

УДК 582.282.232:615.014.41

В.Л. Пономарева, Л.Г. Кулешова\*, И.П. Высеканцев,  
Е.С. Онасенко, О.А. Михайлова

## Кинетика фазовых превращений в процессе охлаждения-отогрева клеток *Saccharomyces cerevisiae* в альгинатсодержащих криозащитных средах

UDC 582.282.232:615.014.41

V.L. Ponomareva, L.G. Kuleshova\*,  
I.P. Vysekantsev, E.S. Onasenko, O.A. Mikhailova

## Kinetics of Phase Transformations During Cooling-Warming of *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Alginate-Containing Cryoprotective Media

**Реферат:** В работе исследовано влияние альгината натрия на жизнеспособность и кинетику фазовых превращений в суспензии клеток *Saccharomyces cerevisiae* в процессе криоконсервирования. Определены оптимальные условия криоконсервирования дрожжевых клеток: скорость охлаждения 1 град/мин в альгинатсодержащих криозащитных средах (жизнеспособность клеток  $(90,79 \pm 2,01)\%$  – в растворе 1%-го альгината натрия и  $(88,11 \pm 1,75)\%$  – в комбинации 5%-го диметилсульфоксида (ДМСО) и 1%-го альгината натрия). Методом криомикроскопии показано, что присутствие в криозащитной среде альгината натрия изменяет характер кристаллизации и смещает зону фазовых переходов в область более низких температур. Начало фазовых превращений в образцах, замороженных в 5%-м растворе ДМСО, регистрировалось при температуре  $-8,5^\circ\text{C}$ , в образцах, содержащих 1% альгинат натрия, – при  $-16^\circ\text{C}$ , в трехкомпонентной системе, содержащей комбинацию 1% альгината натрия и 5% ДМСО, – при  $-15^\circ\text{C}$ .

**Ключевые слова:** криоконсервирование, дрожжи, альгинат натрия, жизнеспособность, криомикроскопия.

**Реферат:** У роботі досліджено вплив альгінату натрію на життєздатність і кінетику фазових перетворень у суспензії клітин *Saccharomyces cerevisiae* в процесі криоконсервування. Визначено оптимальні умови криоконсервування дріжджових клітин: швидкість охолодження 1 град/хв у криозахисних середовищах, що містять альгінат натрію (життєздатність клітин  $(90,79 \pm 2,01)\%$  – у розчині 1%-го альгінату натрію та  $(88,11 \pm 1,75)\%$  – у комбінації 5%-го диметилсульфоксиду (ДМСО) та 1%-го альгінату натрію). Методом криомікроскопії показано, що присутність у криозахисному середовищі альгінату натрію змінює характер кристалізації та зміщує фазові переходи у зону більш низьких температур. Початок фазових перетворень у зразках, заморожених в 5%-му розчині ДМСО, реєструвався при температурі  $-8,5^\circ\text{C}$ , у зразках, що містять 1% альгінату натрію, – при  $-16^\circ\text{C}$ , у трикомпонентній системі, яка містить комбінацію 1% альгінату натрію і 5% ДМСО, – при  $-15^\circ\text{C}$ .

**Ключові слова:** криоконсервування, дріжджі, альгінат натрію, життєздатність, криомікроскопія.

**Abstract:** The effect of sodium alginate on the viability and kinetics of phase transformations of *Saccharomyces cerevisiae* cells during cryopreservation was investigated. There were determined the optimal conditions for yeast cell cryopreservation such as: the cooling rate of 1 deg/min in alginate-containing cryoprotective media (cell viability of  $(90.79 \pm 2.01)\%$  and  $(88.11 \pm 1.75)\%$  in solution of 1% sodium alginate and in combination of 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1% sodium alginate, respectively). Using cryomicroscopy, the presence of sodium alginate in cryoprotective medium was shown to change the crystallization performance and to shift the phase transition zone towards lower temperatures. The beginning of phase transformations in the specimens, cooled in 5% DMSO solution was recorded at  $-8.5^\circ\text{C}$ , in those, containing 1% sodium alginate and in a three-component system, comprising the combination of 1% sodium alginate and 5% DMSO, it was found at  $-16$  and  $-15^\circ\text{C}$ , respectively.

**Key words:** cryopreservation, yeast, sodium alginate, viability, cryomicroscopy.

В настоящее время разработано множество различных методов долгосрочного хранения микроорганизмов, обеспечивающих сохранение их жизнеспособности, генетической и фенотипической стабильности. Все существующие на данный момент методы консервирования основаны на переводе клеток в состояние анабиоза, при котором сохраняются жизнеспособность и биологические

To date there are many different methods for long-term storage of microorganisms, ensuring the preservation of their viability, genetic and phenotypic stability. All the existing preservation techniques are based on cell transition into anabiosis, when the viability and biological properties of microorganisms are preserved due to inhibiting metabolic and physiological processes. The cryopreservation of

Відділ криомікробіології, Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryomicrobiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: kuleshova@email.ua

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: kuleshova@email.ua

Надійшла 10.07.2018

Прийнята до друку 11.09.2018

Received July, 10, 2018

Accepted September, 11, 2018

© 2018 V.L. Ponomareva et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

свойства микроорганизмов за счет торможения метаболических и физиологических процессов. При криоконсервировании микроорганизмов обычно используют среду культивирования с добавлением различных криопротекторов, влияющих на кристаллизационные процессы и стабилизирующих цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку [3, 4]. Однако, несмотря на бесспорную практическую значимость традиционных методов криозащиты, по нашему мнению, они имеют ряд ограничений. Это связано, прежде всего, с тем, что микроорганизмы широко используются в биотехнологических процессах, пищевой и фармацевтической промышленности. Присутствие же криопротекторов с достаточно высокой криозащитной активностью, необходимой для предотвращения негативных последствий фазовых переходов «вода→лед→вода» при охлаждении-отогреве клеток, нецелесообразно из-за токсичности или невозможности удаления в конце технологического цикла. Поэтому особую актуальность на современном этапе приобретают низкотемпературные технологии без использования традиционных криопротекторных сред или разработка способов снижения концентрации токсических криопротекторов путем введения в среды полисахаридов природного происхождения [1, 20]. Особое внимание среди такого рода веществ заслуживает альгинат натрия благодаря своим уникальным свойствам [11, 12], одним из которых является способность образовывать при низких концентрациях высоковязкие коллоидные растворы. Возрастание приведенной вязкости при разбавлении раствора полиэлектролита вызвано так называемым полиэлектролитным набуханием, т. е. увеличением объема и соответственно линейных размеров макромолекулярных клубков из-за увеличения электростатического отталкивания одноименно заряженных звеньев цепи [5]. Альгинат натрия подвержен биодegradации, нетоксичен, не обладает антигенными свойствами, не оказывает негативного влияния на биоценозы человека и животных. Имобилизованные в гелевых носителях микроорганизмы, в частности дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, широко используются в медицине, ветеринарии, а также для решения экологических проблем [16]. Одновременно дрожжи – удобная модель для исследований в криобиологии, поскольку, они являясь низшими эукариотами, удобны и просты для культивирования и проведения экспериментов. Возможность использования раствора альгината натрия для повышения устойчивости клеток микроорганизмов к холодовым воздействиям к настоящему времени исследована недостаточно.

