

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕЖИМОВ ОХЛАЖДЕНИЯ И ЗАЩИТНЫХ СРЕД,  
СОДЕРЖАЩИХ АЛЬГИНАТ НАТРИЯ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК  
ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*****Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)**

Исследования проводились в рамках научной темы: «Дослідження механізмів криоушкодженя і криозахисту іммобілізованих клітин з метою підвищення їх збереженості при криоконсервуванні та ліофілізації»; государственный регистрационный номер темы: 0110U000404.

**Вступление.** Одной из актуальных проблем современной биотехнологии является использование в производственном процессе иммобилизованных клеток микроорганизмов, являющихся продуцентами ферментов, гормонов, витаминов и других активных соединений [1]. Применение гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток дает возможность создания эффективных биотехнологических процессов, в которых отпадают стадии выделения, очистки и иммобилизации продуктов биосинтеза. Кроме того, микробные клетки, иммобилизованные в матриксе гидрогеля, защищены от неблагоприятных воздействий окружающей среды и от влияния чужеродной микрофлоры [5]. Это значительно повышает рентабельность и надежность производственных процессов [3]. В ряде биотехнологических производств существует необходимость в долгосрочном хранении микробных клеток. Наиболее эффективным методом долгосрочного хранения микроорганизмов является криоконсервирование [4]. Существующие методики криоконсервирования не всегда удобны для этапов биотехнологических процессов. Теоретические расчеты позволяют предположить, что криоконсервирование иммобилизованных клеток будет иметь ряд преимуществ. Технология криоконсервирования микробных клеток, иммобилизованных в различных носителях, находится в стадии разработки. Одним из наиболее перспективных носителей является гель альгината натрия. Положительными качествами этого геля является то, что он нетоксичен, обладает достаточной механической прочностью, хорошими диффузными качествами, способностью к растворению при определенных значениях pH и температуры, в растворе ЭДТА. Это позволяет выделять жизнеспособные клетки из геля. Исследования по изучению влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, иммобилизованных в альгинатном геле, не проводились [5].

**Целью** представленного исследования было изучение влияния различных режимов охлаждения и защитных сред, содержащих альгинат натрия, на жизнеспособность клеток дрожжей.

**Объект и методы исследования.** Объектом исследования были дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (раса получена из РНИИ хлебопекарской промышленности, Санкт – Петербург ).

Дрожжи культивировали в неохмеленном пивном сусле (8°Б), при +30°С с аэрацией. В экспериментах использовали клетки дрожжей, находящиеся в стационарной фазе роста. Концентрация клеток в образцах составляла 2,54108 КОЕ/мл. В качестве защитных сред использовали: 1 группа – дистиллированная вода; 2 группа – 1% водный раствор альгината натрия; 3 группа – 5% водный раствор ДМСО; 4 группа – водный раствор 1% альгината натрия с добавлением 5% ДМСО. Суспензии дрожжевых клеток в этих средах вносили по 1 мл в криопробирки фирмы «Nunc» (США) объемом 1,8 мл.

Исследуемые образцы охлаждали со скоростями: 1; 5; 10; 15°С/мин до -40°С с последующим погружением в жидкий азот, часть образцов замораживали путем погружения криопробирок в жидкий азот. Криоконсервирование дрожжей осуществляли на программном замораживателе «Cryoson» (Германия). Образцы отогревали на водяной бане при температуре 37°С. Жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae* оценивали чашечным методом Коха [2].

**Результаты исследований и их обсуждение.** В ходе исследований было установлено, что на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* в процессе криоконсервирования влияют как состав среды криоконсервирования, так и режимы охлаждения.

Во всех средах замораживания, как без защитных компонентов так и с добавлением криопротектора, наиболее высокие результаты получены при охлаждении со скоростью 1°С/мин. Так, показатели жизнеспособности в образцах, замороженных с этой скоростью, составляли соответственно: 73,1%– в дистиллированной воде; 90,8– в 1% растворе альгината натрия; 87,1– в 5% растворе ДМСО и 86,1%.– в 1% растворе альгината натрия с добавлением 5% ДМСО (**рис. 1**).

При повышении скорости охлаждения количество жизнеспособных клеток достоверно уменьшалось. При замораживании со скоростью 5°С/мин выживаемость клеток соответственно по группам составляла: 59,3; 74,5; 65,1; 76,4% (**рис.2,3,4,5**). При замораживании со скоростью 10°С/мин – 24,5; 38,1; 18,4; 21,6%. При замораживании со скоростью 15°С/мин – 8,6; 16,1; 9,3; 7,9%. Минимальная выживаемость наблюдалась в образцах погруженных в жидкий азот. Количество жизнеспособных клеток

составляло соответственно по группам консервирующих сред 0,3; 1,8; 0,7; 0,6%.

При исследовании влияния состава консервирующих сред, наиболее низкую жизнеспособность отмечали при замораживании клеток, ресуспендированных в дистиллированной воде (рис. 2).

