

УДК 579.61

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-348-360>

Научная статья | Scientific article



## Лиофилизация бактериальных тест-штаммов в аппарате коллекторного типа: влияние параметров замораживания и высушивания, объема заполнения ампул и плотности ватного фильтра

А.А. Воропаев<sup>✉</sup>, О.В. Фадейкина, Т.Н. Ермолаева, Д.С. Давыдов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Воропаев Андрей Андреевич; [voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

### Резюме

**Актуальность.** В работе Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России основной метод работы – лиофилизация, обеспечивающая сохранение свойств депонированных тест-штаммов. Для успешной лиофилизации необходимо экспериментальное определение основных параметров и критических условий процесса.

**Цель.** Оценить влияние скорости и времени замораживания, времени высушивания, объема заполнения ампул, плотности ватного фильтра на качество коллекционных бактериальных тест-штаммов при лиофилизации на аппарате коллекторного типа.

**Материалы и методы.** Тест-штаммы *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, *Salmonella Abony* NCTC 6017 высушивали методом лиофилизации на аппарате коллекторного типа. Замораживание велось при температуре  $-70\pm 2$  °C в низкотемпературном морозильнике (медленная заморозка) и в смеси «сухого льда» со спиртом (быстрая заморозка). Статистическую обработку данных проводили при помощи программ MS Excel и Statistica, v. 10.

**Результаты.** Время замораживания ампул в низкотемпературном морозильнике при  $-70\pm 2$  °C не менее 4 ч, дальнейшее хранение возможно при данной температуре до 1 мес. без потери качества конечного продукта. Время замораживания ампул в смеси «сухого льда» и спирта составило менее 1 мин. Различий в показателях качества лиофилизатов, полученных при быстрой и медленной заморозке, не выявлено, кроме внешнего вида: при быстром замораживании таблетка лиофилизата формируется неровная, легко отделяется от стекла и крошится, что нежелательно. Длительность этапа первичного высушивания ампул наполнения 0,2 мл составила 6–8 ч. Показано, что время досушивания в течение 11, 18, 35 и 59 ч приводит к получению лиофилизатов сравнимого качества: количество жизнеспособных микробных клеток (КОЕ/мл) сразу после лиофилизации и по завершении стресс-теста во всех случаях статистически значимо не отличалось. Содержание остаточной влаги при досушивании в течение 59 ч – менее 2%. Плотность ватного фильтра имеет критическое влияние на качество лиофилизата, рекомендуется использование ватного фильтра массой не более 50 мг.

**Выводы.** Изучены основные этапы высушивания коллекционных тест-штаммов на аппарате коллекторного типа. Исследовано влияние на качество конечного продукта следующих факторов: скорости и времени замораживания, длительности высушивания, объема заполнения ампул, плотности ватного фильтра. Полученные результаты используются в работе Государственной коллекции микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

**Ключевые слова:** тест-штаммы микроорганизмов; параметры лиофилизации; замораживание; сублимация; досушивание; лиофилизатор коллекторного типа; ватный фильтр

**Для цитирования:** Ворopaев А.А., Фадейкина О.В., Ермолаева Т.Н., Давыдов Д.С. Лиофилизация бактериальных тест-штаммов в аппарате коллекторного типа: влияние параметров замораживания и высушивания, объема заполнения ампул и плотности ватного фильтра. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):348–360. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-348-360>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## Lyophilisation of bacterial test strains in a manifold-type apparatus: effects of freezing and drying parameters, ampoule fill volume, and cotton filter density

Andrey A. Voropaev✉, Olga V. Fadeikina, Tatyana N. Ermolaeva, Dmitry S. Davydov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Andrey A. Voropaev; [voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

### Abstract

**Scientific relevance.** Lyophilisation is the preferred method at the National Collection of Pathogenic Microorganisms (NCPM) of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation. Lyophilisation is used to provide for high standards of test-strain deposition, storage, and transportation and to ensure that test strains maintain their properties. Successful lyophilisation requires conducting experiments to establish the key parameters and critical conditions of the process.

**Aim.** The study aimed to evaluate the effects that the speed and time of freezing, the time of drying, the fill volume of ampoules, and the density of cotton filters have on the quality of NCPM indicator microorganisms lyophilised in a manifold-type apparatus.

**Materials and methods.** *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, and *Salmonella Abony* NCTC 6017 were freeze-dried using a manifold-type apparatus. The authors used a low-temperature freezer at  $-70\pm 2$  °C for slow freezing and a mixture of dry ice and alcohol for quick freezing. The statistical analysis was performed using Microsoft Excel and STATISTICA 10.

**Results.** The minimum time needed for freezing the samples in a low-temperature freezer at  $-70\pm 2$  °C was 4 hours. Further storage at this temperature for up to 1 month was shown possible without compromising the quality of the final product. The time needed for freezing the samples in a mixture of dry ice and alcohol was under 1 minute. No differences in quality parameters were observed between the lyophilised samples frozen slowly or quickly, except for the cake appearance. Quick freezing resulted in cakes that were non-uniform, crumbled, and pulled away from the ampoule walls, which is considered undesirable. The primary drying stage for ampoules with a fill volume of 0.2 mL took 6–8 hours. The secondary drying stage of 11, 18, 35, and 59 hours resulted in comparable lyophilisate quality: the authors observed no statistically significant differences in viable cell counts (CFU/mL) at the end of lyophilisation and at the end of stress testing. The residual moisture content after 59-hour secondary drying was less than 2%. The cotton filter density had a critical influence on the lyophilisate quality. Therefore, the authors recommend using cotton filters weighing 50 mg or less.

**Conclusions.** The authors analysed the main stages of the lyophilisation process used for NCPM test strains and considered the effects that the speed and time of freezing, the time of drying,

the fill volume of ampoules, and the density of cotton filters have on the quality of the final lyophilised product. The NCPM has implemented the results of this study in its work.