microorganisms is usually performed in the culture medium, supplemented with different cryoprotectants, affecting the crystallization processes and stabilizing cytoplasmic membrane and cell wall [3, 4]. However, in spite of an indisputable practical significance of the standard cryoprotective methods, we believe they have some limitations. First of all, this is due to a wide use of microorganisms in biotechnological processes, food and pharmaceutical industries. The presence in the medium of cryoprotectants with a high cryoprotective activity, being necessary to prevent negative consequences of the 'water→ice→water' phase transitions during cell cooling-warming, is inexpedient because of either toxicity or impossible removal after completing technological cycle. In this context, either low temperature technologies free of the standard cryoprotective media or finding the ways to reduce the concentration of toxic cryoprotectants via introducing polysaccharides of natural origin into the media, are topical in current cryobiology [1, 18]. Among these substances of special attention is sodium alginate due to its unique properties [19, 20], one of which is the capability to form the high-viscosity colloidal solutions at low concentrations. A rise of the normalized viscosity when diluting the polyelectrolyte solution is caused by so-called polyelectrolyte swelling, *i. e.* an increase in the volume and, correspondingly, the linear dimensions of macromolecular coils due to enhancement of electrostatic repulsion of the like-charged chain links [6]. It is known that sodium alginate is biodegradable and non-toxic substance, having neither antigen properties, nor negative effect on human and animal biocenoses. The microorganisms, immobilized in gel carriers, particularly the yeast *S. cerevisiae* are widely used in medicine, veterinary, as well as in environmental protection [11]. Herewith the yeast cells are convenient model to study in cryobiology, since as the lowest eukaryotes, they are easy-to-use for culture and experiments. The possibility to use the sodium alginate solution for increasing the microbial cell resistance to cold exposures has been poorly studied to date.

The research aim was to study the kinetics of phase transformations during cooling-warming of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells in cryoprotective media, containing sodium alginate and dimethyl sulfoxide.

### Materials and methods

The research object were the yeast *S. cerevisiae* cells, strain LO-2, obtained from the R&D Institute of Bakery Industry (St. Petersburg, Russia). The yeast cells were cultured according to the standard technique in unhopped beer wort (8°B) at 30°C with



Цель работы – сравнительное изучение кинетики фазовых превращений в процессе охлаждения-отогрева клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в криозащитных средах, содержащих альгинат натрия и криопротектор диметилсульфоксид.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили клетки дрожжей *S. cerevisiae*, штамм ЛЮ-2, полученный из РНИИ хлебопекарной промышленности (г. Санкт-Петербург, Россия). Дрожжи культивировали по стандартной методике в неохмеленном пивном сусле (8°Б) при 30°С с аэрацией до начала стационарной фазы роста [7]. В качестве сред суспендирования для клеток использовали: группа 1 – дистиллированную воду; группа 2 – 1%-й раствор альгината натрия; группа 3 – 5%-й раствор диметилсульфоксида (ДМСО); группа 4 – двухкомпонентный раствор, содержащий 1% альгината натрия и 5% ДМСО. Во всех вариантах экспериментов растворы альгината натрия («FarmaSino», Китай) и ДМСО («ДиаэМ», Россия) готовили на дистиллированной воде. Конечная концентрация ДМСО соответствовала 5%, альгината натрия – 1%. Концентрация суспензии клеток во всех образцах составляла  $2,5 \times 10^8$  кл/мл.

Образцы в криобирках цилиндрической формы с рабочим объемом 1,8 мл («Nunc», США) охлаждали со скоростями 1; 5; 10 и 15 град/мин до –40°С с последующим переносом в жидкий азот, а также методом прямого погружения в жидкий азот с неконтролируемой скоростью охлаждения. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 37°С.

Жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae* оценивали по способности образовывать макроколонию на поверхности агаризованных сред («чашечный» метод Коха). Контролем служили клетки *S. cerevisiae*, не подвергнутые охлаждению-отогреву.

Методом криомикроскопии [9] в сравнительном аспекте были изучены особенности фазового перехода «вода→лед→вода» и формирующейся кристаллической структуры в четырех группах образцов: группа 1 – 1%-й раствор альгината натрия без клеток дрожжей *S. cerevisiae*, группы 2, 3 и 4 соответствовали приведенным выше.

Образцы в виде капли наносили на предметное стекло рабочей камеры криоприставки. Затем образец покрывали покровным стеклом для исключения высыхания и получения тонкослойного препарата, позволяющего получить четкое изображение на просвет. Образцы охлаждали со скоростью 1 град/мин до температуры –40°С

aeration till the stationary growth phase onset [7]. As the suspension media for cells we used the following solutions: distilled water for group 1; 1% sodium alginate solution for group 2; 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) for group 3; two-component solution, containing 1% sodium alginate and 5% DMSO for group 4. In all the experiment variants the sodium alginate solutions (FarmaSino, China) and DMSO (Dia-M, Russia) were prepared with distilled water. The final concentration of DMSO and sodium alginate was 5 and 1%, respectively. The concentration of cell suspension in all the samples was  $2.5 \times 10^8$  cells/ml.

Samples in 1.8 ml cryogenic vials (Nunc, USA) were cooled with 1; 5; 10 and 15 deg/min rates down to –40°С, followed by transfer into liquid nitrogen, as well as by a direct immersion into liquid nitrogen with uncontrolled cooling rate. The samples were warmed in water bath at 37°С.

The viability of yeast *S. cerevisiae* was assessed by the capability to form macrocolonies on surface of agarized media (Koch plating method). The *S. cerevisiae* cells, not subjected to cooling-warming, served as the control.

The cryomicroscopy [14] was used to comparatively study the features of the 'water→ice→water' phase transition and forming crystal structure in 4 groups of samples: group 1 – 1% sodium alginate solution free of yeast *S. cerevisiae* cells; groups 2, 3 and 4 corresponded to the mentioned above.

Drop-sized samples were applied to a slide of the working chamber of a cryodevice. The sample was then coated with a cover glass to prevent drying and obtain a thin layer, which made it possible to obtain a clear image in transmitted light. The samples were cooled with 1 deg/min rate down to –40°С till observing the visible changes in crystal structure and then warmed with 1 deg/min rate. In order to record the phase transition, kinetics of crystallization and melting processes in the samples, the DCM-300 eyepiece camera was used in photo and frame-by-frame video mode, recording with either 1 frame per 5 seconds or 1 frame per 3 seconds rate, herewith each subsequent frame corresponded to a decrease (increase) of temperature in the working chamber of cryomicroscope by 0.08 or 0.05°С.

The findings were statistically processed with the Student method using the Excel software (Microsoft, USA).

