

БИОЛОГИЯ

© В. Л. Пономарева, И. П. Высеканцев, Т. М. Гурина, Е. С. Онасенко, Пишко О. В.

УДК 582.282.232:615.014.41

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

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В АЛЬГИНАТНОМ ГЕЛЕ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

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

Вступление. Биотехнологические процессы являются ярким примером высоких технологий, с которыми связывают перспективы развития многих производств. В настоящее время все более пристальное внимание специалистов в нашей стране и за рубежом привлекают вопросы криоконсервирования клеток в иммобилизованном состоянии. Очевидно, это связано с широким применением их во многих биотехнологических процессах [1]. Криоконсервирование иммобилизованных клеток следует рассматривать как процесс обеспечения сохранности, стабильности и высокой биологической доступности биотехнологического продукта. В процессе криоконсервирования иммобилизованных клеток необходимо учитывать то, что протоколы консервирования должны обеспечивать сохранение не только морфо-функциональных свойств клеток, но и структурной целостности носителя, механическое повреждение которого обязательно приводит к дополнительной гибели клеток [4]. Технологии, разработанные для криоконсервирования клеточных суспензий, могут оказаться не эффективными для иммобилизованных клеток.

На современном этапе проводят исследования по разработке эффективных условий криоконсервирования (режимы охлаждения, состав консервирующих сред, состав и концентрация геля – носителя) и изучению возможности хранения при умеренно низких температурах микробных клеток, иммобилизованных в различных гелях. Особый интерес представляет иммобилизация клеток в альгинатные гели [6,9]. Включение в альгинатные гели относится к мягким методам иммобилизации – клетки остаются живыми и могут осуществлять ферментативные процессы [2]. Механическая прочность гранул или волокон из альгината натрия позволяет их использовать в непрерывных и периодических технологических процессах. Во многих случаях включение клеток в альгинат натрия приводит к лучшим результатам в сравнении не только с ПААГ (полиакриламидный гель), но и с каррагинаном и

другими гелями [2,10]. Криоконсервирование клеток микроорганизмов, иммобилизованных в альгинатных гранулах, представляет большой интерес, как для теоретических исследований, так и для практического использования их в промышленном производстве (виноделии, фармацевтической, пищевой промышленности и т.д.) как в качестве продуктов, так и для получения конечных продуктов.

Целью представленного исследования было изучение влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, иммобилизованных в альгинатном геле.

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

Дрожжи культивировали по стандартной методике [3] в неохмеленном пивном сусле (8°Б), при 30°С с аэрацией, до начала стационарной фазы роста. Концентрация клеток в образцах составляла $2,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Эксперименты проводили с четырьмя группами образцов:

1 группа – суспензия клеток в дистиллированной воде; 2 группа – суспензия клеток в дистиллированной воде с последующей иммобилизацией;

3 группа – суспензия клеток в 5% водном растворе диметилсульфоксида (ДМСО);

4 группа – суспензия клеток в 5% водном растворе ДМСО с последующей иммобилизацией.

Иммобилизацию клеток в альгинатном геле проводили по методу [8]. После иммобилизации были получены гранулы правильной сферической формы со следующими характеристиками: диаметр гранул 1000-1500 мкм, концентрация клеток внутри гранулы не менее 10^8 КОЕ/мл, концентрация альгината 1%. Количество образующихся гранул в зависимости от их размера, в заданных условиях описывалось кривой Гаусса, и средний размер их составлял 1200 мкм [5]. Образцы замораживали в криопробирках фирмы «Nunc» (США) с рабочим объемом 1,8 мл со скоростями: 1; 5; 10 и 15°С/мин до -40°С с последующим погружением в жидкий азот, часть образцов замораживали путем погружения криопробирок в жидкий азот [7]. Криоконсервирование дрожжей осуществляли на программном замораживателе «Cryoson» (Германия). Отогревали образцы на водяной бане при температуре 37°С. Жизнеспособность

дрожжей *S. cerevisiae* оценивали «чашечным» методом Коха [3]. Са – альгинатные гранулы дезинтегрировали в 4% водном растворе этилендиаминтетраацетате (ЭДТА). Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы *Excel*.

Результаты исследований и их обсуждение.

