

Сравнительное изучение влияния режимов охлаждения на свободные и иммобилизованные в альгинатном геле клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

В.Л. ПОНОМАРЕВА, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, Т.М. ГУРИНА, Е.С. ОНАСЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Comparative Study of Cooling Regimen Effect on Free and Alginate Gel-Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* Yeasts

V.L. PONOMAREVA, I.P. VYSEKANTSEV, T.M. GURINA, E.S. ONASENKO

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

Применение иммобилизованных клеток дрожжей в биотехнологических производствах обеспечивает повышение рентабельности производства и улучшение качества готовой продукции. Повышенный интерес вызывает использование иммобилизованных клеток микроорганизмов в фармацевтической и пищевой промышленности. Для хранения микроорганизмов, иммобилизованных в гелях, применяют различные низкие температуры. Использование для этих целей криоконсервирования изучено мало. Цель исследования – сравнительное изучение влияния режимов охлаждения на свободные и иммобилизованные в альгинатном геле клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Экспериментальные образцы, состоящие из клеточных суспензий, клеток, иммобилизованных в альгинатных гранулах и в массе геля, замораживали со скоростями: 1; 5; 10 и 15 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот. Часть образцов непосредственно погружали в жидкий азот. Жизнеспособность клеток оценивали «чашечным» методом Коха. Средний размер гранул составлял 1200 мкм. Альгинатные гранулы, стабилизированные в растворе 0,1 М хлорида кальция, дезинтегрировали в 4%-м водном растворе ЭДТА.

Установлено, что после замораживания со скоростями 1, 5, 10, 15 град/мин сохранялись жизнеспособными 30,5; 30,1; 17,0; 9,7% соответственно клеток, суспендированных в дистиллированной воде. При замораживании клеток, иммобилизованных в массе геля, количество жизнеспособных клеток составляло 90,8; 74,5; 38,1; 16,1% соответственно. Жизнеспособность иммобилизованных в гранулах клеток дрожжей была достоверно выше и составляла 96,6; 93,3; 82,5; 56,1%. Замораживание погружением в жидкий азот во всех случаях приводило к значительной гибели клеток.

Полученные результаты свидетельствуют о высоких криозащитных свойствах геля альгината натрия при замораживании клеток дрожжей с низкими скоростями охлаждения. Достоверно установлены более высокие показатели жизнеспособности иммобилизованных в гранулах клеток дрожжей по сравнению с жизнеспособностью дрожжей, замороженных в массе геля. Низкие показатели жизнеспособности иммобилизованных в гранулах клеток при высоких скоростях охлаждения, очевидно, связаны с повреждением гелевой матрицы.

Полученные результаты помогут разработать оптимальные протоколы криоконсервирования клеток микроорганизмов, иммобилизованных в гелевых носителях, расширить возможности их практического использования в различных биотехнологических процессах.

Application of immobilized yeast cells in biotechnological industry provides a rise in profitability of the production and quality improvement of ready product. The use of immobilized microorganism cells in pharmaceutical and food industries is of great interest. Low temperatures are applied to store the microorganisms immobilized in gels. The use of cryopreservation for these aims has been poorly studied. The research aim was to comparatively investigate the effect of cooling regimens on free and immobilized in alginate gels cells of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts.

Experimental samples: cell suspensions, cells immobilized in alginate granules and in gel mass, were frozen with the rates 1, 5, 10 and 15 deg/min down to -40°C with following plunging into liquid nitrogen. The part of the samples was directly plunged into liquid nitrogen. Cell viability was assessed according Koch's plate method. Average size of granules was 1,200 μm . Alginate granules stabilized in 0.1 M calcium chloride solution were disintegrated in 4% EDTA aqueous solution.

It has been found that after freezing with the rates of 1, 5, 10 and 15 deg/min there were preserved correspondingly 30.5, 30.1, 17.0 and 9.7% of the cells, suspended in a distilled water. When freezing the cells immobilized in gel mass the number of viable cells made 90.8, 74.5, 38.1 and 16.1, correspondingly. Viability of immobilized in granules yeast cells was statistically and significantly higher and made 96.6, 93.3, 82.5 and 56.1%. Freezing by means of plunging into liquid nitrogen in all the cases resulted in a high death of cells.

The findings testify to high cryoprotective properties of sodium alginate gel when freezing the yeast cells with low cooling rates. Higher indices of viability of immobilized in granules yeast cells if compared with the viability of yeasts frozen in gel mass have been statistically and significantly found. Low indices of viability of immobilized in granules cells at high cooling rates are likely related to the damage of gel matrix.

The findings will help to design the optimal protocols for cryopreservation of microorganism cells immobilized in gel carriers, to extend the possibilities of their practical use in different biotechnological processes.