### Results and discussion

In terms of chemical composition, the alginates are polysaccharide polymers from the interconnected residues of  $\beta$ -D-mannuronic and  $\alpha$ -L-guluronic acids. During gel formation, the polysaccharide chains are



до завершения видимых изменений кристаллической структуры и затем отогревали со скоростью 1 град/мин. Регистрацию фазового перехода, кинетики процесса кристаллизации и плавления образцов осуществляли с использованием видеокамеры-окуляра DCM-300 (Китай) в режиме фото- и кадровой видеосъемки со скоростью 1 кадр через 5 с или со скоростью 1 кадр через 3 с, при этом каждый последующий кадр соответствовал снижению (повышению) температуры в рабочей камере криомикроскопа на 0,08 или 0,05°C.

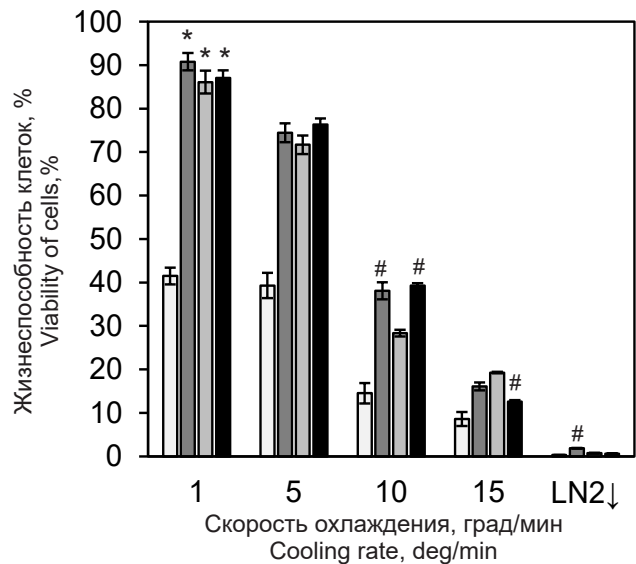
Полученные результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы «Excel» (Microsoft, США).

### Результаты и обсуждение

Химически альгинаты представляют собой полисахаридные полимеры из остатков β-D-маннуровой и α-L-гулуруновой кислот, соединенных между собой. При образовании геля сначала полисахаридные цепочки соединяются между собой водородными мостиками, а затем эти цепочки, связываясь с ионами металлов, образуют ячеистую структуру. Формирование подобной структуры происходит за счет образования ионно-координационных связей между карбоксильными и гидроксильными группами пиранозных циклов α-L-гулуруновой кислоты, соседних полимерных цепей и его ионов металла. Поскольку альгинат натрия являясь гетерополисахаридом, а его свойства определяются, прежде всего, соотношением полимерных цепей остатков β-D-маннуровой кислоты (М-блок) и остатков α-L-гулуруновой кислоты (G-блок). Содержание и относительная длина G-блоков являются важнейшими критериями наиболее ценного свойства альгинатов – способности к гелеобразованию. Блочный состав определяет и другие характеристики альгинатов, включая биологическую активность и способность к комплексообразованию с противоположно заряженными биополимерами. Использование альгинатов в криобиологии основано на том, что альгинатный гель термически необратим, выдерживает охлаждение, замораживание и сохраняет свои свойства при отогреве.

Исходя из вышеизложенного на первом этапе работы было проведено сравнительное изучение влияния криозащитных сред, в составе которых содержится альгинат натрия и криопротектор ДМСО, а также скоростей охлаждения на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* после деконсервирования. Полученные результаты приведены на рис. 1.

Установлено, что жизнеспособность деконсервированных клеток *S. cerevisiae* при охлаждении



**Рис. 1.** Жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* после охлаждения с различными скоростями в средах, содержащих 1% альгината натрия и 5% ДМСО, последующего отогрева: □ – дистиллированная вода; ■ – 1% альгината натрия; ■ – 5% ДМСО; ■ – 1% альгината натрия и 5% ДМСО; \* – различия статистически значимы по отношению к другим скоростям охлаждения; # – по отношению к группе 3 ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 1.** Viability of *S. cerevisiae* cells after cooling with different rates in the media, containing 1% sodium alginate and 5% dimethyl sulfoxide and subsequent warming: □ – distilled water; ■ – 1% sodium alginate; ■ – 5% DMSO; ■ – 1% sodium alginate and 5% DMSO; \* – differences are statistically significant with respect to other cooling rates; # – in respect to group 3 ( $p < 0.05$ ).

first joined together by hydrogen bridges, then these chains bind metal ions and form a cellular structure due to the appearance of ion-coordination bonds between carboxyl and hydroxyl groups of pyranose cycles of α-L-guluronic acid of neighbouring polymer chains and metal ions. Since the sodium alginate refers to heteropolysaccharides, its properties are primarily determined by the ratio of polymer chains of the residues of β-D-mannuronic acid (M-block) and those α-L-guluronic acid (G-block). The content and a relative length of G-blocks are the most important criteria for the most valuable property of alginates, *i. e.* the capability to gel formation. Block composition determines many other characteristics of alginates, including biological activity and capability to complex formation with the oppositely charged biopolymers as well. The use of alginates in cryobiology is based on the stability of alginate gel to cooling, freezing and preservation of its properties during thawing.

Proceeding from the mentioned above, at the first stage we comparatively studied the effect of cryoprotective media, containing sodium alginate and cryoprotectant DMSO, as well as cooling rates

со скоростями 1 и 5 град/мин в защитной среде, содержащей 1% альгината натрия (группа 2), значительно не отличается от жизнеспособности клеток в образцах, содержащих 5% ДМСО (группа 3). При охлаждении образцов со скоростью 10 град/мин показатели жизнеспособности деконсервированных клеток существенно снижаются в группах 2 (1% альгината натрия) и 4 (1% альгината натрия и 5% ДМСО), однако они выше, чем в группе 3 (5% ДМСО). При охлаждении образцов со скоростью 15 град/мин жизнеспособность деконсервированных клеток во всех четырех группах достигает значений ниже 20%. Таким образом, наиболее высокие показатели жизнеспособности деконсервированных клеток получены при охлаждении образцов со скоростью 1 град/мин в группах, содержащих в криозащитной среде альгинат натрия: группа 2 –  $(90,79 \pm 2,01)\%$ , группа 4 –  $(88,11 \pm 1,75)\%$  [10]. Проведенный анализ результатов позволил сделать вывод о том, что раствор альгината натрия сам по себе обладает высокими криопротекторными свойствами.

Для выяснения возможных механизмов криопротекторного действия альгината натрия на втором этапе было необходимо определить особенности фазового перехода «вода→лед→вода» в альгинатсодержащих криопротекторных средах. Известно, что при разработке эффективных способов криоконсервирования необходимо учитывать, прежде всего, процессы, связанные с фазовыми превращениями, происходящими при замораживании в криопротекторных растворах. В частности, это формирование каналов и включений с высококонцентрированными жидкими фракциями, в которые вытесняются клетки при продвижении фронта роста кристаллов льда [6, 14, 15, 18, 19].

Методом криомикроскопии нами была изучена кинетика фазовых превращений в процессе охлаждения-отогрева суспензии дрожжевых клеток в исследуемых криозащитных средах. Данный метод позволил визуально оценить особенности формирующейся кристаллической структуры, а также кинетику роста кристаллов льда, экспериментально установить и обосновать оптимальные условия, обеспечивающие максимальную сохранность изучаемого биологического объекта [13, 17].