**Key words:** test strains; indicator microorganisms; lyophilisation parameters; freezing; sublimation; secondary drying; desorption; manifold-type lyophiliser; cotton filter

**For citation:** Voropaev A.A., Fadeikina O.V., Ermolaeva T.N., Davydov D.S. Lyophilisation of bacterial test strains in a manifold-type apparatus: effects of freezing and drying parameters, ampoule fill volume, and cotton filter density. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):348–360. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-348-360>

**Funding.** The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Введение

Ведение коллекции патогенов предусматривает хранение и поддержание свойств депонированных штаммов<sup>1</sup>. Лиофильное высушивание – основной метод для поддержания коллекционного фонда микроорганизмов. Высушенную культуру микроорганизмов, запаянную в стеклянных ампулах в условиях вакуума, можно хранить в течение многих лет при температуре 2–8 °С и транспортировать в условиях окружающей среды. Данные факторы делают метод лиофилизации основным в работе Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по обеспечению эталонными бактериальными тест-штаммами лабораторий и фармацевтического производства Российской Федерации.

Лиофильные аппараты выпускают двух типов: камерного и коллекторного. В аппаратах первого типа ампулы устанавливают на полку в камере лиофилизатора, где проходят все этапы высушивания. В аппаратах коллекторного типа замороженные ампулы подключают к конденсору. При работе с патогенными микроорганизмами необходимое условие – соблюдение требований биологической безопасности. Применение лиофильных аппаратов камерного типа требует работ по их адаптации для обеспечения необходимого уровня биологической безопасности при лиофилизации тест-штаммов III и IV групп патогенности [1]. Этому недостатка лишены аппараты коллекторного типа, которые используют, в частности, для высушивания коллекционных штаммов возбудителей особо опасных инфекций [2]. Например, аппарат M. S. R. 18 (Usifroid, Франция) состоит из конденсора, ва-

куумного насоса, стаканов (в них помещают ампулы для лиофилизации) и системы шлангов (соединяют стаканы с конденсором). Конструкция установки не предусматривает контролируемое охлаждение или нагревание образцов. Образцы нагреваются до комнатной температуры за счет естественного притока тепла из окружающей среды. Температура конденсора постоянна, обеспечивается смесью твердого диоксида углерода («сухой лед») со спиртом этиловым.

Для успешного проведения лиофилизации с использованием коллекторного аппарата необходимо экспериментальное определение основных параметров и критических условий высушивания тест-штаммов микроорганизмов.

Лиофилизация состоит из трех этапов: замораживание, первичное высушивание (сублимация), вторичное высушивание (досушивание, или десорбция)<sup>2</sup>. На начальном этапе лиофилизации необходимо перевести всю воду в образце в твердое состояние для последующей ее возгонки. Этот этап наиболее сложный и важный для всего процесса [3–5]. В лабораторной практике применяют две техники замораживания, отличающиеся по скорости и способу охлаждения образцов:

- медленная заморозка – в камере низкотемпературного морозильника;
- быстрая заморозка – в охлаждающей жидкости (например, в смеси спирта этилового и «сухого льда»).

При медленном замораживании вначале происходит образование кристаллов льда снаружи клетки, а внутри нее остается жидкая вода, в которой постепенно образуется гипертонический раствор, который может приводить

<sup>1</sup> Постановление Правительства Российской Федерации от 30.09.2021 № 1668 «Об утверждении Правил создания, пополнения, ведения и использования коллекций патогенных микроорганизмов и вирусов, а также Правил создания и ведения национального каталога коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов» (с измен. на 16.06.2022).

<sup>2</sup> ОФС.1.4.1.0031.18 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018. С. 2025–30.

к деградации белка, повреждению мембран, и в конечном итоге – к снижению выживаемости лиофилизуемых микроорганизмов [6–10].

При быстром замораживании существует опасность образования внутриклеточного льда, который вызывает физическое разрушение клеток, что является более критичным, чем влияние гипертонического раствора [11]. Замораживание сложных растворов, содержащих лиопротекторы (например, сахарозу), происходит по механизму стеклования: с понижением температуры увеличивается вязкость раствора, и полное замораживание идет при температуре стеклования. Биологический материал при стекловании избегает повреждения и сохраняет естественные структуру и функции. Для растворов сахарозы температура стеклования составляет  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  [12].

Второй этап лиофилизации – первичное высушивание, или сублимация. Сублимация воды происходит из замороженного состояния в условиях пониженного давления (вакуум).

Третий этап лиофилизации – вторичное высушивание, или десорбция. На данной стадии скорость удаления воды уменьшается, так как оставшаяся вода прочно связана [13]. От продолжительности этапа зависит содержание остаточной воды в лиофилизате, которое должно быть в оптимальном диапазоне. Как высокое содержание остаточной воды, так и очень низкое могут оказывать негативное влияние на сохранение жизнеспособности клеток [14].

Основной параметр лиофилизации – общая продолжительность процесса, складывающаяся из времени прохождения каждого этапа. Дополнительный фактор, влияющий на конечный продукт, – использование в ампулах ватных фильтров. Их применяют для обеспечения биологической безопасности и защиты лиофилизата от загрязнения, поступающего из внешней среды, что является важным аспектом лиофилизации. Ватные фильтры изготавливают вручную, что требует стандартизации. Так, плотные ватные фильтры могут создавать сопротивление выходу водяного пара и повышать парциальное давление внутри ампулы, что изменяет условия высушивания и может ухудшить качество лиофилизата [15].

Цель работы – оценка влияния скорости и времени замораживания, времени высушивания, объема заполнения ампул, плотности ватного фильтра на качество коллекционных бак-

териальных тест-штаммов при лиофилизации на аппарате коллекторного типа.

В ходе экспериментов решался ряд задач:

- оценить влияние на конечный продукт различных этапов лиофилизации: времени и скорости замораживания, длительности первичного и вторичного высушивания;
- изучить зависимость времени первичного высушивания от объема заполнения ампул;
- исследовать влияние плотности ватного фильтра на качество лиофилизата;
- провести оценку качества конечного продукта, полученного при разных условиях проведения этапов лиофилизации, по следующим характеристикам: описание (внешний вид), время растворения, потеря в массе при высушивании и количество жизнеспособных микробных клеток.

