

УДК 57.086.13.57.083

І.В. Петров¹, І.П. Висеканцев¹, Я.О. Черкашина^{1*}, О.Г. Перетятко², Ю.А. Ягнюк²

Виробничі характеристики пробіотика *Esherichia coli* M-17 після іммобілізації у гелевих носіях і зберігання за різних низьких температур

UDC 57.086.13.57.083

I.V. Petrov¹, I.P. Vysekantsev¹, Ya.O. Cherkashina^{1*}, O.G. Peretyatko², Yu.A. Yagnyuk²

Manufacturing Characteristics of Probiotic *Esherichia Coli* Strain M-17 After Immobilization in Gel Carriers and Storage at Various Low Temperatures

Ключові слова: пробіотики, іммобілізація в гелі, низькотемпературне зберігання.

Key words: probiotics, gel immobilization, low temperature storage.

Іммобілізовані пробіотики все більше застосовують у виробництві пробіотичних препаратів, лікувально-профілактичних продуктів харчування, кормових домішок [6]. Технології довгострокового зберігання комерційних препаратів і продуктів на основі іммобілізованих пробіотиків знаходяться в стадії розробки. Найбільш ефективними і широко вживаними методами консервування вільних клітин різних мікроорганізмів є ліофілізація і зберігання за низьких температур [5].

Мета роботи – вивчення збереженості виробничих характеристик пробіотичного штаму *Esherichia coli* M-17 (*E. coli* M-17) після іммобілізації в гелевих носіях і зберігання за різних низьких температур.

Об'єктом дослідження був промисловий штам *E. coli* M-17, який отримали з «Держ.НДІгенетика» (Росія). Бактерії вирощували на скошеному агаризованому середовищі «Nutrient Agar» («Biolife», Італія) протягом доби при 37°C, після чого змивали з поверхні середовища фізіологічним розчином, іммобілізували бактеріальні клітини в гелевих гранулах методом іотропного гелеутворення [7]. Стабілізували гранули в 0,2 М розчині CaCl₂ протягом 20 хв. Для приготування альгінатного гелю використовували натрію альгінат Е 401 (Китай). Були випробувані 5 варіантів гелю: 1 – 1%-й аль-

Immobilized probiotics are increasingly used for the production of probiotics, therapeutic and prophylactic foods, feed additives [5]. Techniques for long-term storage of commercial drugs and products based on immobilized probiotics are under development. The most effective and widely exploited methods of preserving free cells of various microorganisms are lyophilization and storage at low temperatures [6].

The research aim was to study the maintenance of manufacturing characteristics of probiotic *Esherichia coli* strain M-17 (*E. coli* M-17) after immobilization in gel carriers and its storage at different low temperatures.

The research object was an industrial *E. coli* strain M-17, which was obtained from the Federal Institution 'State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center' Kurchatov Institute (Russia). Bacteria were grown with 'Nutrient Agar' slant (Biolife, Italy) for 24 hours at 37°C, then washed from the surface with saline, immobilized bacterial cells in gel granules by ionotropic gelation [7]. The granules were stabilized in 0.2 M CaCl₂ solution for 20 minutes. Sodium alginate E 401 (China) was used to prepare the alginate gel. There were tested 5 gel variants: 1 – 1% alginate gel without impurities; 2 – 1% alginate gel + 10% lactose; 3 – 1% alginate gel + 10% sucrose; 4 – 1% alginate

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

² ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», м. Харків, Україна

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: nardidyana@gmail.com

Надійшла 23.11.2020

Прийнята до друку 31.08.2021

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²SI 'I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine', Kharkiv, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: nardidyana@gmail.com

Received November, 23, 2020

Accepted August, 31, 2021

гінатний гель без домішок; 2 – 1% альгінатний гель + 10% лактози; 3 – 1% альгінатний гель + 10% сахарози; 4 – 1% альгінатний гель + захисне сахарозно-молочно-лактозне середовище (кінцеві концентрації у гелі лактози – 1%, сахарози – 5% , молока знежиреного – 5% v/v); 5 – 1%-й альгінатний гель + 5% v/v молока знежиреного.

Діаметр гелевих гранул становив $(1,8 \pm 0,2)$ мм. Вихідна концентрація бактеріальних клітин у зразках гелю становила 8,0–8,7 lg кл / мл гелю. Із 1,8 мл гелю отримували ~100 гранул.