При замораживании суспензий клеток *S. cerevisiae* в дистиллированной воде и в 5% растворе ДМСО было установлено, что на сохранность клеток дрожжей оказывает достоверно значимое влияние и скорость охлаждения, и наличие криопротектора ДМСО в консервирующей среде. Наиболее высокие показатели жизнеспособности клеток наблюдали при замораживании клеточных суспензий со скоростью 1°С/мин (рис. 1, 3). Защитное действие ДМСО было выраженным при замораживании со скоростями 1-10°С/мин. Количество жизнеспособных клеток, замороженных под защитой ДМСО с указанными скоростями охлаждения, составляло соответственно 56,8; 50,5; 23,6% от контроля, а в образцах, замороженных без ДМСО – 30,5; 30,1; 17,0%.

При замораживании дрожжей, иммобилизованных в альгинатном геле, показатель жизнеспособности клеток был более высоким, чем при замораживании клеточных суспензий, а влияние скорости охлаждения в диапазоне медленных скоростей снизилось. Таким образом, при иммобилизации клеток в альгинатном геле повреждающее действие физико-химических факторов, сопровождающих процессы кристаллизации воды, менее выражено. После замораживания со скоростями 1, 5, 10, 15°С/мин сохранялись жизнеспособными соответственно 96,6; 93,3; 82,5; 56,1% клеток (рис. 2). Предварительное введение в клетки дрожжей ДМСО с последующей иммобилизацией в альгинатном геле не оказывало достоверного влияния на жизнеспособность клеток при замораживании по указанным выше режимам. В четвертой группе показатель жизнеспособности соответственно составлял 90,3; 81,9; 77,1; 53,9% клеток (рис. 4). Результаты исследования приведены на (рис. 1 - 4).

Применение высоких скоростей охлаждения, даже в присутствии 5% водного раствора криопротектора ДМСО приводило к значительной гибели

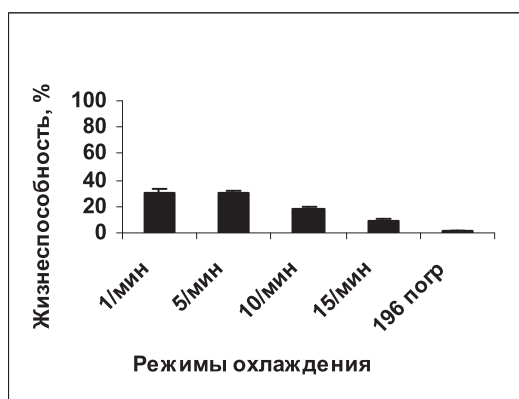


Рис. 1. Жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* в суспензии после охлаждения по различным режимам.

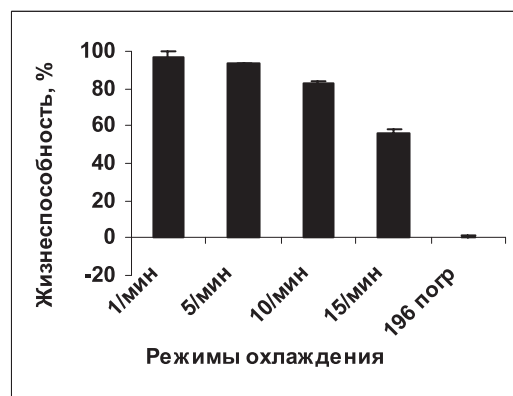


Рис.2. Жизнеспособность, иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* после охлаждения по различным режимам.

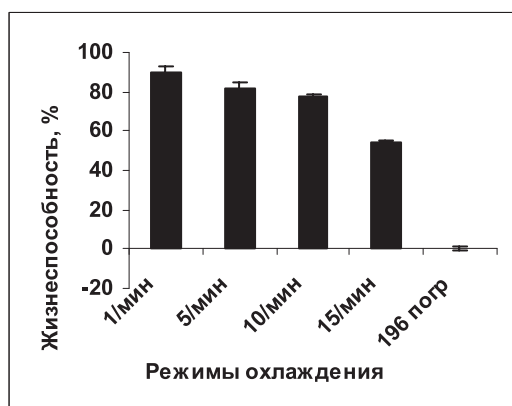


Рис.3. Жизнеспособность клеток *S. cerevisiae*, суспендированных в 5% растворе ДМСО, после охлаждения по различным режимам.

