

Лиофилизация споровой культуры *Streptomyces aureofaciens*

UDC 57.086.132;246.4

A.YE. ANANYINA*, A.A. TSUTSAYEVA], L.M. BALLYBERDINA, I.G. GRISHA, A.V. SHCHEGLOV

Freeze-Drying of *Streptomyces aureofaciens* Endospore Culture

Разработаны этапы технологического процесса лиофилизации споровой культуры *Streptomyces aureofaciens* на агаровых пластинках, обеспечивающего высокую сохранность лиофилизированных микробных клеток как после сублимационного высушивания так и после их последующего хранения в условиях гипотермии в течение 4-х лет.

Ключевые слова: стрептомицеты, лиофилизация, агаровые пластинки, жизнеспособность.

Розроблено етапи технологічного процесу ліофілізації спорової культури *Streptomyces aureofaciens* на агарових пластинках, який забезпечує високу збереженість ліофілізованих мікробних клітин як після сублимаційного висушування, так і після їх зберігання в умовах гіпотермії протягом 4-х років.

Ключові слова: стрептомицети, ліофілізація, агарові пластинки, життєздатність.

The stages of technological process of lyophilization of spore cultures, *Streptomyces aureofaciens* on agar plates providing a high integrity of lyophilized microbe cells both after freeze-drying and after their following storage under hypothermia conditions for 4 years have been developed.

Key-words: streptomycetes, lyophilization, agar plates, viability.

В последнее время отмечается повышенный интерес к проблеме консервирования и долгосрочного хранения микроорганизмов, используемых на этапах производства биологически активных веществ, которые находят применение в сельском хозяйстве, ветеринарии и медицине [2, 6, 10, 13].

Одной из важных задач биотехнологии является разработка эффективных методов долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов без изменения их исходных свойств. Эти методы служат основой для обеспечения работы коллекций и банков микроорганизмов [13, 15].

Наиболее перспективным методом консервирования и долгосрочного хранения является лиофилизация. Метод удобен для транспортировки биологических объектов [1, 2, 6]. Эффективность лиофилизации зависит от ряда факторов, в результате чего могут индуцироваться повреждения, приводящие к потере жизнеспособности и продуктивности активности микроорганизмов [8, 11, 12].

Цель исследования – разработка этапов технологического процесса лиофилизации споровой культуры *Streptomyces aureofaciens*, обеспечивающих максимальную сохранность этого микроорганизма.

Материалы и методы

Объектом исследования был производственный штамм *Streptomyces aureofaciens* – продуцент антибиотика хлортетрациклина, полученный из

центральной лаборатории завода антибиотиков (г. Новоград-Волынский).

Споровую культуру выращивали в течение 14 суток при температуре 28°C на скошенной агаризованной регламентной среде следующего состава: экстракт кукурузный – 10,0; крахмал картофельный – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,4; MgSO_4 – 0,025; CaCO_3 – 0,1; агар-агар; вода дистиллированная до 1 л. При подготовке образцов споровой культуры к лиофилизации агаровые пластинки с микробными клетками толщиной 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мм снимали со скошенной агаризованной регламентной питательной среды острым шпателем, затем их помещали на дно пенициллиновых флаконов. Флаконы с агаровыми пластинками ставили в металлические кассеты, которые размещали на полках установки замораживания-высушивания УЗВ-2 (производство СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины, Харьков). Образцы замораживали со скоростью 1; 2 и 3°C/мин до начальной температуры высушивания –10; –15 и –20°C и сублимировали при остаточном давлении в камере установки замораживания-высушивания 1,33 Па. После окончания высушивания флаконы с лиофилизированными микроорганизмами закупоривали резиновыми пробками в атмосфере сухого азота, завальцовывали металлическими колпачками, заливали парафином и хранили в условиях гипотермии (4°C). Остаточную влажность образ-

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereiaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Таблица 1. Жизнеспособность лиофилизированной споровой культуры *S. aureofaciens* после предварительного замораживания образцов с различными скоростями охлаждения

Скорость охлаждения, °С/мин	Жизнеспособность микробной культуры, кл/мл ($\times 10^7$)	
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	%
Контроль	5,83 \pm 0,24	100,0
1	4,17 \pm 0,21	71,5
2	4,58 \pm 0,10	78,6
3	4,33 \pm 0,14	74,3

цов после лиофилизации определяли методом [4]. Регидратацию лиофилизированных образцов проводили путем добавления дистиллированной воды в течение 10–15 мин с последующим высевом на твердую питательную среду. Жизнеспособность микробной культуры оценивали по количеству сформировавшихся макроколоний на агаризованной регламентной питательной среде в течение 14 суток при температуре 28°C [9].