На рис. 2 представлен процесс охлаждения и отогрева 1%-го раствора альгината натрия. В целях идентификации поля зрения в данный раствор были внесены кристаллики йодистого серебра (AgJ). В связи с этим визуально в поле зрения образец был усеян кристалликами AgJ разного размера. При охлаждении 1%-го раствора альги-

на на жизнеспособности пост-крио *S. cerevisiae* клеток. The findings are shown in the Fig. 1.

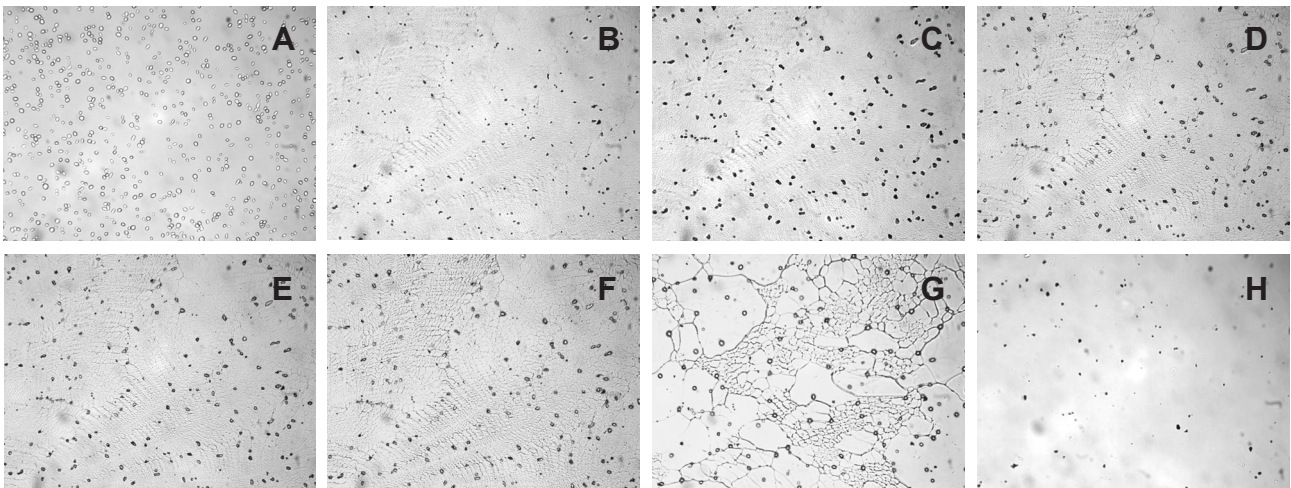
The viability index of post-cryo *S. cerevisiae* cells during cooling with 1 and 5 deg/min rates in a protective medium, containing 1% sodium alginate (group 2), was established as not significantly differing from that in the samples with 5% DMSO (group 3). In case of cooling the samples with 10 deg/min rate, the viability indices of post-cryo cells were significantly reduced in groups 2 (1% sodium alginate) and 4 (1% sodium alginate and 5% DMSO), but they were higher than in group 3 (5% DMSO). When the samples were cooled with 15 deg/min rate, the viability of post-cryo cells in all four groups reached the values below 20%. Thus, the highest viability indices of post-cryo cells were obtained using cooling with 1 deg/min rate in the groups, containing sodium alginate in cryoprotective medium, *i. e.*: group 2 –  $(90.79 \pm 2.01)\%$ ; group 4 –  $(88.11 \pm 1.75)\%$  [17]. The analysis of the findings enabled concluding that the sodium alginate solution itself possessed high cryoprotective properties.

At the second stage, in order to elucidate the possible mechanisms of a cryoprotective action of sodium alginate, it was necessary to determine the features of the 'water→ice→water' phase transition in the alginate-containing cryoprotective media. It is known that when designing the efficient methods of cryopreservation, first of all it is necessary to consider the processes, associated with phase transformations, occurring during freezing in cryoprotective solutions. In particular, one of these processes is a formation of channels and inclusions filled with highly concentrated liquid fractions, whereto the cells are displaced when the growing front of ice crystals moves [8–10, 15, 16].

Using cryomicroscopy we studied the kinetics of phase transformations for cooling-warming of the yeast cell suspension in the studied cryoprotective media. This method enabled a visual assessment of the features of emerging crystal structure, as well as the kinetics of ice crystal growth, to experimentally establish and substantiate the optimal conditions, ensuring the maximum preservation of the biological object under study [5, 12].

The Fig. 2 shows cooling and warming of 1% sodium alginate solution. Small crystals of silver iodide (AgJ) were introduced into this solution to identify the field of view. Thus the field of view of the sample was covered with AgJ crystals of different sizes. When 1% sodium alginate solution was cooled, the suspended AgJ particles were in motion, which made obstacles to record a clear picture down to  $-6.0^{\circ}\text{C}$  (Fig. 2A), when the gel formation process in the sample was apparently completed. Within the





**Рис. 2.** Процесс охлаждения-отогрева 1%-го раствора альгината натрия: **A** – контроль; **B** –  $\downarrow T = -9.2^\circ\text{C}$ ; **C** –  $\downarrow T = -22^\circ\text{C}$ ; **D** –  $\downarrow T = -40^\circ\text{C}$ ; **E** –  $\uparrow T = -15^\circ\text{C}$ ; **F** –  $\uparrow T = -7.5^\circ\text{C}$ ; **G** –  $\uparrow T = -4^\circ\text{C}$ ; **H** –  $\uparrow T = 20^\circ\text{C}$ , 200 мкм.

**Fig. 2.** Cooling-warming of 1% sodium alginate solution: **A** – control; **B** –  $\downarrow T = -9.2^\circ\text{C}$ ; **C** –  $\downarrow T = -22^\circ\text{C}$ ; **D** –  $\downarrow T = -40^\circ\text{C}$ ; **E** –  $\uparrow T = -15^\circ\text{C}$ ; **F** –  $\uparrow T = -7.5^\circ\text{C}$ ; **G** –  $\uparrow T = -4^\circ\text{C}$ ; **H** –  $\uparrow T = 20^\circ\text{C}$ , scale bar, 200 $\mu\text{m}$ .

ната натрия взвешенные в нем частицы AgJ находились в движении, что затрудняло регистрацию четкой картины, вплоть до температуры  $-6,0^\circ\text{C}$  (рис. 2, A), при которой, по-видимому, завершился процесс гелеобразования в образце. В интервале температур  $-6,0 \dots -9,0^\circ\text{C}$  поле зрения оставалось стабильным. При температуре  $-9,2^\circ\text{C}$  (рис. 2, B) наблюдался фазовый переход в виде мгновенного «высыпания» мелкокристаллической структуры, строение которой имело вид своеобразной ажурной сетки, образованной тонкими нитями каналов.

