

**КРИОКОНСЕРВАЦИЯ — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ХРАНЕНИЯ
ПРОМЫШЛЕННО ЦЕННЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ
БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ*****О.А. САВКИНА¹, Г.В. ТЕРНОВСКОЙ^{1, 2}, М.Н. ЛОКАЧУК¹,
Е.Н. ПАВЛОВСКАЯ¹, В.И. САФРОНОВА³**

В кормопроизводстве к элементам технологии, обеспечивающей при силосовании подавление нежелательных микроорганизмов (маслянокислых бактерий, энтеробактерий и дрожжей, размножение которых вызывает соответственно контаминацию корма масляной кислотой и его аэробную порчу), относится применение препаратов молочнокислых бактерий (попытки указать на значение молочнокислого брожения при сенажировании подвергались критике). В хлебопекарной промышленности благодаря использованию чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей в качестве стартовых композиций контролируется направление процесса брожения в ржаных и пшеничных хлебных заквасках. Для снабжения различных отраслей промышленности чистыми культурами микроорганизмов необходимо постоянно поддерживать их в условиях музейной коллекции в активном состоянии, отслеживая сохранность биотехнологических свойств. Мы изучили влияние криоконсервации при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ на жизнеспособность и биотехнологические свойства промышленно ценных штаммов на примере молочнокислых бактерий (МКБ) и дрожжей (коллекция СПбФ ГОСНИИ хлебопекарной промышленности). Проведенные исследования показали, что выживаемость 10 представителей рода *Lactobacillus* обусловлена особенностями штаммов, начальным титром клеток и наличием криопротекторов. При одновременном использовании 30 % глицерина и 17 % сахарозы в защитной среде, а также повышении титра исходных суспензий с помощью центрифугирования до 10^7 - 10^8 кл/мл наблюдалось незначительное снижение жизнеспособности и кислотообразующей активности МКБ после 2 лет хранения (соответственно менее чем на 20 и 16 %). Установлено, что результат криоконсервации дрожжей зависит как от наличия криопротектора, так и от возраста культуры. Выживаемость и бродильная активность штамма *Saccharomyces cerevisiae*, замороженного в стационарной фазе роста при использовании 15 % глицерина, к концу срока хранения составляли соответственно 99,8 и 77,9 %. Менее устойчивым оказался штамм *Candida milleri*, у которого жизнеспособность упала более чем на 30 %. Полученные результаты могут быть использованы для разработки методических рекомендаций по криоконсервации МКБ и дрожжей, применяемых в хлебопекарной промышленности, а также для сельскохозяйственных целей.

Ключевые слова: криоконсервация, молочнокислые бактерии, дрожжи.

К элементам технологии, обеспечивающей при силосовании подавление нежелательных микроорганизмов (маслянокислых бактерий, энтеробактерий и дрожжей, размножение которых вызывает соответственно контаминацию корма масляной кислотой и его аэробную порчу), относится применение препаратов молочнокислых бактерий (попытки указать на значение молочнокислого брожения при сенажировании подвергались критике) (1). Молочнокислые бактерии (МКБ) и дрожжи — специфичная микрофлора хлебопекарных полуфабрикатов. Применение чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей в качестве стартовых композиций обеспечивает нужное направление процесса брожения в ржаных и пшеничных хлебных заквасках. МКБ продуцируют молочную, уксусную и другие органические кислоты, которые влияют на реологические свойства теста, а также вкус и запах готовых изделий, особенно с использованием ржаной муки. Дрожжи выполняют роль биологических разрыхлителей в заквасках и тесте, оказывают существенное влияние на пористость мякиша и объем хлебобулочных изделий. Для снабжения предприятий чистыми культурами микроорганизмов необходимо постоянно поддерживать их в

* Работа частично выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 074-U01) и соглашения № 14.604.21.0024 (RFMEFI60414X0024) с Министерством образования и науки Российской Федерации.

условиях музейной коллекции в активном состоянии, отслеживая сохранность биотехнологических свойств (2, 3).