Антибиотическую активность определяли биологическим методом диффузии в агар с использованием тест-культуры *Bac. subtilis*, штамм 720 [3, 7].

Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента-Фишера, достоверность различий получена на уровне значимости 0,95 [11, 12].

Результаты и обсуждение

Разработка методов лиофилизации микроорганизмов включает несколько этапов: замораживание, сублимация и регидратация. Сохранность морфофункциональных свойств микроорганизмов зависит от ряда факторов: подбор защитных сред, показателей начальной температуры высушивания, остаточной влажности лиофилизированных образцов, а также от условий хранения [13, 15]. При разработке нашего метода сублимационного высушивания образцы споровой культуры отличались тем, что представляли собой агаровые пластинки со спорами микробной культуры на поверхности агаризованной среды, поэтому на сохранность микробных клеток и длительность процесса лиофилизации влияет также толщина агаровых пластинок.

В результате проведенных исследований было установлено, что защитной средой может быть регламентная агаризованная питательная среда, используемая для выращивания споровой культуры *S. aureofaciens*.

Образцы замораживали со скоростями: 1; 2 и 3°C/мин. При этом длительность лиофилизации

Таблица 2. Жизнеспособность споровой культуры *S. aureofaciens* после лиофилизации с различной начальной температурой сублимации

Начальная температура сублимации, °С	Жизнеспособность микробной культуры, кл/мл ($\times 10^7$)		Длительность лиофилизации, мин
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	%	
Контроль	4,96 \pm 0,10	100,0	—
– 10	3,27 \pm 0,31	65,9	30
– 15	3,54 \pm 0,14	71,4	45
– 20	3,88 \pm 0,21	78,2	60

составляла 60 мин независимо от скорости замораживания. Данные проведенных исследований представлены в табл. 1.

При замораживании образцов споровой культуры *S. aureofaciens* со скоростями охлаждения 1 и 3°C/мин наблюдалось незначительное снижение количества жизнеспособных клеток. Наиболее высокий процент колониеобразующих единиц отмечался при использовании скорости охлаждения 2°C/мин. Поэтому и была выбрана эта программа охлаждения образцов споровой культуры.

При выборе показателей начальной температуры сушки образцы микробной культуры охлаждали на полке установки замораживания-высушивания до температуры –10; –15 и –20°C (табл. 2).

Установлено, что более низкий показатель начальной температуры сублимации приводит к удлинению сублимационного процесса, что, в свою очередь, уменьшает влияние повреждающих факторов лиофилизации.

Еще одним параметром, влияющим на сохранность микробных клеток и длительность процесса лиофилизации, была толщина агаровых пластинок. Представленные в табл. 3 данные свидетельствуют о том, что при толщине агаровых пластинок 1,0 мм обеспечивалась наиболее высокая жизнеспособность лиофилизированной споровой культуры *S. aureofaciens* и время сублимационного процесса было минимальным, при этом оптимальная остаточная влажность образцов составляла 2,0%.

С учетом всех факторов сублимационного процесса была проведена заключительная серия экспериментов по разработке способа лиофилизации споровой культуры *S. aureofaciens*. В этих экспериментах изучали эффективность лиофилизации в различных защитных средах и на агаровых пластинках (табл. 4).