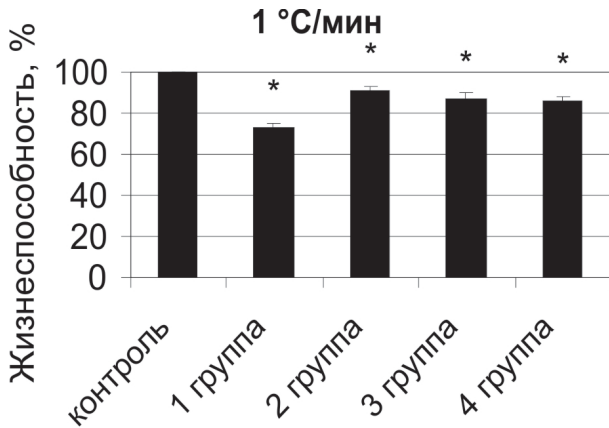


Рис. 1 Влияние защитных сред на жизнеспособность клеток *Saccharomyces cerevisiae*, охлажденных со скоростью 1°C/мин.

Примечание: \* – различия с контрольной группой достоверные,  $p < 0,05$ .

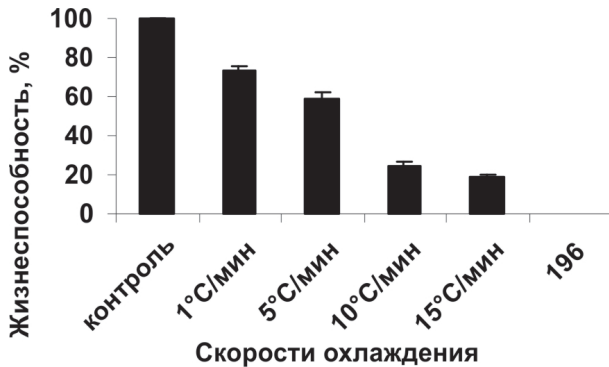


Рис. 2. Жизнеспособность клеток дрожжей *S. cerevisiae*, замороженных в дист. воде с различными скоростями охлаждения.

При этом установлена аналогичная другим консервирующим средам зависимость жизнеспособности от режимов охлаждения.

При замораживании дрожжей в 1% – ом растворе альгината натрия со скоростями 1, 5, 10, 150/мин, и при погружении в жидкий азот количество жизнеспособных клеток составляло соответственно: 90,8; 74,5; 38,1; 16,1; 1,8% (рис. 3).

При замораживании клеток в 5% ДМСО и в 1% растворе альгината натрия с добавлением 5% ДМСО, количество жизнеспособных клеток также уменьшалось по мере повышения скорости охлаждения, но достоверно не отличалось от показателя жизнеспособности клеток в образцах замороженных в 1% растворе альгината натрия (рис. 4,5).

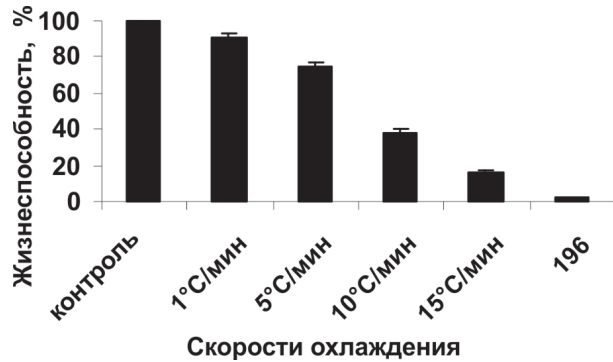


Рис. 3. Жизнеспособность клеток дрожжей *S. cerevisiae*, замороженных в 1% растворе альгината натрия.

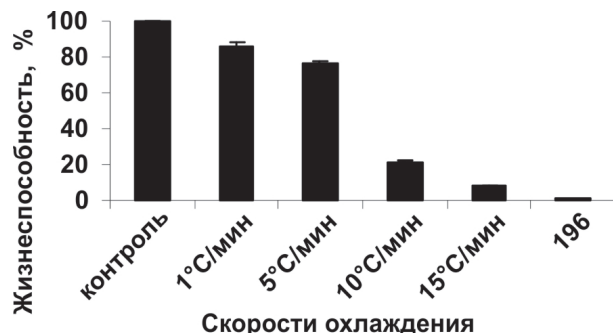


Рис. 4. Жизнеспособность клеток дрожжей *S. cerevisiae*, замороженных в 5% растворе ДМСО

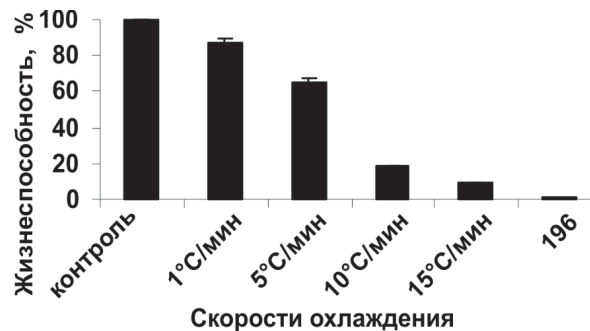


Рис. 5. Жизнеспособность клеток дрожжей *S. cerevisiae*, замороженных в растворе 5% ДМСО и 1% альгината натрия

### Выводы.

1. На жизнеспособность клеток *Saccharomyces cerevisiae* в процессе криоконсервирования оказывают влияния скорость охлаждения и состав среды консервирования. Максимальные показатели жизнеспособности во всех исследованных средах консервирования обеспечивало замораживание до -40°C со скоростью 1°C/мин с последующим погружением в жидкий азот.