## Материалы и методы

### Материалы

В работе применяли следующие материалы:

- тест-штаммы микроорганизмов, рекомендуемые для проведения испытаний в ОФС.1.2.4.0002.15<sup>3</sup>: *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924/ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, *Salmonella Abony* NCTC 6017;
- питательная среда: соево-казеиновый агар (Merck, кат. № 1.05458.0500, серия VM805658 737);
- защитная среда: сахарозо-желатиновая среда, содержащая 20% сахарозы (Merck, кат. № 1.07653, серия K48546153) и 2% желатина (Merck, кат. № 1.04070, серия VM918570);
- фармакопейный стандартный образец мутности бактериальных взвесей ФСО 3.1.00084 (ОСО 42-28-84), серия S-2/8-010122, 20 МЕ, производство ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России;
- ампулы (внутренний диаметр – 8 мм), изготовленные из стеклотрубки боросиликатного стекла Simax;
- спирт этиловый 96%, производство ООО «Гатчинский спиртовой завод» (Россия);
- твердый диоксид углерода («сухой лед»), изготовленный по ГОСТ 12162–77 «Двуокись углерода твердая. Технические условия» (ООО «Ритек», Россия).

### Оборудование

Работа проводилась при помощи измерительного и испытательного оборудования, прошедшего поверку (квалификацию, аттестацию):

<sup>3</sup> ОФС.1.2.4.0001.15 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018. С. 848–900.

- весы специальные класса 1 ML204T/A00 (Mettler Toledo, Швейцария);
- морозильник MDF-193AT (Panasonic Healthcare Co., Ltd, Япония);
- лиофильный аппарат Usifroid M.S.R. 18 (Usifroid, Франция);
- вакуумно-сушильный шкаф VD 23 (Binder, Германия);
- термостат ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия);
- шкаф ламинарный БАВ п-01-1,2, класс защиты II (ЗАО «Ламинарные системы», Россия);
- измеритель температуры многоканальный прецизионный МИТ 8.10М1, в комплекте с термометром сопротивления платиновым вибропрочным (ООО «ИзТех», Россия).

### Методы

#### Подготовка тест-штаммов к высушиванию.

Культивирование тест-штаммов проводили при температуре  $+37\pm 2$  °С на поверхности агаризованной среды в чашках Петри. Для высушивания использовали 20-часовую культуру пассажа 2. Колонии отбирали бактериологической петлей и готовили суспензию, соответствующую 20 МЕ ФСО мутности бактериальных взвесей, в стерильной воде. Десятикратными разведениями разводили до концентрации  $10^3$  КОЕ/мл. Такое разведение было необходимо, чтобы избежать «чувства кворума» микроорганизмов и оценить только влияние исследуемого фактора, так как при высокой концентрации клеток выживаемость увеличивается [16]. Разведенную суспензию объединяли в равном объеме с защитной средой. Для оценки времени досушивания десятикратные разведения не проводили.

**Замораживание образцов.** Для быстрой заморозки подготовленные ампулы с тест-штаммами помещали в приготовленную смесь спирта этилового (96%) с порошком диоксида углерода в равном объеме, для медленного замораживания – в низкотемпературный морозильник.

**Леофильное высушивание.** Тест-штаммы микроорганизмов высушивали на аппарате коллекторного типа под вакуумом не менее 0,2–0,3 Па. Температура конденсора поддерживалась смесью «сухого льда» и спирта этилового (96%).

**Весовой метод определения времени первичного высушивания.** Взвешивали (с точностью

до 0,0001 г) пустые ампулы, которые заполняли защитной средой и взвешивали до и после высушивания. По разнице масс рассчитывали массу сублимированной влаги.

**Определение времени растворения.** Проводили согласно ОФС.1.4.1.0031.18<sup>4</sup>.

**Определение потери в массе при высушивании.** В испытании, по способу 1 из ОФС.1.2.1.0010.15<sup>5</sup>, использовали 10 ампул с лиофилизатом.

**Определение количества жизнеспособных микробных клеток.** Лиофилизат в ампуле восстанавливали стерильной водой. Для каждого исследуемого параметра при определении количества жизнеспособных микробных клеток использовали по три ампулы. Биоматериал каждой ампулы десятикратно разводили; проводили посев в три чашки с питательной средой, инкубировали 24 ч при температуре  $+37\pm 2$  °С. При подсчете колоний оценивали культуральные свойства тест-штаммов: морфологию, размер и окраску колоний.

**Стресс-тест.** Испытание проводили с учетом рекомендаций ОФС.1.1.0020.18<sup>6</sup>, ампулы с лиофилизированными тест-штаммами помещали в термостат на хранение при  $+37\pm 2$  °С на сроки 1 и 3 мес.

**Статистическая обработка результатов.** Сравнение двух групп данных (быстрая и медленная заморозка) проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента. Сравнение нескольких групп данных (оценка влияния времени замораживания, досушивания и плотности ватного фильтра) – при помощи критерия Краскела–Уоллиса.

## Результаты и обсуждение

### Замораживание

При медленном замораживании ампулы распределяли в стакане для лиофилизации таким образом, чтобы половина датчиков находилась в центре стакана, а половина – по краям. Затем стаканы помещали в низкотемпературный морозильник и измеряли температуру до достижения  $-70\pm 2$  °С, фиксируя время. При быстром замораживании ампулы с датчиком помещали в смесь спирта этилового с «сухим льдом».

Минимальное время медленного замораживания составило 4 ч, быстрого – менее 1 мин.

Все образцы высушивали в течение 24 ч. Качество лиофилизатов, замороженных с различной

<sup>4</sup> ОФС.1.4.1.0031.18 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018. С. 2025–30.

<sup>5</sup> ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018. С. 557–9.

<sup>6</sup> ОФС.1.1.0020.18 Стабильность биологических лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018. С. 405–22.