Гели полимеров представляют собой дисперсные системы с жидкой дисперсионной средой (вода), в которой частицы дисперсионной фазы (полимер) образуют непрерывную трехмерную макромолекулярную сетку, выполняющую роль каркаса, в котором пустоты заполнены дисперсионной средой. В местах контакта частицы дисперсионной фазы соединены между собой непосредственно силами межмолекулярного взаимодействия или через тонкую прослойку дисперсионной среды. Как правило, такие гели возникают при понижении температуры. Образование мелкокристаллического льда при фазовом переходе в 1%, растворе альгината натрия может быть обусловлено именно формированием при гелеобразовании такой трехмерной макромолекулярной сетки, которая фрагментирует водную фракцию и ограничивает доступ молекул воды для активного разрастания кристаллов льда.

При дальнейшем охлаждении на фоне первично образовавшейся кристаллической структуры появлялись темные образования (рис. 2, C), размер которых по мере снижения температуры увеличивался, что однозначно позволяло отличить их

temperature range of  $-6.0 \dots -9.0^\circ\text{C}$  the picture remained stable in the field of view. At  $-9.2^\circ\text{C}$  (Fig. 2 B) there was observed a phase transition in the form of an instant «spilling» of a specific fine-crystalline structure, the structure of which was a kind of mesh made of thin strand like channels. This is probably due to the peculiarities of a spatial structure of sodium alginate molecule, consisting of the residues of two uronic acids, being in pyranose form and joined together by 1,4-glycosidic bonds.

The polymer gels are disperse systems with a liquid disperse medium (water), where the particles of dispersed phase (polymer) form a continuous three-dimensional macromolecular network, acting as a scaffold, the hollows in which are filled with a dispersion medium. At the points of contact, the particles of dispersed phase are connected by intermolecular forces directly or via a thin interlayer of dispersed medium. As a rule, these gels are formed with temperature decrease. The formation of fine-grained ice during phase transition in 1% sodium alginate solution may be stipulated right by forming a three-dimensional macromolecular network during gel formation, which fragments an aqueous fraction and limits the water molecule access for active growth of ice crystals.

With further cooling, at the background of the primary formed crystalline structure the dark formations appeared (Fig. 2C), the size of which increased with decreasing temperature, that enabled to distinguish them from AgJ crystals. When the temperature reached  $-40^\circ\text{C}$  (Fig. 2D), a crystal structure generally preserved its morphology, and grains acquired distinct boundaries, that testified to a continuous freezing of water fraction during sample's cooling. The appeared inclusions were of different

от кристалликов AgI. При достижении температуры  $-40^{\circ}\text{C}$  (рис. 2, D) кристаллическая структура, в целом сохраняя свою морфологию, приобретала четкие границы зерен, что свидетельствовало о непрерывном вымораживании водной фракции в процессе охлаждения образца. Возникшие включения имели различную форму и размер. Мы полагаем, что наблюдаемые различной формы и размера включения представляют собой вытесненный раствор альгината натрия с более высокой концентрацией.

На этапе отогрева в интервале температур от  $-40^{\circ}\text{C}$  до  $-7,5^{\circ}\text{C}$  существенные изменения кристаллической структуры не отмечались (рис. 2, E и F). В интервале температур  $-7,5...-4,0^{\circ}\text{C}$  (рис. 2, G) наблюдался процесс перестройки кристаллической структуры, обусловленный рекристаллизацией, а также просветление и сферуляция включений, образовавшихся на этапе охлаждения. При дальнейшем повышении температуры наблюдались интенсивное плавление кристаллов льда и растворение включений, о котором свидетельствовало уменьшение их количества в поле зрения. При температуре  $20^{\circ}\text{C}$  визуальное состояние образца было идентично исходному (рис. 2, H).

На рис. 3 представлен процесс охлаждения и отогрева суспензии клеток дрожжей *S. cerevisiae*, содержащей 1%-й альгинат натрия.

При охлаждении клеточной суспензии изменялось поле зрения в результате движения клеток вплоть до температур ниже  $-10^{\circ}\text{C}$ , что свидетельствовало о ее жидком состоянии. В области температуры  $-13^{\circ}\text{C}$  визуальная картина стабилизиро-

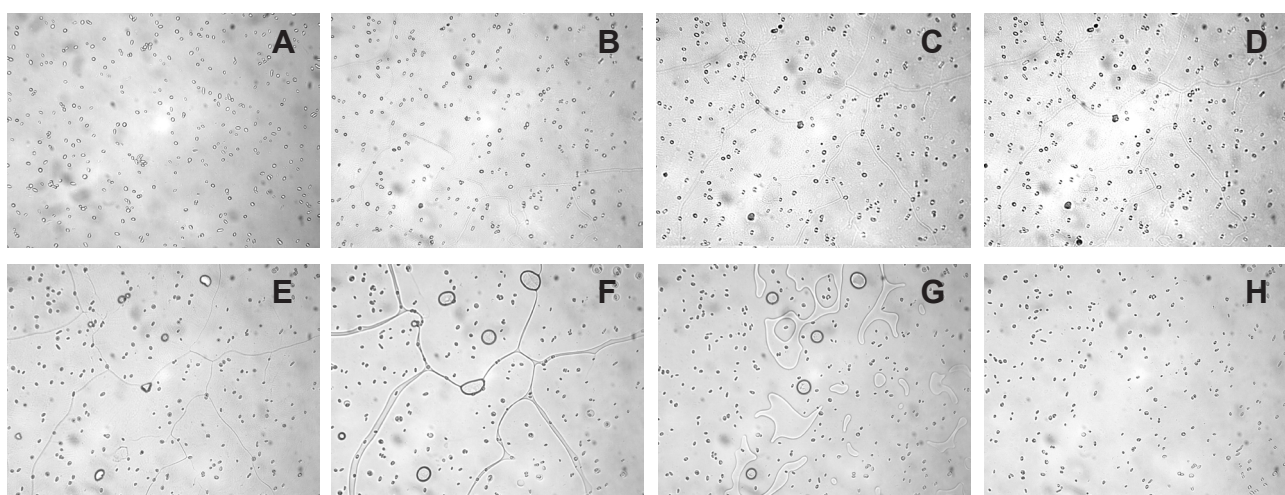
shapes and sizes. We believe that the observed inclusions represent a displaced sodium alginate solution with a higher concentration.

During warming within temperature range from  $-40...-7.5^{\circ}\text{C}$  no significant changes in crystal structure were observed (Fig. 2E, F). The rearrangement of crystal structure, caused by recrystallization, as well as the enlightenment and spherulation of inclusions, formed during cooling, was observed at  $-7.5...-4.0^{\circ}\text{C}$  (Fig. 2G). Further temperature increase caused an intensive melting of ice crystals and dissolution of inclusions, evidenced by their decreased number in the field of view. At  $20^{\circ}\text{C}$  an appearance of the sample was identical to the initial one (Fig. 2H).

The Fig. 3 demonstrates the phenomena occurred during cooling-warming of the yeast *S. cerevisiae* cell suspension, containing 1% sodium alginate.

During cooling of cell suspension the field of view changed due to cell movement down to the temperatures below  $-10^{\circ}\text{C}$ , that testified to its liquid state. Within the temperature range of  $-13^{\circ}\text{C}$ , a picture remained stable, which was probably due to the gel formation process (Fig. 3A).