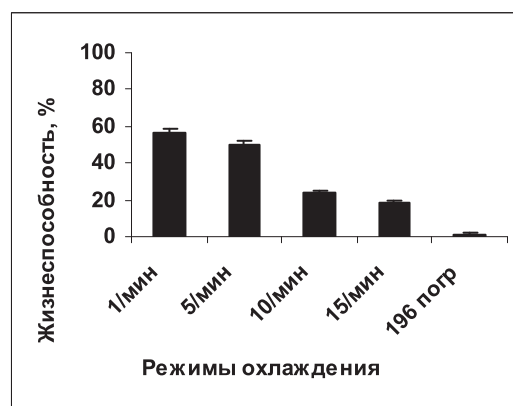


Рис.4. Влияние режимов охлаждения на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae*, иммобилизованных в альгинатном геле после инкубирования в 5% растворе ДМСО.

клеток дрожжей *S. cerevisiae*. Микроскопическое исследование гранул показало, что при высоких скоростях охлаждения происходит нарушение целостности структуры альгинатного геля. Визуально это проявляется в потере им прозрачности. Количество жизнеспособных клеток при прямом погружении в азот соответственно по группам составляло: 1 группа – 1,22 %; 2 группа – 0,59 %; 3 группа – 1,55%; 4 группа – 0,65%. Показатель жизнеспособности в экспериментальных группах иммобилизованных клеток (2 и 4 группы) был ниже, чем в группах со свободными клетками в суспензии (1 и 3 группы). Возможно, что нарушение структуры альгинатного геля оказывает дополнительное повреждающее действие на клетки дрожжей *S. cerevisiae* при замораживании с высокими скоростями охлаждения.

Таким образом, в ходе настоящей работы было достоверно установлено влияние иммобилизации на жизнеспособность клеток в процессе криоконсервирования. Полученные результаты показывают, что альгинатный гель при замораживании проявляет свойства, скорее всего экстрацеллюлярного криопротектора, и, возможно, матрицы, стабилизирующей клеточную стенку и изменяющей процессы кристаллообразования. За счет этого уменьшается выраженность физико-химических факторов, приводящих к необратимым повреждениям клеток. Интервал скоростей охлаждения, при которых процессы обезвоживания клеток не достигают критических значений, увеличивается от оптимальной для клеточных суспензий скорости (1°C/мин) до 10°C/мин. При охлаждении со скоростью 15°C/мин интенсивность обезвоживания клеток в геле снижается и иницируется процесс внутриклеточного кристаллообразования. Предварительное введение в клетки ДМСО в концентрации 5% дополнительного защитного эффекта не оказывает. Одной из причин этого может быть недостаточная для влияния на процесс зародышеобразования и формирования внутриклеточных кристаллов льда концентрация криопротектора. При охлаждении погружением в жидкий азот процессы внутриклеточного кристаллообразования для клеток *S. cerevisiae* максимально выражены, что привело к наибольшему количеству летально поврежденных клеток.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности исследований по криоконсервированию клеток, иммобилизованных в гелях. Такие исследования расширяют наши представления о механизмах криоповреждений и криозащиты

клеток, и дают возможность долгосрочного консервирования штаммов микроорганизмов – продуцентов для биотехнологических производств, а также коммерческих форм препаратов и продуктов.

Выводы.

1. Экспериментально показаны высокие криопротективные свойства геля альгината натрия при замораживании иммобилизованных в нем клеток *S. cerevisiae*. Криопротективное действие геля альгината натрия максимально выражено при медленных скоростях охлаждения (1 – 10°C/мин).

2. В отличие от клеточных суспензий предварительное введение в клетки *S. cerevisiae* эндодцеллюлярного криопротектора ДМСО не оказывает дополнительного защитного эффекта при последующей иммобилизации клеток в альгинатном геле и замораживании.

3. При замораживании суспензий клеток *S. cerevisiae* на жизнеспособность клеток оказывает существенное влияние скорость охлаждения и наличие в консервирующей среде криопротектора ДМСО. Криопротективное действие 5% раствора ДМСО проявляется при скоростях охлаждения 1 – 10°C/мин.

4. Охлаждение со скоростью 1°C/мин обеспечивает сохранность клеток, суспендированных в 5% растворе ДМСО или иммобилизованных в геле альгината натрия, на исходном уровне.

5. Использование высоких скоростей охлаждения при криоконсервировании иммобилизованных в альгинатные гранулы клеток *S. cerevisiae* приводит к значительной гибели клеток. Более низкие по сравнению с клеточными суспензиями показатели жизнеспособности иммобилизованных клеток, наиболее вероятно связаны с повреждениями гелевой матрицы.