**Таблица 1.** Влияние способа замораживания на качество лиофилизированных образцов тест-штаммов  
**Table 1.** Quality of lyophilised test-strain samples depending on the freezing method

Тест-штамм <i>Test strain</i>	Способ замораживания <sup>а</sup> <i>Freezing method<sup>а</sup></i>	Показатель качества лиофилизата <i>Lyophilisate quality parameter</i>			
		Описание (внешний вид) <i>Description (Appearance)</i>	Время растворения, с <i>Reconstitution time, s</i>	Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Количество жизнеспособных клеток <sup>б</sup> , КОЕ/мл <i>Viable cell count<sup>б</sup>, CFU/ml</i>
<i>S. Abony</i> NCTC 6017	Медленное <i>Slow</i>	+	≤10	1,8	(6,4±1,0)×10 <sup>5</sup>
	Быстрое <i>Quick</i>	-	≤10	1,8	(4,5±0,4)×10 <sup>5</sup>
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 12924	Медленное <i>Slow</i>	+	≤10	1,8	(2,7±0,4)×10 <sup>2</sup>
	Быстрое <i>Quick</i>	-	≤10	1,8	(2,0±0,8)×10 <sup>2</sup>
<i>S. aureus</i> NCTC 10788	Медленное <i>Slow</i>	+	≤10	1,8	(4,6±0,8)×10 <sup>2</sup>
	Быстрое <i>Quick</i>	-	≤10	1,8	(4,2±1,7)×10 <sup>2</sup>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

*Примечание.* «+» – сухая пористая масса в виде таблетки, цельная; «-» – таблетка неровная, крошится.

<sup>а</sup> Способы замораживания: медленное замораживание – в низкотемпературном морозильнике; быстрое – в смеси спирта этилового (96%) с порошком твердого диоксида углерода в равном объеме.

<sup>б</sup> Среднеарифметическое значение и стандартное отклонение:  $X_{cp} \pm S$ .

*Note.* +, uniform, porous, and dry cake; -, non-uniform, crumbling cake.

<sup>а</sup> Slow freezing in a low-temperature freezer and quick freezing in equal volumes of powdered carbon dioxide and ethanol (96%).

<sup>б</sup> Arithmetic means and standard deviations:  $X_{cp} \pm S$ .

скоростью, оценивали по следующим характеристикам (табл. 1): описание (внешний вид), время растворения, потеря в массе при высушивании и количество жизнеспособных микробных клеток.

Статистически значимые различия ( $t_{эксн} = 5,29 > t_{табл} (df=16; 0,05) = 2,12$ ) по количеству КОЕ после высушивания наблюдались в образцах тест-штамма *S. Abony* NCTC 6017: при медленном замораживании количество КОЕ было выше, чем при быстром, на 30%. Для двух других штаммов (*P. aeruginosa* NCTC 12924, *S. aureus* NCTC 10788) результаты сопоставимы: значения находятся в пределах стандартного отклонения от среднего значения, т.е. количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) практически не зависело от скорости замораживания. Различия по времени растворения и потере массы при высушивании, в зависимости от разных скоростей замораживания, не обнаружены, однако внешний вид лиофилизатов значительно различался. После быстрого замораживания таблетка лиофилизата формируется неровная, легко отделяется от стекла и крошится, после медленного – ровная, плотно прилегает к стеклу.

Варьирование времени замораживания необходимо в практической работе, так как позволяет рационально использовать ресурсы коллекции. С учетом этого дополнительно провели

оценку влияния продолжительности хранения при  $-70 \pm 2$  °C на качество лиофилизированных образцов (табл. 2). Одновременно приготовленные ампулы с суспензией штамма *S. Abony* NCTC 6017 поместили в морозильник в разных стаканах для лиофилизации. По одному стакану вынимали через 4, 28, 168 ч (1 нед.), 336 ч (2 нед.), 720 ч (1 мес.) замораживания и лиофилизировали в течение 24 ч. Анализ результатов позволяет сделать вывод, что жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов практически не зависит от времени замораживания (в нашем случае от 4 ч до 1 мес.) – статистически значимые отличия не выявлены: рассчитанное по экспериментальным данным значение критерия Краскела–Уоллиса ( $H_{(4, n=15)} = 8,29$ ) менее табличного значения ( $H_{табл} = 8,33$ ) при  $\alpha = 0,05$  и достигнутом уровне значимости  $p = 0,0814$ . Следовательно, допустимо хранение при  $-70 \pm 2$  °C медленно замороженных образцов до 720 ч (1 мес.) без потери качества конечного продукта.

### Первичное высушивание (сублимация)

Определение длительности этапа первичного высушивания проводили двумя методами.

1. Визуальный метод: по энергии движения сублимируемой воды из высушиваемого материала к конденсору. Время начала и окончания

**Таблица 2.** Результаты оценки качества лиофилизированных образцов штамма *S. Abony* NCTC 6017 в зависимости от времени замораживания

**Table 2.** Quality assessment results for lyophilised samples of *S. Abony* NCTC 6017 depending on the freezing time

Время замораживания и хранения при $-70\pm 2$ °C, ч <i>Freezing and storage time at <math>-70\pm 2</math> °C, h</i>	Показатели качества лиофилизата <i>Lyophilisate quality parameters</i>			
	Описание (внешний вид) <i>Description (Appearance)</i>	Время растворения, с <i>Reconstitution time, s</i>	Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Количество жизнеспособных клеток <sup>a</sup> , КОЕ/мл <i>Viable cell count<sup>a</sup>, CFU/mL</i>
4	+	≤10	1,7	$(1,3\pm 0,3)\times 10^5$
28	+	≤10	1,8	$(1,5\pm 0,3)\times 10^5$
168	+	≤10	1,2	$(1,4\pm 0,1)\times 10^5$
336	+	≤10	1,2	$(1,5\pm 0,3)\times 10^5$
720	+	≤10	1,1	$(1,3\pm 0,2)\times 10^5$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «+» – сухая пористая масса в виде таблетки, цельная.

<sup>a</sup> Среднеарифметическое значение и стандартное отклонение:  $X_{cp} \pm S$ .

Note. +, uniform, porous, and dry cake.

<sup>a</sup> Arithmetic means and standard deviations:  $X_{cp} \pm S$ .

первичного высушивания определяли визуально, фиксируя наличие и отсутствие вращения специальных индикаторных турбинок, помещенных в патрубок крышки стакана с образцами. Турбинки приводятся во вращательное движение потоком сублимируемой воды (паром). При окончании сублимации скорость движения пара падает и вращательное движение турбинок останавливается.

2. Весовой метод: по изменению в единицу времени массы лиофилизованного материала, которая определяется как разница масс ампулы с содержимым до и после высушивания (масса сублимируемой влаги).

Время сублимации оценивали для ампул с объемом содержимого 0,2 мл (стандартное заполнение ампул с тест-штаммами). Результаты представлены в таблице 3. Время сублимации для ампул по 0,2 мл составило 6–8 ч.