Гелеві гранули з іммобілізованими клітинами вносили в кріопробірки («Thermo Scientific», США) об'ємом 1,8 мл. Заморожували зразки на полицях холодильних камер із температурами зберігання $(-20 \pm 3,0)$; (-40 ± 2) ; $(-75 \pm 1,5)^{\circ}\text{C}$. Для зберігання при -196°C зразки охолоджували зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -40°C і занурювали у рідкий азот. Зразки зберігали за вказаних температур протягом 2-х років (термін спостереження). Після зберігання зразки відігрівали на водяній бані за 30°C і розчиняли гранули у 4%-му розчині ЕДТА («BASF», Німеччина). Частину клітин висівали для визначення життєздатності, решту трикратно відмивали від ЕДТА у фізіологічному розчині. Досліджували наступні виробничі характеристики *E. coli* M-17: життєздатність [2, 4], фізіологічні та біохімічні властивості, безпеку [1, 4], специфічну активність [3]. Для визначення специфічної активності *E. coli* M-17 використовували штами умовно-патогенних і патогенних бактерій, отримані з колекції мікроорганізмів Державної установи «Інститут мікробіології і імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України» (Україна), та штаму грибів *Candida albicans* ATCC 10231, отриманий із колекції ДУ «Інститут дерматології і венерології НАМН України» (Україна). Тести на безпеку *E. coli* M-17 вивчали з використанням 7–8-місячних лабораторних мишей масою 12–14 г. Мікробіологічний статус тварин – поліпшено конвенціональний. Система утримання тварин – відкрита з кормовим раціоном типу кормової суміші. Піддослідні групи формували з тварин одного виводку методом випадкової вибірки. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006 р.) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми «Ексел» («Microsoft», США).

Встановлено, що після зберігання протягом 24 місяців при -20°C у варіантах гелю 1–5 були життєздатними 11,2; 26,7; 28,9; 36,9; 20,5% бактеріальних клітин відповідно. Після зберігання при

gel + protective sucrose-milk-lactose medium (final concentrations in lactose gel was 1%, 5% in sucrose, 5% v/v in skimmed milk); 5 – 1% alginate gel + 5% v/v skimmed milk.

The diameter of the gel granules was (1.8 ± 0.2) mm. The initial concentration of bacterial cells in the gel samples was 8.0–8.7 lg cells/ml of gel. Hundred granules were obtained from 1.8 ml of gel.

Gel granules with immobilized cells were added to 1.8 ml cryotubes (Thermo Scientific, USA). Samples were frozen on the shelves of refrigerated chambers with storage temperatures of $(-20 \pm 3.0)^{\circ}\text{C}$; $(-40 \pm 2)^{\circ}\text{C}$; $(-75 \pm 1.5)^{\circ}\text{C}$. For storage at -196°C , the samples were cooled at a rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -40°C and immersed into liquid nitrogen. The samples were stored at these temperatures for 2 years (observation period). After storage, the samples were warmed in a water bath at 30°C and the granules were dissolved in a 4% solution of EDTA (BASF, Germany). Some cells were plated to determine viability, the rest were washed three times with EDTA in saline. The following manufacturing characteristics of *E. coli* M-17 were investigated: viability [1, 3], physiological and biochemical properties, safety [3, 4], specific activity [2]. To determine the specific activity of *E. coli* M-17 there were used the strains of opportunistic and pathogenic bacteria obtained from the collection of microorganisms of the State Institution 'I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine' (Ukraine), and a strain of *Candida albicans* ATCC 10231, obtained from the collection of the State Institution 'Institute of Dermatology and Venereology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine (Ukraine)'. Safety tests of *E. coli* M-17 were studied using 7–8 month old laboratory mice weighing 12–14g. The microbiological status of the animals was improved conventional ones. The system of keeping animals was open with a feed ration such as a feed mixture. Experimental groups were formed from the animals of one brood by random sampling.

All manipulations with animals were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On Protection of Animals Against Cruelty' (№3447-IV of 21.02.2006) and the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986). The obtained data were statistically processed with the 'Excel' software ('Microsoft', USA).

