*, 2022, vol. 8, no. 11, e11708. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11708>

26. Lacerda Massa N.M. et al. Effects of digested jaboticaba (*Myrciariajaboticaba* (Vell.) Berg) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. *LWT*, 2020, vol. 131, 109766. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109766>
27. Papadopoulou E. et al. Adaptive laboratory evolution to hypersaline conditions of lactic acid bacteria isolated from seaweed. *N Biotechnol.*, 2023, vol. 75, pp. 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.03.001>
28. Jiang Y. et al. The therapeutic effects of fermented milk with lactic acid bacteria from traditional Daqu on hypertensive mice. *J Dairy Sci.*, 2024, vol. 107, no. 2, pp. 742–758. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23858>
29. Illikoud N. et al. Development of innovative fermented products by exploiting the diversity of immunomodulatory properties and fermentative activity of lactic and propionic acid bacteria. *Food Research International*, 2023, vol. 166, 112557. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112557>
30. Tatsaporn T., Kornkanok K. Using Potential Lactic Acid Bacteria Biofilms and their Compounds to Control Biofilms of Foodborne Pathogens. *Biotechnology Reports*, 2020, vol. 26, e00477. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00477>
31. Rocha-Mendoza D. et al. Growth of lactic acid bacteria in milk phospholipids enhances their adhesion to Caco-2 cells. *J Dairy Sci.*, 2020, vol. 103, no. 9, pp. 7707–7718. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18271>
32. Ahmed W.I. et al. Biocontrol of *Bacillus cereus* by *Lactobacillus plantarum* in Kareish cheese and yogurt. *LWT*, 2023, vol. 183, 114946. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114946>
33. Wang G.-Q. et al. Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *J Dairy Sci.*, 2020, vol. 103, no. 4, pp. 3066–3075. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685>
34. Stefanello R.F. et al. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomycesanomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, 2019, vol. 115, pp. 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.044>
35. Bodzen A. et al. Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage. *BMC Biotechnol.*, 2021, vol. 21, no. 1, p. 66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.044>
36. Giulio B. De et al. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World J Microbiol Biotechnol.*, 2005, vol. 21, no. 5, pp. 739–746. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-4735-2>

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку статьи для публикации.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The authors contributed equally to this article.

ДАнные ОБ АВТОРАХ

Ашихмина Мария Сергеевна, аспирант

Университет ИТМО

Кронверкский пр., 49А, г. Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация

msashikhmina@itmo.ru

Филозоп Владислав Сергеевич, бакалавр

Университет ИТМО

Кронверкский пр., 49А, г. Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация

fllozor@yandex.com

Володарский Михаил Олегович, бакалавр

Университет ИТМО

Кронверкский пр., 49А, г. Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация

michael.volodarsky@yandex.ru

Уласевич Светлана Александровна, к.х.н., доцент

Университет ИТМО

Кронверкский пр., 49А, г. Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация

saulasevich@itmo.ru

Скорб Екатерина Владимировна, д.х.н., профессор

Университет ИТМО

Кронверкский пр., 49А, г. Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация

skorb@itmo.ru

DATA ABOUT THE AUTHOR

Mariia S. Ashikhmina, Postgraduate Student

ITMO University

*49A, Kronverksky pr., St. Petersburg, 197101, Russian Federation
msashikhmina@itmo.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8545-1051>*

Vladislav S. Filozop, Undergraduate Student

*ITMO University
49A, Kronverksky pr., St. Petersburg, 197101, Russian Federation
fllozop@yandex.com
ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-5880-2440>*

Mikhail O. Volodarskiy, Undergraduate Student

*ITMO University
49A, Kronverksky pr., St. Petersburg, 197101, Russian Federation
michael.volodarsky@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-5869-7704>*

Sviatlana A. Ulasevich, Cand. Chemistry, Associate Professor

*ITMO University
49A, Kronverksky pr., St. Petersburg, 197101, Russian Federation
saulasevich@itmo.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1753-911X>*

Ekaterina V. Skorb, Dr. of Chemical Sciences, Professor

*ITMO University
49A, Kronverksky pr., St. Petersburg, 197101, Russian Federation
skorb@itmo.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0888-1693>*

Поступила 29.03.2024

После рецензирования 03.06.2024

Принята 01.07.2024

Received 29.03.2024

Revised 03.06.2024

Accepted 01.07.2024