Известны способы хранения культур микроорганизмов методом периодических пересевов, под слоем минерального масла, в сухой стерильной почве и песке, в солевых растворах, в лиофилизированном состоянии и при низких температурах (4). В настоящее время микроорганизмы в коллекции Санкт-Петербургского филиала Государственного НИИ (ГосНИИ) хлебопекарной промышленности поддерживаются методом периодических пересевов. К недостаткам метода следует отнести необходимость соблюдать регламенты пересевов, потребность в большом количестве посуды, питательных сред, значительные затраты времени, ошибки при обозначении штаммов, высокий риск загрязнения культур, потери их жизнеспособности и целевых свойств (2, 5).

Перспективным методом долгосрочного хранения микроорганизмов считается криоконсервация. Ее преимущества заключаются в снижении риска генетических изменений, что приводит к сохранению в стабильном состоянии свойств культур, небольшие временные и материальные затраты, а также возможность использовать замороженные образцы в качестве прямого инокулята. Кроме того, как известно из специальной литературы, микроорганизмы, хранящиеся при низких температурах, повреждаются в меньшей степени и имеют более высокую жизнеспособность, чем высушенные и лиофилизированные (5-7). Именно поэтому метод криоконсервации рекомендован для широкого использования в национальных коллекциях микроорганизмов (8).

Наша цель заключалась в изучении влияния криоконсервации при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ на жизнеспособность и биотехнологические свойства молочнокислых бактерий и дрожжей для разработки методических рекомендаций по их криоконсервации и использованию при производстве разных видов заквасок.

Методика. Объектами исследования были 10 промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* (*L. brevis* E-36, *L. buchneri* 26, 30, *L. fermentum* 34, *L. paracasei* 5 и 63, *L. plantarum* 1, 78, И-30 и 13), а также два штамма дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae* Л-1 и *Candida milleri* Чернореченский) из коллекции «Молочнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности» (Санкт-Петербургский филиал ГосНИИ хлебопекарной промышленности).

Криоконсервацию культур МКБ проводили в соответствии с двумя протоколами. В первом варианте культуры были выращены на солодовом сусле (12 % сухого вещества) с осадком без мела в течение 48 ч при оптимальной для каждого штамма температуре (30 и $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) до конечного титра примерно 10^7 - 10^8 кл/мл и заморожены без использования криопротекторов. Согласно второму протоколу, жидкие культуры центрифугировали (6000 об/мин в течение 10 мин) и ресуспендировали в защитной среде (водный раствор, содержащий 30 % глицерина и 17 % сахарозы), конечный титр — 10^7 - 10^8 кл/мл. Культуры дрожжей в стационарной и логарифмической фазе роста подвергались замораживанию с использованием защитной среды (водный раствор, содержащий 1 % пептона, 0,5 % дрожжевого экстракта, 2 % глюкозы и 15 % глицерина) и без нее. Замораживание приготовленных суспензий, расфасованных по 200 мкл в криопробирки, проводили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (скорость охлаждения — примерно $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). После криоконсервации культуры помещали в Станцию низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ («Liconic Instruments», Лихтенштейн), которая функционирует во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии (9).

Размораживание культур осуществляли при 37 °С в течение 3 мин. Для определения жизнеспособности и биотехнологических свойств молочнокислых бактерий 0,1 мл размороженной суспензии переносили из криопробирки в колбу со 100 мл среды (солодовое сусло, содержащее 12 % сухого вещества, с осадком без мела), затем отбирали 1 мл полученной суспензии и помещали колбы в термостат на 48 ч при оптимальной для каждого штамма температуре (30 и 37 °С). Жизнеспособность МКБ оценивали после разных сроков хранения (1, 3, 6, 15, 18 и 24 мес) методом глубинного посева на 3 чашки Петри (с последующим расчетом среднего значения) из разведений 10^{-4} - 10^{-7} в сусло-агар с мелом, содержащий 12 % сухого вещества, или на агаризованную среду Мозера-Рогоза-Шарпа (MRS). Чашки с посевами инкубировали при оптимальной для каждого штамма температуре (30 и 37 °С) в течение 4 сут и подсчитывали выросшие колонии. Процент выживаемости микроорганизмов находили по отношению логарифма среднего значения числа колониеобразующих единиц (КОЕ) после размораживания к значениям, полученным в исходной культуре (до криоконсервации).