At  $-16^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3B) we observed a simultaneous progress of several crystallization fronts from the periphery of the field of view, which were occluded at  $-18^{\circ}\text{C}$  and formed the network of channels. As a result of phase transition, the sample became a fine grid, divided into the areas, bounded by the channels (Fig. 3C). Further temperature decrease was entailed by narrowing of channels and formation of liquid inclusions along them, possibly displaced from the channels. The structural grid was preserved. When reaching the stabilization temperature of  $-40^{\circ}\text{C}$ , the



**Рис. 3.** Процесс охлаждения-отогрева суспензии клеток *S. cerevisiae* в 1%-м растворе альгината натрия: **A** – контроль; **B** –  $\downarrow T = -16^{\circ}\text{C}$ ; **C** –  $\downarrow T = -18^{\circ}\text{C}$ ; **D** –  $\downarrow T = -40^{\circ}\text{C}$ ; **E** –  $\uparrow T = -15^{\circ}\text{C}$ ; **F** –  $\uparrow T = -7^{\circ}\text{C}$ ; **G** –  $\uparrow T = -4,7^{\circ}\text{C}$ , **H** –  $\uparrow T = 20^{\circ}\text{C}$ , 200 мкм.

**Fig. 3.** Cooling-warming of *S. cerevisiae* cell suspension in 1% sodium alginate solution: **A** – control; **B** –  $\downarrow T = -16^{\circ}\text{C}$ ; **C** –  $\downarrow T = -18^{\circ}\text{C}$ ; **D** –  $\downarrow T = -40^{\circ}\text{C}$ ; **E** –  $\uparrow T = -15^{\circ}\text{C}$ ; **F** –  $\uparrow T = -7^{\circ}\text{C}$ ; **G** –  $\uparrow T = -4,7^{\circ}\text{C}$ , **H** –  $\uparrow T = 20^{\circ}\text{C}$ , 200 $\mu\text{m}$ .



валась стабільной, что, возможно, обусловлено процессом гелеобразования (рис. 3, А).

При температуре  $-16^{\circ}\text{C}$  (рис. 3, В) из периферии поля зрения наблюдалось продвижение одновременно нескольких кристаллизационных фронтов, которые сомкнулись при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ , образуя сеть каналов. В результате фазового перехода образец стал представлять собой мелкую сетку, разделенную на области, ограниченные каналами (рис. 3, С). Дальнейшее понижение температуры приводило к сужению каналов и образованию вдоль них жидких включений, возможно, вытесненных из каналов. Структурная сетка сохранялась. При достижении температуры стабилизации  $-40^{\circ}\text{C}$  образец представлял собой кристаллическую структуру с тонкими нитями каналов между зернами и жидкими включениями разной формы (рис. 3, D).

На этапе отогрева в интервале от температуры стабилизации  $-40^{\circ}\text{C}$  до температуры  $-15^{\circ}\text{C}$  существенных изменений в образце не отмечалось. По мере повышения температуры в зоне  $-15^{\circ}\text{C}$ ... $-7,0^{\circ}\text{C}$  (рис. 3, E) увеличивались размеры и изменялась форма включений как в структуре льда, так и в каналах, образовавшихся на границе между кристаллическими зернами, однако ширина границы (каналов) не увеличивалась. При температуре  $-7,0^{\circ}\text{C}$  едва различимая сетка перестала визуализироваться (рис. 3, F). Температурный интервал интенсивного плавления кристаллов льда  $-6,5^{\circ}\text{C}$ ... $-4,7^{\circ}\text{C}$  характеризовался увеличением объема жидкой фракции, сферуляцией включений в каналах, а также появлением жидкой фракции в замкнутых включениях в структуре льда, в которых оказались клетки при фазовом переходе на этапе охлаждения. При дальнейшем повышении температуры постепенно уменьшался размер сферических включений в жидкой фракции. Плавление кристаллов льда в поле зрения завершилось при температуре  $-3,5^{\circ}\text{C}$ , однако жидкие включения продолжали растворяться и полностью растворились лишь при температуре  $-2,5^{\circ}\text{C}$  (рис. 3, G). После завершения цикла «охлаждение-отогрев» при  $20^{\circ}\text{C}$  клетки дрожжей восстановили первоначальный объем и морфологически оставались сохранными (рис. 3, H).

На рис. 4 представлен процесс охлаждения и отогрева суспензии клеток дрожжей *S. cerevisiae*, содержащей 5% ДМСО. Исходная суспензия представляла собой гетерогенную систему, которая состояла как из отдельных клеток различных размеров (в пределах от 5 до 10 мкм), так и контактирующих клеток в виде групп или линейных цепочек (рис. 4, А). В силу малых размеров клетки дрожжей свободно перемещались в поле

sample was of crystalline structure with thin filaments of channels between grains and liquid inclusions of different shapes (Fig. 3D).

During warming no significant changes in the sample were observed within the range from stabilization temperature of  $-40^{\circ}\text{C}$  up to  $-15^{\circ}\text{C}$ . With temperature rise within the range of  $-15^{\circ}\text{C}$ ... $-7.0^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3E) the sizes augmented and the shape of inclusions changed both inside ice bulk and the channels, formed at the boundary between crystalline grains, nevertheless the width of boundary (channels) remained not increased. A mild grid disappeared at  $-7.0^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3F). The temperature range of intense melting of ice crystals ( $-6.5^{\circ}\text{C}$ ... $-4.7^{\circ}\text{C}$ ) was characterized by an increased volume of liquid fraction, the spherulation of inclusions in channels, as well as the appearance of a liquid fraction in closed inclusions inside ice, where cells were observed during phase transition at cooling stage. With further temperature rise, the size of spherical inclusions in liquid fraction decreased gradually. Melting of ice crystals in the field of view was completed at  $-3.5^{\circ}\text{C}$ , but the liquid inclusions continued to dissolve and were completely dissolved only at  $-2.5^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3G). After completing the 'cooling-warming' cycle at  $20^{\circ}\text{C}$ , the yeast cells restored their initial volume and appeared as intact ones (Fig. 3H).

