

Вопросы криоконсервирования пробиотика *Saccharomyces boulardii*

О.М. БАБИНЕЦ, Т.М. ГУРИНА, А.Л. КИРИЛЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков

Tasks of *Saccharomyces boulardii* Probiotics Cryopreservation

O.M. BABINETS, T.M. GURINA, A.L. KYRYLYUK

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

Дисбактериоз кишечника является распространенным клинико-лабораторным синдромом. Для профилактики и лечения дисбактериозов используют пробиотики, пребиотики и синбиотики. Хорошую эффективность показали препараты на основе дрожжей *S. boulardii*, биологические свойства которых обусловлены прямым антимикробным действием в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, способностью нейтрализовать токсины специфическими протеазами и иммуномодулирующим действием. Законодательством большинства государств, на территории которых используются биотехнологические производства, предусмотрено обязательное депонирование штаммов-продуцентов. Наиболее эффективным способом длительного хранения микроорганизмов в коллекциях является криоконсервирование. Исследования по разработке технологии криоконсервирования дрожжей *S. boulardii* не проводились.

Цель работы – изучение влияния состава консервирующей среды и режимов замораживания на жизнеспособность клеток *S. boulardii* после замораживания до -196°C и исследование сохранности биологических свойств пробиотика после криоконсервирования.

Объектом исследования была 2-суточная культура дрожжей *S. boulardii*, выращенная на скошенном сусло-агаре (8°B) при 30°C . Дрожжевые клетки смывали и ресуспендировали в сусло-бульоне (8°B), дистиллированной воде, 5%-м водном растворе ДМСО, 5 и 10%-х водных растворах сахарозы до концентрации 10^7 КОЕ/мл. Клеточные суспензии вносили в объеме 1 мл в криопробирки и замораживали при постоянной контролируемой скорости до -40°C с последующим погружением в жидкий азот. Скорость охлаждения образцов была 1, 5, 10, 15 и $40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. При неконтролируемой скорости охлаждения образцы погружали в жидкий азот, отогревали на водяной бане при 37°C . Жизнеспособность клеток определяли по колониеобразованию “чашечным” методом Коха, биологические свойства – стандартными методами.

Установлено, что все использованные среды достаточно эффективны при криоконсервировании *S. boulardii*. Максимальные показатели жизнеспособности для всех сред были достигнуты при охлаждении со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. При использовании неконтролируемых скоростей охлаждения (погружение в жидкий азот) были получены наихудшие результаты. При всех режимах замораживания увеличение концентрации сахарозы в водном растворе с 5 до 10% приводило к достоверному снижению жизнеспособности.

При изучении сохранности биологических свойств *S. boulardii* показано, что криоконсервирование не изменяет спектр сахаролитической активности и чувствительности к фунгицидным препаратам, а также спектр и интенсивность антагонистической активности и способности адгезии к энтероцитам крыс и эритроцитам человека.

Intestinal dysbacteriosis is the prevailing clinical and laboratory syndrome. To prevent and treat dysbacteriosis there have been widely used probiotics, prebiotics and synbiotics. High efficiency has been shown by preparations based on *S. boulardii* yeasts. Their biological properties are stipulated with direct anti-microbe effect in respect of a wide spectrum of pathogenic and opportunistic microorganisms, ability to neutralize toxins with specific proteases and immune modulating effect. The legislation in the majority of the states, where the biotechnological productions are used, foresees a mandatory depositing of producer strains. The most effective way of long-term storage of microorganisms in the collections is cryopreservation. No studies on the designing the technology of cryopreservation of *S. boulardii* yeasts have been performed yet.

The research aim was to study the effect of composition of preserving medium and freezing protocols on viability of *S. boulardii* cells after freezing down to -196°C and investigation of the integrity of biological properties of probiotics after cryopreservation.

The research object were 48 hrs culture *S. boulardii* yeasts grown with slope wort agar (8°B) at 30°C . Yeast cells were washed-out and re-suspended in wort broth (8°B), distilled water, 5% aqueous solution of DMSO, 5 and 10% aqueous solutions of sucrose up to the concentration of 10^7 CFU/ml. Cell suspensions were introduced in the volume of 1 ml into cryovials and frozen with constant controlled rate down to -40°C with following plunging into liquid nitrogen. Cooling rate of the samples was 1, 5, 10, 15, $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Under non-controlled cooling rate the samples were plunged into liquid nitrogen. The samples were thawed on water bath at 37°C . Cell viability was examined on colony formation by means of Koch's plate method, and biological properties were assessed with the standard tests.

It has been established that all the used media were quite effective during cryopreservation of *S. boulardii*. Maximum indices of viability for all the media were obtained when cooling with the rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. When using non-controlled cooling rates (plunging into liquid nitrogen) there were obtained the worst results. Under all the freezing regimens the rise in concentration of sucrose in aqueous solution from 5 to 10% resulted into statistically significant reduction of viability.

When investigating the integrity of biological properties of *S. boulardii* it has been demonstrated that cryopreservation did not cause the change in spectra of saccharolytic activity and sensitivity to fungicide preparations, as well as in the spectrum and intensity of antagonistic activity and adhesion ability to rat enterocytes and human erythrocytes.