Результаты экспериментов позволяют выделить два периода сублимации:

- прогрев материала от температуры замораживания ( $-70\pm 2$  °C) до температуры, при которой начинается эффективный процесс сублимации: длится до 1 ч, вращение турбинок отсутствует;
- период первичной сушки (сублимации): характеризуется вращением турбинок, происходит

**Таблица 3.** Результаты определения времени первичного высушивания для медленно и быстро замороженных образцов (заполнение ампул – 0,2 мл)

**Table 3.** Determination of primary drying time for slowly and quickly frozen samples (ampoule fill volume: 0.2 mL)

Время первичного высушивания, ч <i>Primary drying time, h</i>	Остаточная масса образца ( $X_{cp} \pm S$ ), % <i>Residual sample weight (<math>X_{cp} \pm S</math>), %</i>		Вращение турбинки <i>Rotation of impellers</i>	
	Медленное замораживание <i>Slow freezing</i>	Быстрое замораживание <i>Quick freezing</i>	Медленное замораживание <i>Slow freezing</i>	Быстрое замораживание <i>Quick freezing</i>
0	100,0±0	100,0±0	–	–
1	100,0±0	100,0±0	–	–
2	89,5±1,6	93,0±2,2	+	+
4	24,2±11,5	45,1±3,2	+	+
6	11,9±0,1	16,4±6,7	–	+
8	11,3±0,1	11,0±0,1	–	–
9	11,0±0,1	11,0±0,1	–	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «+» – есть вращение турбинок; «–» – нет вращения турбинок.

Note. +, rotation of impeller flow indicators; –, no rotation of impeller flow indicators.

углубление зоны высушенного материала; основная часть влаги удаляется в течение 8 ч после установки образцов в лиофильный аппарат.

По истечении 8 ч заканчивается период первичного высушивания и начинается этап вторичного высушивания.

#### Вторичное высушивание (десорбция)

Это самый продолжительный этап, так как десорбция подвергается связанная вода. Возможно несколько оптимальных и практически удобных режимов лиофилизации коллекционных штаммов. Исследуемые режимы и оценка влияния более продолжительного досушивания на качество лиофилизатов представлены в таблице 4.

Результаты эксперимента (табл. 5) продемонстрировали, что досушивание в течение 11–59 ч не оказывает влияния на качество лиофилизата, что подтверждается отсутствием статистически значимых отличий значений КОЕ/мл в готовых лиофилизатах тест-штаммов. Рассчитанные по экспериментальным данным значения критерия Краскела–Уоллиса для исследуемых тест-штаммов меньше табличного значения ( $H_{\text{табл}}=7,0$  при  $\alpha=0,05$ ):

- *S. Abony* NCTC 6017 –  $H_{(3, n=12)}=4,6$  ( $p=0,2044$ );
- *S. aureus* NCTC 10788 –  $H_{(3, n=12)}=4,8$  ( $p=0,1887$ );
- *P. aeruginosa* NCTC 12924 –  $H_{(3, n=12)}=6,8$  ( $p=0,0798$ ).

Значительное влияние время десорбции оказывает на остаточную влажность. При этом что все образцы имеют содержание остаточной влажности менее 3%, для всех тест-штаммов потеря влаги при разной экспозиции существенно отличалась: 0,7–2,1% – за 11 ч, 0,6–0,8% – за 59 ч (табл. 5).

#### Проведение стресс-теста

Теоретически при полном отсутствии влаги исключается возможность почти всех химических реакций, которые могут привести к необратимым изменениям биомолекул и снижению жизнеспособности тест-штаммов микроорганизмов [17]. В связи с этим была поставлена задача оценить долговременные эффекты остаточного содержания воды в лиофилизате. Провели тепловой стресс-тест: образцы выдерживались при температуре  $+37\pm 2$  °C в течение 1 и 3 мес.

Тест основан на правиле Вант-Гоффа, согласно которому повышение температуры влечет за собой ускорение скорости химических реакций [18]. При увеличении температуры хранения (увеличится и скорость химических реакций) произойдет снижение активности лиофилизированных образцов. Скорость уменьшения количества жизнеспособных клеток (снижение активности), выраженную в десятичном логарифме, можно математически аппроксимировать линейной моделью вида  $y = kx + b$ .

Угловым коэффициентом ( $k$ ) характеризует скорость снижения активности: чем выше значение коэффициента, тем выше скорость уменьшения количества жизнеспособных клеток. Сравнение коэффициентов, рассчитанных для каждого из изученных тест-штаммов (табл. 6), позволяет оценить влияние различного содержания воды в образце и, как следствие, времени досушивания.

Значения угловых коэффициентов при разном времени досушивания в пределах одного штамма различаются незначительно. Четкой зависимости активности от времени досушивания не обнаружено для штаммов *S. Abony* NCTC 6017 и *P. aeruginosa* NCTC 12924. Для штамма *S. aureus*

Таблица 4. Определение временных режимов первичного и вторичного высушивания коллекционных штаммов

Table 4. Selection of time modes for primary and secondary drying of test strains

Режим Mode	Время начала замораживания Start of freezing	Время начала лиофилизации Start of lyophilisation	Время окончания лиофилизации End of lyophilisation	Продолжительность высушивания, ч Drying stage duration, h		
				Первичное высушивание Primary drying	Вторичное высушивание Secondary drying	Общее время Total time
1	1-й день, 13:00 Day 1, 13:00	1-й день, 17:00 Day 1, 17:00	2-й день, 10:00 Day 2, 10:00	6	11	17
2	1-й день, 17:00 Day 1, 17:00	2-й день, 10:00 Day 2, 10:00	3-й день, 10:00 Day 3, 10:00	6	18	24
3	1-й день, 13:00 Day 1, 13:00	1-й день, 17:00 Day 1, 17:00	4-й день, 10:00 Day 4, 10:00	6	35	41
4	1-й день, 13:00 Day 1, 13:00	1-й день, 17:00 Day 1, 17:00	5-й день, 10:00 Day 5, 10:00	6	59	65

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data



**Таблица 5.** Результаты оценки качества образцов лиофилизата тест-штаммов, полученных при разном времени досушивания  
**Table 5.** Quality assessment results for lyophilised test-strain samples obtained using different drying times