Кислотообразующую активность МКБ учитывали методом титрования, отбирая из колбы для подготовки 3 параллельные пробы (с расчетом среднего значения) по 10 мл культуры через 24 и 48 ч роста. Для определения жизнеспособности и биотехнологических свойств дрожжей 0,1 мл размороженной суспензии дрожжевых клеток переносили в колбу со 100 мл среды (солодовое сусло, содержащее 8 % сухого вещества), затем отбирали 1 мл полученной суспензии и помещали колбы в термостат на 48 ч при температуре 30 ± 1 °С. Жизнеспособность дрожжей после различных сроков хранения оценивали методом поверхностного посева из разведений 10^{-4} - 10^{-6} в 3 чашки Петри (с расчетом среднего значения) на сусло-агар, содержащий 8 % сухого вещества, подсчитывая колонии после инкубации при 30 ± 1 °С в течение 48 ч. Процент выживаемости находили по отношению логарифма КОЕ после размораживания к значениям, полученным в исходной культуре (до криоконсервации). Бродильную активность дрожжей учитывали по количеству выделенного диоксида углерода при внесении 0,1 мл суспензии размороженной культуры в 100 мл солодового сусла, содержащего 8 % сухого вещества (колбы с сернокислотными затворами Мейселя), и инкубации в течение 48 ч при 30 °С. О величине показателя судили по разнице между начальной и конечной массой колбы, которая соответствует расходу сухих веществ на брожение.

Для изучения технологических свойств МКБ и дрожжей после криоконсервации выполняли выведение ржаных заквасок в соответствии с приведенными инструкциями (10). Для приготовления заквасок использовали культуры, которые после размораживания выращивали в течение 48 ч.

Данные обрабатывали по *t*-критерию Стьюдента (ошибки не приведены, поскольку выводы основаны на очевидно достоверных различиях).

Результаты. Установлено (рис. 1), что жизнеспособность культур МКБ, заложенных на хранение без криопротекторов, через 24 мес снизилась до 72,1-85,3 %. Криоконсервирование МКБ с использованием комплекса криопротекторов глицерина и сахарозы обеспечивало поддержание значительно более высокой жизнеспособности в течение всего срока хранения. Положительное влияние глицерина и сахарозы на криоустойчивость различных групп микроорганизмов, в том числе МКБ и дрожжей, было показано и ранее (4, 7, 11, 12). Применение защитной среды и повышение титра культур перед криоконсервацией при помощи центрифугирования позволило увеличить жизнеспособность промышленно ценных

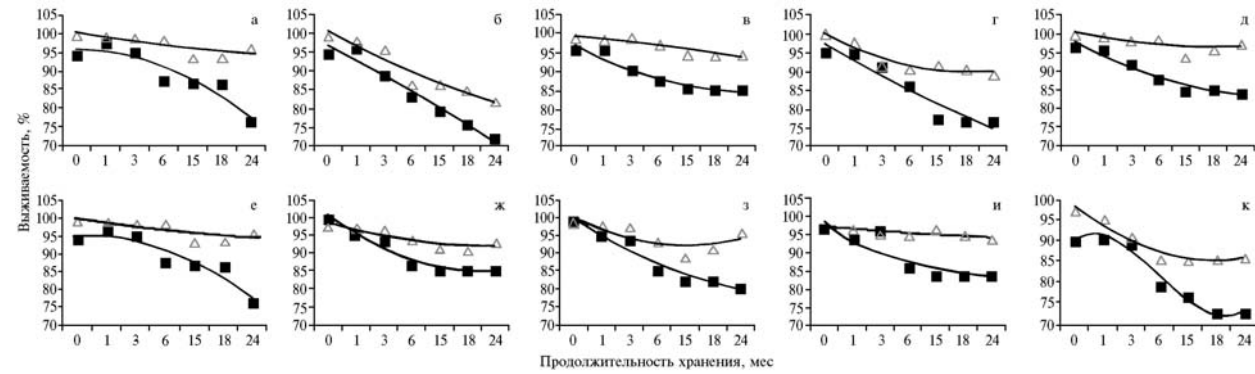


Рис. 1. Влияние продолжительности криохранения на выживаемость штаммов молочнокислых бактерий в зависимости от начального титра клеток и наличия криопротекторов: а — *Lactobacillus plantarum* 1, б — *L. buchneri* 26, в — *L. buchneri* 30, г — *L. fermentum* 34, д — *L. paracasei* 63, е — *L. paracasei* 5, ж — *L. plantarum* 78, з — *L. brevis* E-36, и — *L. plantarum* И-30, к — *L. plantarum* 13; значения в вариантах с применением криопротекторов и центрифугированием суспензии перед криоконсервацией обозначены треугольниками, без использования криопротекторов и центрифугирования — квадратами.