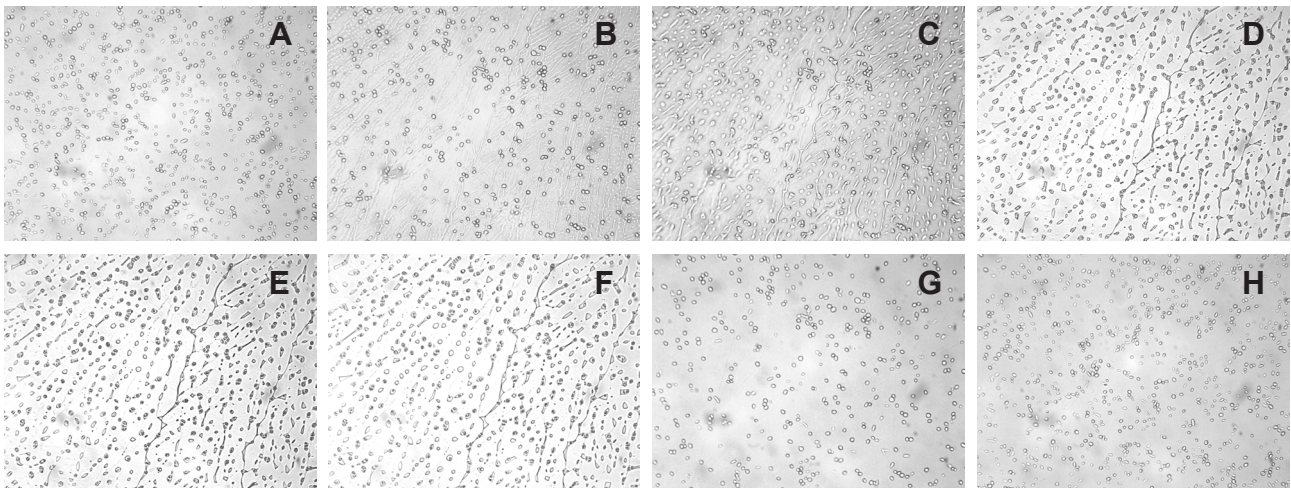
The Fig. 4 demonstrates the cooling and warming processes of the yeast *S. cerevisiae* cell suspension, containing 5% DMSO. The initial suspension was a heterogeneous system, consisting of both individual cells of different sizes (5–10  $\mu\text{m}$ ) and the cells with contacts forming groups or linear chains (Fig. 4A). Having a small size, the yeast cells moved freely in the field of view, therefore during cooling the picture was slightly changed. The phase transition in the sample was observed at  $-8.5^{\circ}\text{C}$  from a supercooled state, as evidenced by an instantaneous filling of field of view with ice crystals and formation of a branched network of channels (Fig. 4B).

From a thermodynamic point of view, the state of polycrystalline structure with a large extent of boundaries is energetically unprofitable, and therefore unstable. In this context, an active process of recrystallization occurred in the sample (Fig. 4C). Further growth of extracellular ice crystals proceeded due to the water fraction incoming from the mother liquor in channels. The width of channels was noticeably reduced, and DMSO concentration increased as a matter of course (Fig. 4D). During rearrangement of extracellular structure, the yeast cells occurred in closed liquid inclusions inside ice structure or were pushed into the channels as well.

During warming the melting of ice crystals was observed at  $-25^{\circ}\text{C}$ , the boundary between the







**Рис. 4.** Процесс охлаждения-отогрева суспензии клеток *S. cerevisiae* в 5%-м растворе ДМСО: **А** – контроль; **В** – ↓ T = -8,5°C; **С** – ↓ T = -12°C; **Д** – ↓ T = -40°C; **Е** – ↑ T = -25°C; **Ф** – ↑ T = -15°C; **Г** – ↑ T = -4,6°C; **Н** – ↑ T = 20°C, 200 мкм.

**Fig. 4.** Cooling-warming of *S. cerevisiae* cell suspension in 5% solution of DMSO: **A** – control; **B** – ↓ T = -8,5°C; **C** – ↓ T = -12°C; **D** – ↓ T = -40°C; **E** – ↑ T = -25°C; **F** – ↑ T = -15°C; **G** – ↑ T = -4,6°C; **H** – ↑ T = 20°C, 200µm.

зрения, поэтому в процессе охлаждения визуальная картина несколько менялась. Фазовый переход в образце наблюдался при температуре -8,5°C из переохлажденного состояния, о чем свидетельствовали мгновенное заполнение поля зрения кристаллами льда и формирование разветвленной сети каналов (рис. 4, В).

С термодинамической точки зрения состояние поликристаллической структуры, имеющей большую протяженность границ, энергетически невыгодно, а потому нестабильно. В связи с этим в образце прошел активный процесс рекристаллизации (рис. 4, С). Последующий рост внеклеточных кристаллов льда осуществлялся за счет поступления водной фракции из маточного раствора в каналах. Ширина каналов заметно уменьшалась и в них закономерно повышалась концентрация ДМСО (рис. 4, D). В процессе перестройки внеклеточной структуры клетки дрожжей оказывались как в замкнутых жидких включениях в структуре льда, так и оттесненными в каналы.

На этапе отогрева процесс плавления кристаллов льда отмечался в области -25°C при фиксации исчезновения границы между близко расположенными каналами и их слиянием (рис. 4, E). Дальнейшее повышение температуры сопровождалось увеличением областей жидкой фракции. В области интенсивного плавления (интервал температур -15,0...-5,0°C) хорошо видно, что основная масса клеток располагалась в каналах и в результате обезвоживания их размер существенно уменьшился (рис. 4, F). Клетки, которые при фазовом переходе оказались в замкнутых включениях в кристаллической структуре льда, оставались

close channels disappeared and their fusion occurred (Fig. 4E). Further temperature rise was accompanied by an increase of liquid fraction areas. Within the intense melting range (temperature interval -15.0...-5.0°C) the most cells were seen in the channels, and as a result of dehydration, their size decreased significantly (Fig. 4F). The cells, which occurred during phase transition in closed inclusions inside an ice crystal, remained in such a state up to -5.6°C, when the appearance of liquid fraction was noted in the inclusions. At -4.6°C (Fig. 4G) the ice crystals virtually disappeared from the field of view. After completing the 'cooling-warming' program at 20°C (Fig. 4H), the cell volume was restored, and no signs of morphological disorders were present, indicating thereby the yeast survival.

The Fig. 5A demonstrates the cooling and warming of a three-component system, containing the yeast *S. cerevisiae* cells, 5% DMSO and 1% sodium alginate. In this sample, the cell movement in the field of view was noted down to -15°C (Fig. 5B). At this temperature, the field of view instantaneously got a dotted structure as a result of phase transition, and the yeast cells were larger than these dots. Next, the process of ice crystal development and channel network formation followed (Fig. 5C). As the fronts of growing ice crystal moved forward, the point formations were displaced into the local areas (Fig. 5D).

During warming within the range from stabilization temperature of -40°C up to -25°C no visible changes in the formed structure were noted. But starting from -23°C (Fig. 5E), the process of dissolution of point formations began, which almost en-