Тест-штамм <i>Test strain</i>	Время досушивания, ч <i>Secondary drying time, h</i>	Показатель качества лиофилизата <i>Lyophilisate quality parameter</i>			
		Описание (внешний вид) <i>Description (Appearance)</i>	Время растворения в воде, с <i>Reconstitution time (water), s</i>	Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Количество жизнеспособных микробных клеток, $X_{cp} \pm S$ , КОЕ/мл <i>Viable cell count, <math>X_{cp} \pm S</math>, CFU/mL</i>
<i>S. Abony</i> NCTC 6017	11	+	≤10	1,7	$(6,0 \pm 1,4) \times 10^8$
	18	+	≤10	1,4	$(5,7 \pm 1,4) \times 10^8$
	35	+	≤10	1,0	$(6,0 \pm 1,4) \times 10^8$
	59	+	≤10	0,6	$(4,9 \pm 1,6) \times 10^8$
<i>S. aureus</i> NCTC 10788	11	+	≤10	2,1	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^8$
	18	+	≤10	1,3	$(1,1 \pm 0,5) \times 10^8$
	35	+	≤10	1,1	$(1,1 \pm 0,4) \times 10^8$
	59	+	≤10	0,8	$(0,7 \pm 0,3) \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 12924	11	+	≤10	2,0	$(3,9 \pm 0,4) \times 10^7$
	18	+	≤10	1,6	$(3,7 \pm 0,4) \times 10^7$
	35	+	≤10	1,0	$(2,8 \pm 0,7) \times 10^7$
	59	+	≤10	0,8	$(2,7 \pm 0,6) \times 10^7$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Таблица 6.** Результаты воздействия стресс-условий (повышенная температура хранения +37±2 °С в течение 1 и 3 мес.) на выживаемость лиофилизированных тест-штаммов

**Table 6.** Lyophilised test-strain survival as a function of stress conditions (storage at an elevated temperature of +37±2 °C for 1 and 3 months)

Тест-штамм <i>Test strain</i>	Время досушивания, ч <i>Secondary drying time, h</i>	Количество жизнеспособных микробных клеток, lg КОЕ/мл <i>Viable cell count, log<sub>10</sub> CFU/mL</i>			Угловой коэффициент, k <i>Slope, k</i>	Коэффициент детерминации, R <sup>2</sup> <i>Coefficient of determination, R<sup>2</sup></i>
		До стресс-теста <i>Baseline</i>	После стресс-теста <i>Under stress conditions</i>			
			через 1 мес. <i>after 1 mo</i>	через 3 мес. <i>after 3 mos</i>		
<i>S. Abony</i> NCTC 6017	11	8,78	6,97	4,12	1,53	1,00
	18	8,76	6,99	4,48	1,40	1,00
	35	8,78	6,90	4,51	1,39	0,99
	59	8,69	6,78	4,37	1,41	0,99
<i>S. aureus</i> NCTC 10788	11	8,11	7,91	7,34	0,26	1,00
	18	8,04	8,03	7,42	0,22	0,95
	35	8,04	8,04	7,52	0,19	0,94
	59	7,86	7,85	7,68	0,06	0,96
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 12924	11	7,59	6,62	6,21	0,42	0,91
	18	7,57	6,55	6,26	0,40	0,88
	35	7,45	6,48	6,11	0,41	0,90
	59	7,43	6,22	5,79	0,50	0,90

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

NCTC 10788 в стресс-тесте наблюдается увеличение выживаемости при меньшей остаточной влажности: значение углового коэффициента ( $k$ ) составило 0,06 при досушивании в течение 59 ч и содержании остаточной влажности в лиофилизате 0,8%, при этом для 11–35 ч досушивания и остаточной влажности 2,1–1,1%  $k$  находился в пределах 0,26–0,19. Также наблюдаются различия в скорости снижения количества жизнеспособных микробных клеток в зависимости от штамма: для *S. aureus* NCTC 10788 и *P. aeruginosa* NCTC 12924 снижение за 3 мес. составило около 1 lg; для *S. Abony* NCTC 6017 – 4 lg. Такие результаты можно объяснить тонким слоем пептидогликана и наличием полисахаридов у грамотрицательных бактерий. Из данных литературы также известно, что грамположительные микроорганизмы менее чувствительны к лиофилизации [19].

#### Оценка влияния плотности ватного фильтра в ампуле

Для определения влияния плотности ватного фильтра на качество лиофилизата суспензию тест-штамма *S. Abony* NCTC 6017 разливали в ампулы по 0,2 мл и укупоривали ватными фильтрами разной массы: 20, 50, 150 мг. Часть ампул была без фильтра. После этого ампулы помещали в стакан для лиофилизации и проводили все этапы досушивания по режиму № 2 (см. табл. 4). После досушивания ампулы запаивали под вакуумом, определяли содержание остаточной влажности по показателю «Потеря в массе при досушивании». Часть ампул хранилась в стресс-условиях ( $+37\pm 2$  °C) в течение 1 мес.

Вне зависимости от плотности ватного фильтра получаемые колонии тест-штамма *S. Abony* NCTC 6017 были типичными, дифференциации не наблюдалось.

Сразу после лиофилизации количество жизнеспособных микробных клеток, вне зависимости от плотности ватного фильтра, было сопоставимым, а различия не были статистически значимы. Так, значение критерия Краскела–Уол-

лиса, рассчитанное по экспериментальным данным ( $H_{(3, n=12)}=3,5$ ), меньше табличного ( $H_{табл}=7,0$ ) при  $\alpha=0,05$  и достигнутом уровне значимости  $p=0,3261$ .

Однако образцы, полученные с использованием ватного фильтра массой 150 мг, имели высокую остаточную влажность (5,0%) и неудовлетворительный внешний вид: лиофилизат уменьшился в объеме, имеет неровные края (рис. 1). Изменение внешнего вида можно объяснить увеличением давления пара внутри ампулы (из-за массивного, труднопроходимого для пара фильтра), вследствие чего происходит разрушение лиофилизата и увеличение содержания влаги в нем [20]. Кроме того, лиофилизат из ампулы с ватным фильтром массой 150 мг сложно растворялся: время растворения составило около 1 мин, что в 5–6 раз превышало значение этого показателя для образцов с меньшими ватными фильтрами (20, 50 мг) или без фильтра (табл. 7).

