

# Влияние режимов охлаждения и консервирующих сред, содержащих альгинат натрия, на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

В.Л. ПОНОМАРЕВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Freezing Regimens and Preserving Media Containing Sodium Alginate on *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cell Viability

V.L. PONOMAREVA

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

Одной из актуальных проблем современной биотехнологии является использование в производственном процессе иммобилизованных клеток микроорганизмов, являющихся продуцентами ферментов, гормонов, витаминов и других активных соединений.

Иммобилизация микроорганизмов путем их включения в структуру гелей позволяет достичь высокой плотности клеток в биореакторе, что увеличивает продуктивность биотехнологических процессов. Кроме того, микробные клетки, иммобилизованные в матриксе гидрогеля, в определенной степени защищены от таких неблагоприятных воздействий окружающей среды, как изменение pH и температуры, воздействие органических растворителей и токсических соединений в высокой концентрации, а также от влияния чужеродной микрофлоры. Это обеспечивает рентабельность любого производственного процесса.

Поэтому среди актуальных научных и практических задач большое значение на современном этапе имеет криоконсервирование культур микроорганизмов в иммобилизованном состоянии, обеспечивающее сохранение максимального количества жизнеспособных клеток с исходными гено- и фенотипическими свойствами.

Целью исследования было изучение влияния защитных сред на жизнеспособность клеток дрожжей при охлаждении с разными скоростями.

Объектом исследования были дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (раса получена из РНИИ хлебопекарной промышленности, Санкт-Петербург). Дрожжи культивировали в неохмеленном пивном сусле при 30°C с аэрацией до стационарной фазы роста. В качестве защитных сред использовали: дистиллированную воду; 1% раствор альгината натрия; 5% ДМСО; 1% раствор альгината натрия с добавлением 5% ДМСО. Исследуемые образцы охлаждали со скоростями 1; 5; 10; 15°C/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот. Отогревали образцы на водяной бане при температуре 37°C. Жизнеспособность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* оценивали чашечным методом Коха.

Было установлено, что на сохранность клеток *Saccharomyces cerevisiae* в процессе криоконсервирования влияют режимы охлаждения и состав среды криоконсервирования. Во всех средах консервирования как без защитных компонентов, так и с добавлением криопротектора наиболее высокие результаты получены при охлаждении со скоростью 1°C/мин. При повышении скорости охлаждения количество жизнеспособных клеток достоверно уменьшалось. Впервые показан выраженный криозащитный эффект при замораживании дрожжей в альгинатном геле. При замораживании со скоростью 1°C/мин в 1% геле альгината натрия сохранялись жизнеспособными 90,8% клеток; в ДМСО – 87,1%; в 1% альгинате натрия с добавлением 5% ДМСО – 86,1%.

One of the actual tasks of current biotechnology is application of immobilized cells of microorganisms, being producers of enzymes, hormones, vitamins and other active compounds in the production process.

Immobilization of microorganisms by means of their introduction into gel structure enables to achieve a high cell density in bioreactor, increasing productivity of biotechnological processes. Moreover, microbial cells, immobilized in hydrogel matrix are to some extent protected against adverse environmental effects such as pH and temperature changes, the action of highly concentrated organic solvents and toxic substances as well of xenogenic microflora. This provides efficiency of any production stage.

Therefore among actual scientific and practical tasks the cryopreservation of microorganism cultures in immobilized state, providing preservation of maximum number of viable cells with initial gene- and phenotype properties is nowadays of a great value.

The research aim was to study the effect of protective media on yeast cell viability when cooling under different rates.

The research objects were yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* (strain was obtained from Russian Institute for Scientific Research of Baking Industry, Saint Petersburg). The yeast were cultured in unhopped wort syrup at 30°C with aeration to stationary growth phase. Distilled water, 1% sodium alginate solution, 5% DMSO solution, 1% sodium alginate solution supplemented with 5% DMSO were used as protective media. The studied samples were cooled with the rates of 1; 5; 10; 15°C/min down to -40°C with further plunging into liquid nitrogen. The samples were thawed on water bath at 37°C. Viability of yeast *S. cerevisiae* was evaluated by Koch's plate method.

It was established that cooling regimens and cryopreservation medium composition affected the integrity of *S. cerevisiae* cells during cryopreservation. In all the cryopreservation media both without protective components and supplemented with cryoprotectant the highest results were obtained when cooling with the rate of 1°C/min. A number of viable cells significantly decreased when increasing the cooling rate. For the first time an expressed cryoprotective effect was shown when yeast were frozen in alginate gel. After freezing with the rate of 1°C/min in 1% sodium alginate gel 90.8% of cells were viable; when using DMSO we observed 87.1% viability; and application of 1% sodium alginate supplemented with 5% DMSO resulted in 86.1% viability.