2. Впервые показаны высокие криопротективные свойства раствора альгината натрия. Жизнеспособность клеток *Saccharomyces cerevisiae* при замораживании с различными скоростями охлаждения в защитных средах, содержащих альгинат натрия, достоверно не отличалось от жизнеспособности клеток замороженных в 5% водном растворе ДМСО.

3. Полученные результаты позволяют рекомендовать альгинат натрия в качестве носителя криоконсервированных иммобилизованных клеток при последующем использовании их в биотехнологических производствах.

**Перспективы дальнейших исследований.** Исходя из полученных экспериментальных данных

о криопротективных свойствах альгината натрия, следует продолжить начатые исследования о целесообразности использования его в качестве носителя иммобилизованных промышленных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при необходимости их криоконсервирования.

### Список литературы

1. Вудворд Дж. Иммобилизованные клетки и ферменты / Дж. Вудворд // М: Мир, 1988. – 215с.
2. Егорова Н.С. Практикум по микробиологии / Н.С. Егорова // М: МГУ, 1976. – 307с.
3. Ефременко Е.Н. Влияние длительного хранения клеток микроорганизмов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, на их выживаемость и биосинтез целебных метаболитов / Е.Н. Ефременко, Н.Ю. Татарина // Микробиология. –2007.–Т.76, №3. – С 383–389.
4. Пушкарь Н.С. Актуальные проблемы криобиологии / Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус // К: Наукова думка, 1981. – 608 с.
5. Синицын А.П. Иммобилизованные клетки микроорганизмов / А.П. Синицын, Е.И. Райнина, В.И.Лозинский, С.Д. Славов // М: Изд-во МГУ, 1994. –288с.

УДК 582.282.232:615.014.41

#### **ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕЖИМОВ ОХЛАЖДЕНИЯ И ЗАЩИТНЫХ СРЕД, СОДЕРЖАЩИХ АЛЬГИНАТ НАТРИЯ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Пономарева В. Л., Высеканцев И. П., Гурина Т. М., Онасенко Е.С.**

**Резюме.** Проведено сравнительное изучение влияния режимов охлаждения и защитных сред, содержащих альгинатный гель, на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Установлено, что лучший показатель жизнеспособности был в образцах замороженных с медленной скоростью охлаждения (1°С/мин). Показано, что жизнеспособность клеток *Saccharomyces cerevisiae* при замораживании с различными скоростями охлаждения в защитных средах, содержащих альгинат натрия, достоверно не отличалась от жизнеспособности клеток, замороженных в 5% растворе ДМСО, что позволяет сделать вывод о криопротективных свойствах альгината натрия.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, иммобилизация, альгинат натрия, дрожжи.

УДК 582.282.232:615.014.41

#### **ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ РЕЖИМІВ ОХОЛОДЖЕННЯ І ЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ, ЯКІ ВМІЩУЮТЬ АЛЬГІНАТНИЙ ГЕЛЬ, НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Пономарьова В. Л., Висеканцев І. П., Гурина Т. М., Онасенко О.С.**

**Резюме.** Проведено порівняльне вивчення режимів охолодження і захисних середовищ, які вміщують альгінатний гель, на життєздатність клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Встановлено, що найкращий показник життєздатності був у зразках заморожених з повільною швидкістю охолодження (1°С/хв). Показано, що життєздатність клітин *Saccharomyces cerevisiae* при заморожуванні з різними швидкостями охолодження у захисних середовищах, які вміщують альгінат натрію, вірогідно не відрізняються від життєздатності клітин, заморожених у 5% розчині ДМСО, що дозволяє зробити висновок про криопротективні властивості альгінату натрію.

**Ключові слова:** криоконсервування, іммобілізація, альгінат натрію, дріжджі.

UDC 582.282.232: 615.014.41

#### **The Study Of The Effect Of Cooling Regimens And Protective Media, Containing Sodium Alginate, On The Viability Of Yeast Cells *Saccharomyces Cerevisiae***

**Ponomareva V.L., Vysekantsev I.P., Gurina T.M., Onasenko E.S.**

**Summary.** A comparative study on the effect of cooling regimens and protective media, containing alginate gel on the viability of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* was held. It was found out that the best indicator of the viability was in samples, which were frozen with a slow cooling rate (1°С/min). It was shown that the viability of cells *Saccharomyces cerevisiae* during freezing with different cooling rates in protective media, containing sodium alginate, was not significantly different from the viability of cells frozen in 5% DMSO. This allows us to conclude that the sodium alginate has cryoprotective properties during cryopreservation.

**Key words:** cryopreservation, immobilization, sodium alginate, yeasts.

Стаття надійшла 29.07.2011 р.