Воздействие стресс-условий (температура  $+37\pm 2$  °C) в течение 1 мес. выявило негативное влияние плотного ватного фильтра (150 мг) не только на растворимость и внешний вид таблетки, но и на количество жизнеспособных микробных клеток: число КОЕ/мл уменьшилось на 96%. В то время как в ампулах, высушенных с фильтрами массой 20 и 50 мг, число КОЕ/мл снизилось на 22–25%, что сопоставимо со значением 22% для ампул, высушенных без фильтра, когда отсутствует преграда для испарения влаги из лиофилизируемого материала. Очевидно, что плотный ватный фильтр препятствовал испарению влаги при лиофилизации, способствуя созданию высокой остаточной влажности, которая повлияла как на жизнеспособность образца, так и на внешний вид и время растворения лиофилизата. Следовательно, для получения оптимальной остаточной влажности в готовых лиофилизованных образцах необходимо учитывать плотность ватных фильтров. Рекомендуется использовать ватный фильтр массой не более 50 мг.

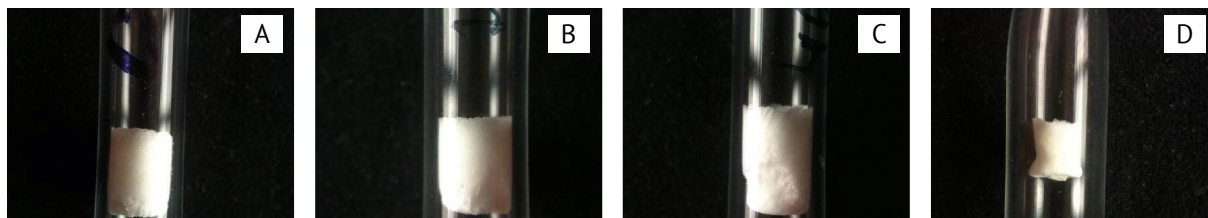


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

**Рис. 1.** Внешний вид лиофилизата тест-штамма *S. Abony* NCTC 6017 в случаях применения ватного фильтра с разной массой: А – 0 мг (без фильтра); В – 20 мг; С – 50 мг; D – 150 мг.

**Fig. 1.** Appearance of *S. Abony* NCTC 6017 samples lyophilised using cotton filters of different weights: A, 0 mg (no filter); B, 20 mg; C, 50 mg; D, 150 mg.

**Таблица 7.** Оценка влияния массы ватного фильтра на показатели качества лиофилизата тест-штамма *S. Abony* NCTC 6017 до и после воздействия стресс-условий (повышенная температура хранения  $+37\pm 2$  °C в течение 1 и 3 мес.)

**Table 7.** Quality of lyophilised samples of *S. Abony* NCTC 6017 before and after stress testing (storage at an elevated temperature of  $+37\pm 2$  °C for 1 and 3 months) depending on the cotton filter weight

Масса ватного фильтра, мг <i>Cotton filter weight, mg</i>	Показатели качества лиофилизата <i>Lyophilisate quality parameters</i>					
	До стресс-теста <i>Baseline</i>				После стресс-теста ( $+37$ °C в течение 1 мес.) <i>After stress testing (+37 °C for 1 mo)</i>	
	Описание (внешний вид) <i>Description (Appearance)</i>	Время растворения, с <i>Reconstitution time, s</i>	Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Количество жизнеспособных клеток <sup>а</sup> , КОЕ/мл <i>Viable cell count<sup>a</sup>, CFU/mL</i>	Время растворения, с <i>Reconstitution time, s</i>	Количество жизнеспособных клеток <sup>а</sup> , КОЕ/мл <i>Viable cell count<sup>a</sup>, CFU/mL</i>
0	+	10	1,4	$(6,5\pm 0,5)\times 10^4$	10	$(1,4\pm 0,1)\times 10^4$
20	+	10	1,5	$(6,4\pm 0,8)\times 10^4$	10	$(1,6\pm 0,1)\times 10^4$
50	+	10	1,5	$(6,7\pm 0,8)\times 10^4$	10	$(1,5\pm 0,3)\times 10^4$
150	-	50–60	5,0	$(6,8\pm 1,0)\times 10^4$	120	$(0,3\pm 0,1)\times 10^4$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

*Примечание.* «+» – сухая пористая масса в виде таблетки, цельная; «-» – таблетка неровная, крошится.

<sup>а</sup> Среднеарифметическое значение и стандартное отклонение:  $X_{cp} \pm S$ .

*Note.* +, uniform, porous, and dry cake; -, non-uniform, crumbling cake.

<sup>а</sup> Arithmetic means and standard deviations:  $X_{cp} \pm S$ .

## Выводы

1. Определено время замораживания ампул с тест-штаммами в низкотемпературном морозильнике ( $-70\pm 2$  °C): не менее 4 ч; допускается хранение в условиях замораживания до 1 мес. без потери качества конечного продукта.
2. Длительность этапа первичного высушивания для ампул объема заполнения 0,2 мл составила 6–8 ч.
3. С помощью стресс-теста изучено влияние этапа вторичного досушивания продолжительностью 11, 18, 35 и 59 ч на показатели качества лиофилизата. Количество жизнеспособных микробных клеток (КОЕ/мл) в готовых лиофилизатах тест-штаммов сразу после лиофилизации при любом изученном времени досушивания не имеет статистически значимых отличий. Содержание остаточной влаги варьирует от 2 до менее 1% при досушивании в течение 59 ч. Вторичное досушивание продолжительностью от 11 до 59 ч не оказывает влияния на качество готового продукта, что позволяет более широко варьировать параметры процесса лиофилизации.
4. Плотность ватного фильтра имеет критическое влияние на качество лиофилизата. Рекомендуется использование ватного фильтра массой не более 50 мг.