штаммов МКБ до 81,9-97,4 %. В ряде случаев наблюдали повышение титра МКБ в процессе хранения, что может быть связано с разделением агглютинированных клеток.

Изученные культуры существенно различались по криорезистентности, однако корреляции между этим параметром и видовой принадлежностью штаммов установлено не было. Так, выживаемость трех штаммов *L. plantarum* (78, И-30 и 13) к концу срока хранения в защитной среде колебалась в пределах 85-95 % (см. рис. 1; ж, и, к). Наиболее криочувствительным оказался штамм *L. buchneri* 26, максимальная выживаемость которого после 24 мес хранения составила 81,9 % (см. рис. 1, б).

В отношении изменения кислотообразующей активности МКБ в процессе криоконсервации было установлено (табл. 1.), что при хранении без криопротекторов в течение 24 мес этот показатель уменьшался не более чем на 6-31 %. Исключение составил штамм *L. paracasei* 63, активность которого снизилась на 54 %. При применении криопротекторов кислотообразование к концу срока хранения подавлялось не более чем на 6-16 %, у большинства штаммов МКБ наблюдался активный рост, что подтверждалось интенсивным равномерным помутнением среды, выделением пузырьков газа и высокими показателями кислотообразования.

1. Кислотообразующая активность молочнокислых бактерий (*Lactobacillus*) после криохранения в зависимости от его продолжительности и наличия криопротекторов

Вид и штамм	исходная, °	Титруемая кислотность через 48 ч культивирования						
		от исходной (по срокам криохранения), %						
		0 мес	1 мес	3 мес	6 мес	15 мес	18 мес	24 мес
Без криопротекторов								
<i>L. plantarum</i> 1	11,1	100	100	82,9	91,9	75,7	100	100
<i>L. buchneri</i> 26	17,0	69,5	97,1	44,7	74,1	90,6	100	94,10
<i>L. buchneri</i> 30	10,7	100	95,3	95,3	100	97,2	100	100
<i>L. fermentum</i> 34	12,7	93,7	94,5	66,1	96,1	80,3	100	83,50
<i>L. paracasei</i> 63	10,4	100	100	65,4	67,3	82,7	100	46,20
<i>L. paracasei</i> 5	10,1	100	99,0	89,1	79,2	71,3	83,2	100
<i>L. plantarum</i> 78	11,4	94,7	91,2	77,2	71,9	66,7	100	85,96
<i>L. brevis</i> E-36	10,7	100	93,5	91,6	99,1	87,9	93,5	85,98
<i>L. plantarum</i> И-30	11,5	88,7	93,9	83,5	87,0	80,0	99,1	78,30
<i>L. plantarum</i> 13	12,2	91,8	100	86,9	67,2	72,1	75,2	68,90
С криопротекторами								
<i>L. plantarum</i> 1	11,4	93,0	98,2	100	94,7	89,5	87,7	87,70
<i>L. buchneri</i> 26	17,6	100	98,3	96,6	89,8	90,9	79,5	83,90
<i>L. buchneri</i> 30	12,8	93,8	96,9	100	65,6	92,2	84,4	81,30
<i>L. fermentum</i> 34	11,8	100	100	100	93,2	96,6	89,8	88,10
<i>L. paracasei</i> 63	10,4	88,5	94,2	100	88,5	94,2	90,4	86,50
<i>L. paracasei</i> 5	10,4	94,2	98,1	100	86,5	88,5	86,5	86,50
<i>L. plantarum</i> 78	11,4	98,2	100	100	98,2	87,7	87,7	87,70
<i>L. brevis</i> E-36	9,4	95,7	97,9	100	89,4	97,9	91,5	87,20
<i>L. plantarum</i> И-30	10,6	100	100	100	86,8	88,7	86,8	94,30
<i>L. plantarum</i> 13	10,4	100	100	100	98,1	88,5	90,4	86,50

