

Лиофилизация дрожжевых грибов рода *Saccharomyces*

А.В. КАНТЕРОВА

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

Freeze-Drying of *Saccharomyces* Yeast Fungi

A.V. KANTEROVA

Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Для хранения дрожжевых грибов в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов используются методы лиофилизации, криоконсервирования и субкультивирования на агаризованных средах под слоем вазелинового масла.

Известно, что микроорганизмы наиболее устойчивы к замораживанию и высушиванию в стационарной фазе роста, однако, по литературным данным, крупноклеточные дрожжи рода *Saccharomyces* плохо переносят лиофилизацию, поэтому сублимационное высушивание дрожжевых культур *Saccharomyces cerevisiae* БИМ Y-56, БИМ Y-177, БИМ Y-178 и БИМ Y-182 проводили как в стационарной фазе роста, так и на стадии спорообразования. Клетки в стационарной фазе роста получали после 3-х суток культивирования на сусло-агаре. Для получения спорующей культуры первоначально штаммы сахаромисетов выращивали в течение 2-х суток при температуре 25–26°C на среде следующего состава, г/л: глюкоза – 10,0; пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 3,0; агар – 20,0 и сусло (15% сухих веществ) – 1 л. Выросшие 2-х суточные культуры дрожжей пересеивали на косяки со средой, используемой для индукции аскоспорообразования (среда Городковой), г/л: глюкоза – 1,0; пептон – 10,0; NaCl – 5,0; агар – 20,0; вода – 1 л. Затем сахаромисеты выращивали при температуре 25°C в течение 38 суток до активного образования аскоспор. Наблюдалось образование спор у 60–80% клеток. Лиофилизацию культур производили на сублимационной установке “MODULYO-4K” английской фирмы Edwards. Первичная сушка проходила при температуре –55°C и глубине вакуума 6×10^{-2} mbar в течение 4-х часов; досушивание на гребенке аппарата вторичной сушки при комнатной температуре под вакуумом 8×10^{-2} mbar – 18 часов. В качестве протектора использовали сахарозо-желатиновую среду (10%-й раствор сахарозы с 1,5% желатины и 0,1% агар-агара). Количество живых клеток дрожжей определяли методом предельных разведений в 1 мл суспензии перед и после лиофилизации, а также через 1 и 2 года, 5 и 8 лет хранения культур.

Установлено, что количество жизнеспособных клеток у всех штаммов сахаромисетов, лиофилизированных на стадии спорообразования, было значительно выше по сравнению с культурами, находившимися в стационарной фазе роста, независимо от сроков хранения как через сутки после сублимационного высушивания, так и после 8 лет хранения.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности лиофилизации дрожжей рода *Saccharomyces* в стадии спорообразования. Консервирование их в таком состоянии обеспечивает высокую степень выживаемости и не изменяет физиологические и биохимические свойства культур.

The methods of freeze-drying, cryopreservation and subculturing on agarised media under paraffin oil layer are used to store the yeast fungi in Collection of non-pathogenic microorganisms of Belarus.

Microorganisms are known to be the most resistant to freezing and drying in a stationary growth phase, but as reported, the magnocellular *Saccharomyces* yeast endure poorly the freeze-drying, therefore a freeze-drying of *Saccharomyces cerevisiae* BIM Y-56, BIM Y-177, BIM Y-178 and BIM Y-182 yeast cultures was carried-out both in a stationary growth and spore formation phases. Cells under stationary growth phase were derived after 3 days of culturing on wort agar. To obtain a sporulating culture the *Saccharomyces* strains were initially cultured within 2 days at 25–26°C with medium of following composition, g/l: 10.0 glucose; 5.0 peptone; 3.0 yeast extract; 20.0 agar and 1 l wort (15% dry substances). The grown 2 days' yeast cultures were re-cultured to slopes with the medium, used for ascospore formation induction (Gorodkova's medium), g/l: 1.0 glucose; 10.0 peptone; 5.0 NaCl; 20.0 agar; 1 l water. Afterwards the *Saccharomyces* were cultured at 25°C for 38 days up to an active formation of ascospores. Spore formation was observed in 60–80% cells. Cultures were frozen-dried with “MODULYO-4K” sublimation device (Edwards, Great Britain). Primary drying was realised at –55°C and 6×10^{-2} mbar vacuum depth for 4 hrs; final drying was done with second-dary drying device rack at room temperature under 8×10^{-2} mbar vacuum for 18 hrs. Sucrose-gelatine medium (10% sucrose solution with 1.5% gelatine and 0.1% agar-agar) was used as a protectant. Number of viable yeast cells was determined using the method of limiting dilutions in 1 ml suspension prior to and after freeze-drying, as well as 1 and 2, 5 and 8 years after culture storage.

The number of viable cells in whole *Saccharomyces* strains, frozen-dried at the spore formation stage, was established as significantly higher than in the cultures, being under stationary growth phase, independently on storage terms both following 1 day of freeze-drying and after 8 years' storage.

The data obtained testified to the expediency of *Saccharomyces* yeast freeze-drying at the spore formation stage. Their preservation under this state provides a high survival degree and does not change physiological and biochemical properties of cultures.