## Литература/References

1. Червякова НС, Валова ТВ, Осин АВ. Использование лиофильных аппаратов камерного типа в коллекциях патогенных микроорганизмов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014;(3):65–8. Chervyakova NS, Valova TV, Osin AV. Application of freeze-dryers of chamber type in the collections of pathogenic microorganisms. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014;(3):65–8. (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-3-65-68>
2. Чемисова ОС, Сагакянц ММ, Голенищева ЕН, Полеева МВ, Морозова ИВ. Лиофилизация коллекционных штаммов холерных вибрионов на аппарате коллекторного типа с использованием адсорбентов. *Бактериология*. 2018;3(4):16–20. Chemisova OS, Sagakyants MM, Golenischeva EN, Poleeva MV, Morozova IV. Lyophilization of collection strains of *Vibrio cholerae* on a collector-type apparatus using adsorbents. *Bacteriology*. 2018;3(4):16–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2018-4-16-20>
3. Блынская ЕВ, Тишков СВ, Алексеев КВ, Минаев СВ. Математическое моделирование этапа замораживания в технологии лиофилизированных лекарственных форм. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(2):15–21. Blynskaya EV, Tishkov SV, Alekseyev KV, Minaev SV. Mathematical modeling of the stage of freezing in technology of lyophilized drugs. *Russian Journal of Biotherapy*. 2018;17(2):15–21. (In Russ.). <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-2-15-21>
4. Kasper JC, Friess W. The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing

- methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011;72(2):248–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.010>
5. Assegehegn G, Brito-de la Fuente E, Franco JM, Gallegos C. The importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance. *J Pharm Sci*. 2019;108(4):1378–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>
  6. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984;247(3 Pt 1):C125–42.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
  7. Zhao G, Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol*. 2005;99(2):333–8.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x>
  8. Wang GQ, Pu J, Yu XQ, Xia YJ, Ai LZ. Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *J Dairy Sci*. 2020;103(4):3066–75.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685>
  9. Jena S, Krishna Kumar NS, Aksan A, Suryanarayanan R. Stability of lyophilized albumin formulations: role of excipient crystallinity and molecular mobility. *Int J Pharm*. 2019;569:118568.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118568>
  10. Piszkiwicz S, Pielak GJ. Protecting enzymes from stress-induced inactivation. *Biochemistry*. 2019;58(37):3825–33.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00675>
  11. Rockinger U, Funk M, Winter G. Current approaches of preservation of cells during (freeze-) drying. *J Pharm Sci*. 2021;110(8):2873–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.018>
  12. Horn J, Friess W. Detection of collapse and crystallization of saccharide, protein, and mannitol formulations by optical fibers in lyophilization. *Front Chem*. 2018;6:4.  
<https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00004>
  13. Gaidhani KA, Harwalkar M, Bhambere D, Nirgude PS. Lyophilization/freeze drying – a review. *WJPR*. 2015;4(8):516–43.
  14. Chang LL, Shepherd D, Sun J, Tang XC, Pikal MJ. Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: Implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state. *J Pharm Sci*. 2005;94(7):1445–55.  
<https://doi.org/10.1002/jps.20363>
  15. 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;100(14):6239–49.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7359-1>
  16. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods*. 2006;66(2):183–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
  17. Rey L, May JC, eds. *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. 3rd ed. CRC Press; 2010.  
<https://doi.org/10.3109/9781439825761>
  18. Сакаева ИВ, Бунятян НД, Ковалева ЕЛ, Саканян ЕИ, Митькина ЛИ, Прокопов ИА и др. Основные подходы к изучению стабильности лекарственных средств: отечественный и международный опыт. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(3):8–11.  
Sakaeva IV, Bunyatyan ND, Kovaleva EL, Sakanyan EI, Mitkina LI, Prokopov IA, et al. Basic approaches drug stability studies: domestic and international experience. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;(3):8–11. (In Russ.).  
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2013-0-3>
  19. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Appl Microbiol*. 2008;54(1):9–24.  
<https://doi.org/10.2323/jgam.54.9>
  20. Patel SM, Nail SL, Pikal MJ, Geidobler R, Winter G, Hawe A, et al. Lyophilized drug product cake appearance: what is acceptable? *J Pharm Sci*. 2017;106(7):1706–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.014>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Вклад распределен следующим образом: **А.А. Воробаев** – формирование цели и задач исследований, выполнение всех экспериментальных исследований, анализ и интерпретация результатов, сбор, анализ и обобщение данных литературы, написание текста рукописи; **О.В. Фадейкина** – обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка результатов, написание текста рукописи; **Т.Н. Ермолаева** – проведение всех экспериментальных исследований, руководство при проведении лиофильного высушивания; **Д.С. Давыдов** –

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The contributions were as follows. **A.A. Voropaev** formulated the aim and objectives of the study; carried out all the experiments; analysed and interpreted the study results; collected, analysed, and summarised literature data; and drafted the manuscript. **O.V. Fadeikina** summarised experimental data, analysed and interpreted the results, carried out statistical processing of the results; and drafted the manuscript. **T.N. Ermolaeva** carried out all the experiments and supervised the freeze-drying process. **D.S. Davydov** provided advisory assistance in assessing the state of the art and

консультативная помощь при оценке состояния проблемы и анализе результатов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

analysing the results and approved the final version of the manuscript for publication.

---

## Об авторах / Authors

**Воропаев Андрей Андреевич**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>  
[voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

**Фадейкина Ольга Васильевна**, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>  
[fadeikina@expmed.ru](mailto:fadeikina@expmed.ru)

**Ермолаева Татьяна Николаевна**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0960-7194>  
[ermolaeva@expmed.ru](mailto:ermolaeva@expmed.ru)

**Давыдов Дмитрий Сергеевич**, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>  
[davydov@expmed.ru](mailto:davydov@expmed.ru)

**Andrey A. Voropaev**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>  
[voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

**Olga V. Fadeikina**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>  
[fadeikina@expmed.ru](mailto:fadeikina@expmed.ru)

**Tatyana N. Ermolaeva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0960-7194>  
[ermolaeva@expmed.ru](mailto:ermolaeva@expmed.ru)

**Dmitry S. Davydov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>  
[davydov@expmed.ru](mailto:davydov@expmed.ru)

*Поступила 01.11.2022*

*После доработки 03.08.2023*

*Принята к публикации 13.09.2023*

*Received 1 November 2023*

*Revised 3 August 2023*

*Accepted 13 September 2023*