Таким образом, показано, что выживаемость 10 промышленно ценных представителей рода *Lactobacillus* в процессе криоконсервации была обусловлена биологическими особенностями штаммов, начальным титром клеток в образце и наличием криопротекторов. Использование глицерина и сахарозы в защитной среде, а также повышение титра исходных суспензий с помощью центрифугирования обеспечивали незначительное (менее 20 %) падение жизнеспособности культур после 2 лет хранения при -80 °С. Полученные результаты позволяют сделать вывод о преимуществах криоконсервации МКБ по сравнению с широко используемым методом лиофильного высушивания. По данным репрезентативного анализа жизнеспособности у 84 штаммов разных видов *Lactobacillus* после лиофилизации, средняя выживаемость в культурах составляла 58 % (13). В то же

время у лиофильно высушенных штаммов *L. plantarum* и *L. paracasei* после 120 сут хранения отмечено падение кислотообразующей активности на 30-50 % (11). Более выраженное снижение жизнеспособности и кислотообразующей активности МБК в результате лиофилизации связано с дополнительным стрессовым воздействием, которое оказывает высушивание (14).

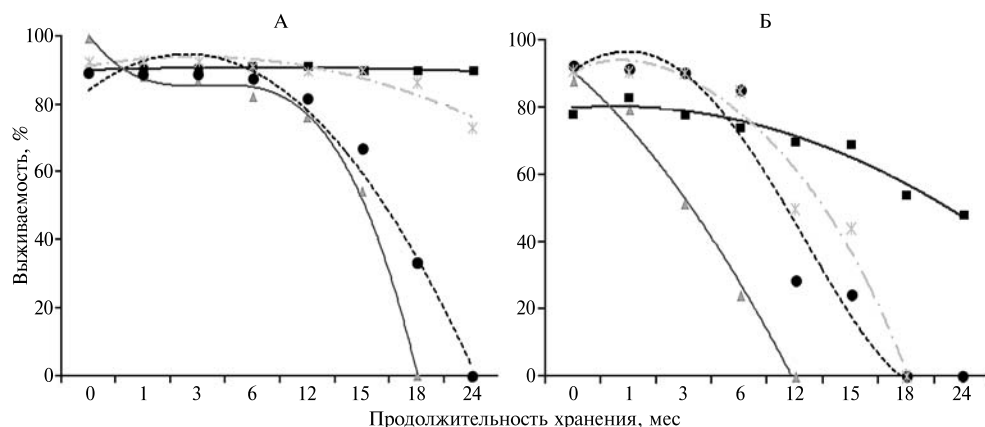


Рис. 2. Жизнеспособность дрожжей при криохраниении в зависимости от его продолжительности, наличия криопротектора и фазы роста криоконсервируемой культуры: А — *Saccharomyces cerevisiae* Л-1, Б — *Candida milleri* Чернореченский; значения в вариантах с применением криопротекторов для культур в стационарной и логарифмической фазе отмечены соответственно квадратами и кружками, без применения криопротекторов для культур в стационарной и логарифмической фазе — соответственно звездочками и треугольниками.

2. Бройдильная активность дрожжей после криохраниения в зависимости от его продолжительности, наличия криопротекторов и фазы роста криоконсервируемой культуры

Вариант протокола	Количество CO ₂ , выделившегося за 48 ч культивирования								
	в исходной культуре, г	от исходной (по срокам криохраниения), %							
		0 мес	1 мес	3 мес	6 мес	12 мес	15 мес	18 мес	24 мес
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Л-1									
С защитной средой, фаза роста культуры:									
стационарная	1,30	92,4	93,9	84,7	100,0	100,0	93,1	96,9	77,9
логарифмическая	1,10	100,0	90,0	89,1	100,0	89,1	90,0	65,5	36,4
Без защитной среды, фаза роста культуры:									
стационарная	1,16	100,0	84,5	81,0	81,9	80,2	85,3	86,2	84,8
логарифмическая	1,10	100,0	90,0	87,3	93,6	80,0	85,5	47,3	29,1
<i>Candida milleri</i> Чернореченский									
С защитной средой, фаза роста культуры:									
стационарная	0,32	100,0	59,4	65,6	100,0	93,8	100,0	78,1	34,4
логарифмическая	0,23	100,0	100,0	100,0	100,0	78,3	104,3	52,2	0,0
Без защитной среды, фаза роста культуры:									
стационарная	0,20	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	0,0
логарифмическая	0,28	92,9	75,0	67,9	53,6	39,3	0,0	0,0	0,0