Данные, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что после лиофилизации споровой культуры *S. aureofaciens* на агаровых пластинках

Таблица 3. Жизнеспособность споровой культуры *S. aureofaciens* после лиофилизации

Толщина агарового слоя, мм	Жизнеспособность микробной культуры, кл/мл ($\times 10^7$)		Остаточная влажность, %	Длительность лиофилизации, мин
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	%		
0,5	4,27 \pm 0,14	73,6	1,5	60
1,0	4,58 \pm 0,10	78,6	2,0	60
1,5	3,62 \pm 0,12	62,4	2,6	90
2,0	2,74 \pm 0,10	47,2	2,8	120
2,5	2,52 \pm 0,17	43,4	3,1	180

количество жизнеспособных клеток составило 78,6%, при этом антибиотическая активность микробной культуры была на уровне 71,4% по сравнению с контролем. В то время сохранность жизнеспособных клеток, лиофилизированных в традиционных защитных средах, была достоверно ниже и не превышала 44,9% с антибиотической активностью, составляющей 47,1% от контроля.

При изучении влияния хранения лиофилизированных образцов споровой культуры *S. aureofaciens* в условиях гипотермии при 4°C было установлено, что жизнеспособность и антибиотическая активность микроорганизмов сохранялись в течение 4-х лет (срок наблюдения) на уровне 40,3–52,7% по сравнению с данными, полученными после сублимационного высушивания.

Выводы

Установлено, что разработанный способ лиофилизации споровой культуры *S. aureofaciens* на

Таблица 4. Свойства споровой культуры *Streptomyces aureofaciens* после лиофилизации в различных защитных средах

Защитные среды	Свойства лиофилизированной культуры		Остаточная влажность, %	Длительность лиофилизации, ч
	Количество жизнеспособных клеток, %	Антибиотическая активность, %		
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$		
Лошадиная сыворотка	4,58 \pm 0,10	78,6	2,0	6
10% сахарозы + 1% желатин	3,62 \pm 0,12	62,4	2,6	6
Обезжиренное молоко	2,74 \pm 0,10	47,2	2,8	6
Споры на агаризованной среде	2,52 \pm 0,17	43,4	3,1	1

агаризованных пластинках позволяет обеспечить сохранность микробных клеток с высокой антибиотической активностью как сразу после лиофилизации, так и в течение длительного хранения лиофилизированных образцов в условиях гипотермии.

Литература

1. *Ананьина А.Е.* Свойства промышленного штамма *Streptomyces fradiae* в зависимости от условий хранения // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 69.
2. *Аркадьева З.А.* Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения // Биологические науки.– 1983.– №4.– С. 93–105.
3. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях.– Л.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1962.– 180 с.
4. *Бланков Б.И., Клебанов Д.Л.* Применение лиофилизации в микробиологии.– М.: Медгиз, 1961.– 263 с.
5. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках.– М.: Высш. школа. 1986.– С. 157–161.
6. *Криобиология и биотехнология* / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1987. – 216 с.
7. *Луста К.А., Фихте Б.А.* Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К.Ерошина.– Пушкино, 1990.– 186 с.
8. *Опарин Ю.Г.* Повреждение и защита биоматериалов при замораживании и лиофилизации // Биотехнология.– 1996.– №7.– С. 3–13.
9. *Практикум по микробиологии* / Под ред. Н.С.Егорова.– М.: Изд-во МГУ, 1976.– 307 с.
10. *Рубан Е.Л.* Хранение культур микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология.– 1989.– Т. XXV, Вып. 3.– С. 291–301.
11. *Цуцаева А.А., Ананьина А.Е.* Жизнеспособность споровой культуры *Streptomyces fradiae* ВНИИГ-25А' после воздействия некоторых факторов процесса лиофилизации // Пробл. криобиологии.– 2004.– №1.– С. 26–30.
12. *Цуцаева А.А., Ананьина А.Е.* Изучение влияния некоторых параметров процесса лиофилизации на жизнеспособность споровой культуры *Streptomyces fradiae* ВНИИГ-25А' // Пробл. криобиологии.– 2002.– №2.– С. 26–29.
13. *Bunse T. Steigleder G.K.* The preservation of fungal cultures by lyophilization // Mycoses.– 1991.– Vol. 34, N3–4.– P. 173–176.
14. *Kolkowski J.A., Smith D.* Cryopreservation and freeze-drying of fungi // Methods Mol. Biol.– 1995.– Vol. 38, N2.– P. 49–61.
15. *Perry S.F.* Freeze-drying and cryopreservation of bacteria // Mol. Biotechnol.– 1998.– Vol. 9, N1.– P. 59–64.

Поступила 04.06.2008