It was found that after storage for 24 months at -20°C in gel variants 1–5 were viable 11.2; 26.7; 28.9; 36.9; 20.5% of bacterial cells, respectively. After storage at -40°C , 28.6 remained viable; 35.4; 38.6; 45.2; 37.0% of cells, and after storage at -75°C survived 60.2; 66.1; 64.8; 80.5; 70.1% of cells, respectively. After storage at -196°C , the immobilized cells did not die.



–40°C лишилися життєздатними 28,6; 35,4; 38,6; 45,2; 37,0% клітин, а після зберігання при –75°C – 60,2; 66,1; 64,8; 80,5; 70,1% клітин відповідно. Після зберігання за температури –196°C іммобілізовані клітини не загинули. Іммобілізація в усіх варіантах гелю та зберігання за вказаних низьких температур не викликали змін інших виробничих характеристик *E. coli* M-17. Морфологічна будова клітин та особливості їх росту на м'ясопептонному агарі, середовищі Ендо, в м'ясопептонному бульйоні відповідали вимогам загальної фармакопейної статті [2]. Бактеріальні клітини ферментували сорбіт, арабінозу, лізин, сахарозу, з утворенням кислоти та газу ферментували глюкозу, лактозу, мальтозу, маніт, утворювали індол, не гідролізували сечовину, не ферментували інозит, не утворювали сірководень, не викликали гемоліз еритроцитів людини та спектр чутливості до антибіотиків. Зони затримки росту тест-штамів патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів на агаризованому середовищі Гаузе №2 дорівнювали 12–15 мм. Бактеріальні клітини усіх зразків були нешкідливими, невірулентними, нетоксичними. Усі досліджені характеристики також відповідали вимогам загальної фармакопейної статті [1, 3, 4].

Отримані результати свідчать про те, що іммобілізація в носіях із альгінатного гелю та наступне зберігання за температур –20, –40, –75, –196°C не впливають на регламентні виробничі характеристики пробіотичного штаму *E. coli* M-17. У процесі зберігання за температур –20, –40, –75°C частина іммобілізованих клітин гинула. Зі зниженням температури зберігання кількість загиблих клітин зменшувалася. Додавання до складу альгінатного гелю дисахаридів та знежиреного молока підвищувало кріозахисні властивості гелю.

Таким чином, вказані температурні режими та додавання до складу альгінатного гелю кріозахисних домішок можна застосовувати для довгострокового зберігання комерційних препаратів, продуктів і кормових домішок на основі іммобілізованих пробіотиків. Втрати частини життєздатних клітин у процесі зберігання протягом терміну реалізації можуть бути компенсовані більш високою вихідною концентрацією клітин у гелі або більшою кількістю гелевих гранул із іммобілізованими клітинами в комерційних формах препаратів і продуктів.

Література

1. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*. Общая фармакопейная статья. ОФС.1.7.2.0001.15. [Internet] 2016 сен-

Immobilization in all variants of the gel and storage at these low temperatures did not cause changes in other manufacturing characteristics of *E. coli* M-17. The morphological structure of cells and features of their growth on meat peptone agar, Endo's medium, in meat peptone broth met the requirements of the general pharmacopoeial monograph [1]. Bacterial cells fermented sorbitol, arabinose, lysine, sucrose, and with the formation of acid and gas fermented glucose, lactose, maltose, mannitol, formed indole, did not hydrolyze urea, did not ferment inositol, did not form hydrogen sulfide, did not cause hemolysis of human erythrocytes and the sensitivity spectrum to antibiotics. The growth retardation zones of test strains of pathogenic and opportunistic microorganisms on Gauze's medium №2 were equal to 12–15 mm. Bacterial cells of all samples were harmless, non-virulent, non-toxic. All studied characteristics also met the requirements of the general pharmacopoeial monograph [2, 3, 4].

The obtained results indicate that immobilization in alginate gel carriers and subsequent storage at temperatures of –20, –40, –75, –196°C do not affect the regulatory manufacturing characteristics of the probiotic *E. coli* strain M-17. During storage at temperatures of –20, –40, –75°C, part of the immobilized cells died. With reducing a storage temperature, the number of dead cells decreased. The addition of disaccharides and skimmed milk to the alginate gel enhanced the cryoprotective properties of the gel.