Анализ показал (рис. 2), что выживаемость дрожжевых клеток в процессе криоконсервации зависит от использования криопротектора и фазы роста культуры перед замораживанием. У дрожжей *S. cerevisiae* Л-1, криоконсервированных в стационарной фазе роста, использование глицерина в составе защитной среды позволило увеличить жизнеспособность к концу срока хранения до 99,8 %. При замораживании культуры, находящейся в логарифмической фазе (как с использованием глицерина, так и без него), роста биомассы дрожжей через 24 мес хранения не наблюдали. Менее криоустойчивым оказался штамм *C. milleri* Чернореченский, который после 2 лет подержания в замороженном состоянии сохранял жизнеспособность только при использовании культуры, находящейся в стационарной фазе роста, и защитной среды, при этом выживаемость упала более чем на 30 %.

Бродильная активность дрожжей, как и их жизнеспособность, зависела от наличия криопротектора и возраста культуры, подвергнутой замораживанию (табл. 2). У образцов *S. cerevisiae* Л-1, которые перед криоконсервацией достигли стационарной фазы роста, отмечали менее значительное снижение этого показателя, чем у находящихся в логарифмической фазе (как при наличии защитной среды, так и без нее). Бродильная активность у *S. milleri* Чернореченский уменьшалась во всех вариантах уже через 18 мес хранения. Через 2 года отмечалось сохранение бродильной активности только у культуры, замороженной в стационарной фазе роста с использованием защитной среды. Следовательно, для повышения эффективности низкотемпературного хранения этого штамма дрожжей необходима оптимизация протокола криоконсервации. В частности, большое значение имеет подбор температуры замораживания клеточных суспензий (15).

Анализ биотехнологических показателей качества ржаных заквасок (густых, жидких с закваской и без нее) показал, что при криоконсервации чистых культур микроорганизмов с криопротекторами в течение 24 мес не отмечалось существенного изменения кислотообразующей активности, подъемной силы и объема по сравнению с заквасками на культурах, поддерживаемых в коллекции методом периодических пересевов.

Итак, у 12 штаммов (молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus* и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* Л-1 и *Candida milleri* Чернореченский) изучены промышленно значимые свойства после криоконсервирования при -80°C . Показано, что все культуры (за исключением штамма дрожжей *S. milleri*) сохраняют высокую жизнеспособности и биотехнологическую активность в течение 24 мес и могут быть использованы при приготовлении разных видов заквасок для хлебопекарной промышленности в соответствии с установленным разводочным циклом. Разработана методика криоконсервации и реактивации исследованных коммерческих образцов молочнокислых бактерий и дрожжей, однако отмечается, что для некоторых штаммов может потребоваться подбор специальных условий замораживания. Выполненное определение жизнеспособности и ферментативной активности штаммов позволяет в целом положительно оценить перспективность криохранения микробиологических препаратов и в других областях, например в кормопроизводстве. В то же время тот выявленный факт, что результаты поддержания свойств культуры при криоконсервации зависят от биологических особенностей штамма, указывает на необходимость предварительной проверки и оптимизации протоколов закладки образцов на хранение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Победнов Ю.А., Косолапов В.М. Биологические основы силосования и сенажирования трав. Сельскохозяйственная биология, 2014, 2: 31-41.
2. Афанасьева О.В. Микробиология хлебопекарного производства. СПб, 2003.
3. Молочнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности (Каталог культур микроорганизмов из Коллекции СПбФ ГНУ ГОСНИИХП Россельхозакадемии) /Под ред. О.В. Афанасьевой, Е.Н. Павловской, Л.И. Кузнецовой. М., 2008.
4. Uzunova-Donova T., Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms. J. of Culture Collections, 2005, 4: 17-28.
5. Сафронова В.И., Оследкин Ю.С., Свиридова О.В., Воробьев Н.И. Методы консервации коллекционных культур микроорганизмов. СПб, 2007.
6. Farrant J. General observations on cell preservation. In: Low temperature preservation in medicine and biology /M.J. Ashwood-Smith, J. Farrant (eds.). Pitman Medical Limited, England, 1980: 1-18.
7. Safronova V.I., Novikova N.I. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: lyophilization and liquid nitrogen freezing. J. Microb. Methods, 1996, 24: 231-237 (doi: 10.1016/0167-7012(95)00042-9).
8. OECD best practice guidelines for biological resource centres. OESD, Paris, France, 2007.
9. Safronova V., Tikhonovich I. Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long-term authorized depositing of commercial microbial strains. In: Microbes in ap-