6. Полученные результаты позволяют рекомендовать альгинатный гель в качестве носителя криоконсервированных иммобилизованных клеток, при последующем использовании их в биотехнологических производствах в качестве гетерогенных биокатализаторов.

Перспективы дальнейших исследований.

Полученные результаты исследований помогут в разработке протоколов и технологий криоконсервирования иммобилизованных в гелевых носителях клеток микроорганизмов с последующим их применением в биотехнологических производствах, медицине, ветеринарии, пищевой промышленности и защите окружающей среды.

Список литературы

1. Вудворд Дж. Иммобилизованные клетки и ферменты / Дж. Вудворд // М: Мир, 1988. – 215 с.
2. Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Максимов А. Ю. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты / В.А Демаков, Ю.Г. Максимова, А. Ю. Максимов // Биотехнология. – 2008, №2. – С 30 –45.
3. Егорова Н.С. Практикум по микробиологии / Н.С. Егорова // М. : МГУ, 1976. – 307 с.
4. Правдюк А.И. Дифференцировка криоконсервированных стромальных клеток костного мозга в альгинатных микроносителях. / А.И. Правдюк // Проблемы криобиологии. – 2008.– Т.18, №1. – С. 134-137.
5. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А.Е. Платонов // М. : РАМН, 2000. – 52 с.

6. Сеницын А.П. Имобилизованные клетки микроорганизмов. / А.П. Сеницын, Е.И. Райнина, В.И. Лозинский, С.Д. Спасов // М. : Изд-во МГУ, 1994. – 288 с.
7. Сакун О.В. Теоритична оцінка значення оптимальної з погляду двохфакторної теорії крипошкодження швидкості охолодження при лінійних режимах заморожування клітинної суспензії / О.В. Сакун, О.І. Гордієнко // Біофізичний Вісник – 2009. – Вип. 22 (1). – С. 63 –68.
8. Bucke C. Methods in Enzymol., 135B, 1987, 175 –189.
9. Ghidoni I. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine / I. Ghidoni , T. Chlapanidas, M. Bucco // Cytotechnology. – 2008. – Vol. 58, №1. – P. 49 –56.
10. Nedovic V. Applications of cell immobilization biotechnology / V. Nedovic, R. Willaert // Springer Pbs. Ser. : Focus on biotechnology. – 2005. - V. 8 B. – 573 p.

УДК 582.282.232:615.014.41

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В АЛЬГИНАТНОМ ГЕЛЕ

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

Резюме. Проведено изучение влияния иммобилизации на жизнеспособность клеток *S.cerevisiae* в процессе охлаждения с различными режимами замораживания. Установлено, что криопротективные свойства альгината натрия при иммобилизации клеток, проявляются только при низких скоростях охлаждения. Показано применение альгинатного геля в качестве носителя криоконсервированных клеток дрожжей *S.cerevisiae*.

Ключевые слова: иммобилизация, альгинатные гранулы, криоконсервирование, дрожжи.

УДК 582.282.232:615.014.41

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КРИОКОНСЕРВУВАННЯ НА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ КЛІТИН ДРІЖДЖІВ *Saccharomyces cerevisiae*, ІМОБІЛІЗОВАНИХ В АЛЬГІНАТНОМУ ГЕЛІ

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

Резюме. Проведено вивчення впливу іммобілізації на життєздатність клітин *S.cerevisiae* в процесі охолодження із різними режимами заморожування. Встановлено що крипротективні властивості альгинату натрію при іммобілізації клітин, проявляються тільки при низьких швидкостях охолодження. Показано застосування альгинатного гелю як носія криоконсервованих клітин дріжджів *S.cerevisiae*.

Ключові слова: іммобілізація, альгинатні гранули, криоконсервування, дріжджі.

UDC 582.282.232: 615.014.41

The Study Of Cryopreservation Conditions Effects On Cell *Saccharomyces cerevisiae* Viability, Immobilized In Alginate Gel

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

Summary. It has been investigated the influence of immobilization on cell *S.cerevisiae* viability in the cooling process with different modes of freezing. It has been established that cryoprotective properties of sodium alginate in immobilization of cells, appear only at low speeds. It has been shown the use of alginate gel as a carrier of cryopreserved yeast cells *S.cerevisiae*.

Key words: immobilization, alginate microbeads, cryopreservation, yeasts.

Стаття надійшла 30.03.2012 р.

Рецензент – проф. Дубінін С.І.