Thus, these temperature regimens and complementing with cryoprotective additives to the alginate gel can be used for long-term storage of commercial drugs, products and feed additives based on immobilized probiotics. The loss of part of the viable cells at storage during the implementation period can be compensated by a higher initial concentration of cells in the gel or more gel granules with immobilized cells in commercial forms of drugs and products.

References

1. Ministry of Health of the Russian Federation. [Colic Probiotics]. General pharmacopeia monograph. OFS.1.7.1.0005.15. [Internet] 2016 Aug [Cited 05.10.2020]; 10 p. Available from: <https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/08/OFS.1.7.1.0005.15-Kolisoderzhashhie-probiotiki.pdf>. Russian.
2. Ministry of Health of the Russian Federation. [Determination of the specific activity of probiotics. General Pharmacopoeia Monograph]. GPhM.1.7.2.0009.15. [Internet] 2016 Aug [Cited 05.10.2020]; 24p. Available from: <https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/08/OFS.1.7.2.0009.15-Opredelenie-spetsificheskoy-aktivnosti-probiotikov.pdf>. Russian.
3. Ministry of Health of the Russian Federation. [Manufactured probiotic strains and probiotic control strains. General Pharmacopoeia Monograph]. GPhM.1.7.2.0012.15. [Internet] 2016 Sep [Cited 05.10.2020]; 49 p. Available from: <https://>



- тябрь [Цитовано 05.10.2020]; 11 с. Доступно на: <http://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/09/OFS.1.7.2.0001.15-Bezopasnost-probiotikov-v-testah-in-vivo.pdf>
2. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Колисодержащие пробиотики. Общая фармакопейная статья. ОФС.1.7.1.0005.15. [Internet] 2016 август [Цитовано 05.10.2020]; 10с. Доступно на: <https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/08/OFS.1.7.1.0005.15-Kolisoderzhashhie-probiotiki.pdf>
 3. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Определение специфической активности пробиотиков. Общая фармакопейная статья. ОФС.1.7.2.0009.15. [Internet] 2016 август [Цитовано 05.10.2020]; 24с. Доступно на: <https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/08/OFS.1.7.2.0009.15-Opredelenie-spetsificheskoy-aktivnosti-probiotikov.pdf>
 4. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков. Общая фармакопейная статья. ОФС.1.7.2.0012.15. [Internet] 2016 сентябрь [Цитовано 05.10.2020]; 49с. Доступно на: <https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/09/OFS.1.7.2.0012.15-Proizvodstvennyye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov.pdf>
 5. Похиленко ВД, Баранов АМ, Детушев КВ. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2009; 4(12): 99–121.
 6. Mitropoulou G, Nedovic V, Goyal A, Kourkoutas Y. Immobilization technologies in probiotic food production. *J Nutr Metab.* 2013; 2013:716861 [Цитовано 05.10.2020]. Доступно на: <https://downloads.hindawi.com/journals/jnme/2013/716861.pdf>
 7. Tsen JH, Huang HY, Linb YP, King VE. Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. *J Microbiol Methods.* 2007; 70(3): 561–4.
 - pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/09/OFS.1.7.2.0012.15-Proizvodstvennyye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov.pdf. Russian.
 4. Ministry of Health of the Russian Federation. [Safety of probiotics in in vivo tests. General Pharmacopoeia Monograph.] GPhM.1.7.2.0001.15. 2016 Sep [Cited 05.10.2020]; 11 p. Available from: <http://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/09/OFS.1.7.2.0001.15-Bezopasnost-probiotikov-v-testah-in-vivo.pdf>. Russian.
 5. Mitropoulou G, Nedovic V, Goyal A, Kourkoutas Y. Immobilization technologies in probiotic food production. *J Nutr Metab.* 2013; 2013:716861. [Cited 05.10.2020]. Available from: <https://downloads.hindawi.com/journals/jnme/2013/716861.pdf>
 6. Pokhilenko VD, Baranov AM, Detushev KV. [Long-term storage methods of collection cultures of microorganisms and development trends]. *Izvestiya vysshih uchebnyh zavedenij. Volga region. Medical sciences.* 2009; 4(12): 99–121. Russian.
 7. Tsen JH, Huang HY, Linb YP, King VE. Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. *J Microbiol Methods.* 2007; 70(3): 561–4.