- plied research: current advances and challenges /A. Mendez-Vilas (eds.). World Scientific Publishing Co., Singapore, 2012: 331-334.
10. Сборник современных технологий хлебобулочных изделий /Под ред. А.П. Косована. М., 2008.
 11. Coulibaly I., Dubois-Dauphin R., Destain J., Fauconnier M.-L., Lognaye G., Thonart P. The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *International Journal of Microbiology*, 2010, Article ID625239 (doi: 10.1155/2010/625239).
 12. Gujjari P., Muldrow T., Zhou J.J. Effect of cryopreservation protocols on the phenotypic stability of yeast. *Cryo Letters*, 2010, 31(3): 261-267.
 13. Miyamoto-Shinohara Y., Sukenobe J., Imaizumi T., Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2008, 54: 9-24.
 14. Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J. Appl. Microbiol.*, 2008, 105(1): 1-13 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x).
 15. Bond C. Cryopreservation of yeast cultures. *Methods Mol. Biol.*, 2007, 368: 109-117.

¹Санкт-Петербургский филиал ГНУ ГосНИИ
хлебопекарной промышленности Россельхозакадемии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 7 литер А,
e-mail: 1103savkina@mail.ru, nihleba@yandex.ru;

²Университет ИТМО,
197101 Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский просп., 49,
e-mail: grishter@ya.ru;

³ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
микробиологии Россельхозакадемии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: v.safronova@rambler.ru

Поступила в редакцию
20 июля 2014 года

CRYOPRESERVATION TO BE A PROGRESSIVE METHOD FOR KEEPING UP VALUABLE STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA AND YEASTS

O.A. Savkina¹, G.V. Ternovskoi^{1, 2}, M.N. Lokachuk¹, E.N. Pavlovskaya¹, V.I. Safronova³

¹Saint-Petersburg Branch of the State Research Institute of the Bakery Industry, Russian Academy of Agricultural Sciences, 7 liter A, sh. Podbelskogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail 1103savkina@mail.ru, nihleba@yandex.ru;

²ITMO University, 49, Kronverkskii prosp., St. Petersburg, 197101 Russia, e-mail grishter@ya.ru;

³All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, 3, sh. Podbelskogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail v.safronova@rambler.ru

Supported partially by State Financial Grant for leading universities of the Russian Federation and the Ministry of Education and Sciences of the Russian Federation

Received 20 July, 2014

doi: 10.15389/agrobiol.2014.4.112eng

Abstract

In fodder production, lactic acid bacteria are used in silage making to improve fodder storage and quality due to suppressing undesirable butyric acid bacteria, enterobacteria and the yeasts, which cause fodder contamination with butyric acid and aerobic spoilage (a role of lactic acid bacteria in haymaking is criticized). In bakery, the lactic acid bacteria and yeast compositions are used as starter cultures to control the proper fermentation in rye and wheat sourdough. To provide industry with pure cultures of microorganisms, it is necessary to keep up their active samples in collections and to control the biotechnological properties. The paper presents experimental data on the viability and biotechnological properties of industrial strains of lactic acid bacteria and yeasts from the collection of the Saint-Petersburg Branch of the State Research Institute of the Bakery Industry during cryopreservation at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ according to different protocols. Studies have shown that the viability of ten *Lactobacillus* strains depended on the initial concentration of cells and the presence of cryoprotectants. Simultaneous use of 30 % glycerol and 17 % sucrose in a protective medium, as well as an increasing titer by centrifugation to 10^7 - 10^8 cells/ml led to a slight drop in the viability and acidifying activity of lactic acid bacteria after two years of storage (less than 20 and 16 %, respectively). It was shown that the result of cryopreservation of yeast depends on the presence of cryoprotectant and age of the culture. To the end of storage, survival and fermentative activity of the strain *Saccharomyces cerevisiae*, frozen in a stationary growth phase using 15 % glycerol, were 99.8 and 77.9 %, respectively. The strain *Candida milleri* was less stable and its viability dropped more than 30 %. The results obtained can be used to develop the guidelines for a cryopreservation of lactic acid bacteria and yeasts that are used in the sourdough bread production, and also in agriculture, particularly in fodder production.

Keywords: cryopreservation, lactic acid bacteria, yeast.