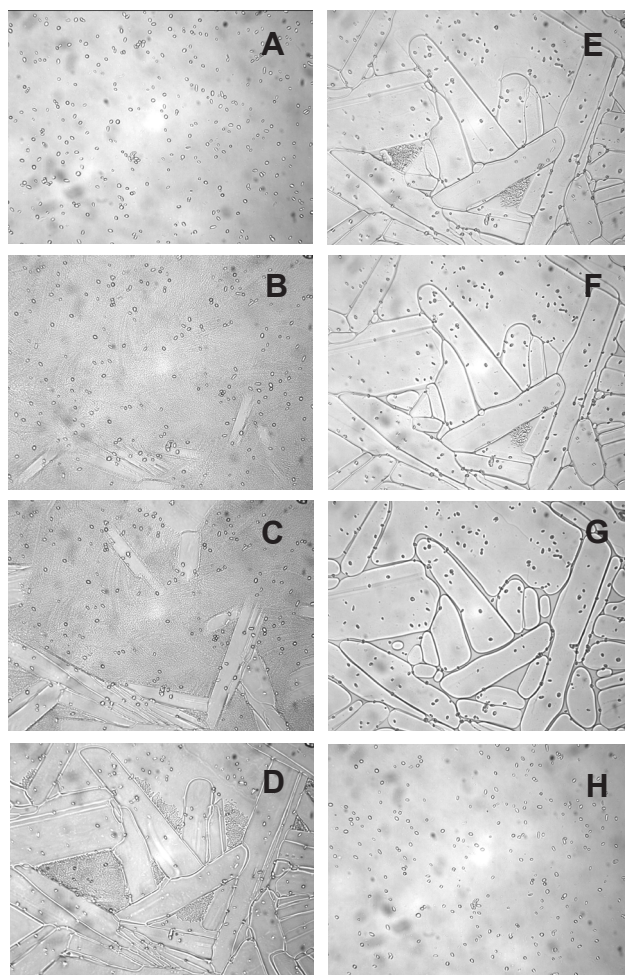


в таком состоянии вплоть до температуры  $-5,6^{\circ}\text{C}$ , при которой во включениях отмечалось появление жидкой фракции. При температуре  $-4,6^{\circ}\text{C}$  (рис. 4, G) кристаллы льда практически исчезли из поля зрения. После завершения заданной программы «охлаждения-отогрева» при температуре  $20^{\circ}\text{C}$  (рис. 4, H) объем клеток восстанавливался, а признаки морфологических нарушений отсутствовали, что свидетельствовало о сохранности дрожжей.

На рис. 5, A представлен процесс охлаждения и отогрева трехкомпонентной системы, содержащей клетки дрожжей *S. cerevisiae*, 5% ДМСО и 1% альгината натрия. В данном образце движение клеток в поле зрения отмечалось вплоть до  $-15^{\circ}\text{C}$  (рис. 5, B). При данной температуре в результате фазового перехода поле зрения мгновенно приобретало точечную структуру, на фоне которой клетки дрожжей имели большой размер. Далее следовали процессы развития кристаллов льда и формирования сети каналов (рис. 5, C). По мере продвижения фронтов роста кристаллов льда наблюдалось вытеснение точечных образований в локальные области (рис. 5, D).

На этапе отогрева в интервале от температуры стабилизации  $-40^{\circ}\text{C}$  до температуры  $-25^{\circ}\text{C}$  видимых изменений в сформированной структуре отмечено не было. Но уже начиная с температуры  $-23^{\circ}\text{C}$  (рис. 5, E) начался процесс растворения точечных образований, который практически завершился при температуре  $-15^{\circ}\text{C}$  (рис. 5, F). Параллельно наблюдался также процесс плавления крупных кристаллов льда, о чем свидетельствовали появление жидкой фракции между границами кристаллических зерен и последующее увеличение ее объема. Область интенсивного плавления кристаллов льда соответствовала температурному интервалу  $-5,0 \dots -3,5^{\circ}\text{C}$  (рис. 5, G). После отогрева образца при температуре  $20^{\circ}\text{C}$  клетки дрожжей выглядели сохранными. Характерных образований жидких включений при развитии кристаллов льда в данной системе не наблюдалось (рис. 5, H).

Согласно представлениям классической теории фазовых переходов в конденсированных системах распад метастабильного состояния «жидкость–кристалл» обусловлен наличием зародышей критического размера, возникновение которых носит вероятностный характер и зависит от движущей силы процесса переохлаждения как  $1/\Delta T$ . Экспериментально показано, что скорость зародышеобразования является действительно функцией переохлаждения и имеет максимум при некоторой определенной для каждого раствора температуре [8].



**Рис. 5.** Процесс охлаждения-отогрева суспензии клеток *S. cerevisiae* в двухкомпонентном криозащитном растворе 1% альгината натрия и 5% ДМСО: **A** – контроль; **B** –  $\downarrow T = -15^{\circ}\text{C}$ ; **C** –  $\downarrow T = -17,4^{\circ}\text{C}$ ; **D** –  $\downarrow T = -40^{\circ}\text{C}$ ; **E** –  $\uparrow T = -23^{\circ}\text{C}$ ; **F** –  $\uparrow T = -15^{\circ}\text{C}$ ; **G** –  $\uparrow T = -5^{\circ}\text{C}$ ; **H** –  $\uparrow T = 20^{\circ}\text{C}$ , 200 мкм.

**Fig. 5.** Cooling-warming of *S. cerevisiae* cell suspension in a two-component cryoprotective solution of 1% sodium alginate and 5% DMSO: **A** – control; **B** –  $\downarrow T = -15^{\circ}\text{C}$ ; **C** –  $\downarrow T = -17,4^{\circ}\text{C}$ ; **D** –  $\downarrow T = -40^{\circ}\text{C}$ ; **E** –  $\uparrow T = -23^{\circ}\text{C}$ ; **F** –  $\uparrow T = -15^{\circ}\text{C}$ ; **G** –  $\uparrow T = -5^{\circ}\text{C}$ ; **H** –  $\uparrow T = 20^{\circ}\text{C}$ , 200  $\mu\text{m}$ .

ded at  $-15^{\circ}\text{C}$  (Fig. 5F). The melting of large ice crystals was observed simultaneously, as evidenced by the appearance of liquid fraction between the boundaries of crystalline grains and a subsequent increase in its volume. The area of intensive melting of ice crystals corresponded to the temperature interval of  $-5.0 \dots -3.5^{\circ}\text{C}$  (Fig. 5G). After sample warming up to  $20^{\circ}\text{C}$ , the yeast cells appeared intact. No characteristic liquid inclusions were observed during ice crystal development in this system (Fig. 5H).

According to the notions of the classical theory of phase transitions in the condensed systems, the disruption of metastable «liquid-crystal» state is caused by the presence of critical-size nuclei, the occurrence of which is probabilistic and depends

Следует отметить, что в трехкомпонентной системе (клетки + 5% ДМСО + 1% альгината натрия) в том же объеме образцов (1 мл) водной фракции было меньше, чем в предыдущих двухкомпонентных системах. В связи с зародышеобразованием при температуре  $-15^{\circ}\text{C}$  в трехкомпонентной системе одновременно резко возросла концентрация маточного раствора. Не исключено, что концентрация альгината натрия при этом достигала критической точки, и он выпадал в виде гранул. При отогреве фракции гранулы постепенно растворялись и практически исчезали в температурной зоне около ( $-15^{\circ}\text{C}$ ).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об изменении кристаллической структуры в образцах, замороженных в альгинатсодержащих криозащитных средах, по сравнению с образцами под защитой ДМСО. Образование геля альгината натрия, наблюдаемое при охлаждении, могло происходить за счет небольшой примеси солей поливалентных металлов в полимере с невысокой степенью чистоты. Вследствие криоконцентрирования и полимера, и таких ионов может быть достигнута критическая концентрация гелеобразования [2].

### Выводы

Присутствие в криозащитной среде альгината натрия изменяет характер кристаллизации и смещает зону фазовых переходов в область более низких температур. Начало фазовых превращений в образцах, замороженных в 5%-м растворе ДМСО, наблюдалось при температуре  $-8,5^{\circ}\text{C}$ , а в образцах, содержащих 1% альгинат натрия, – при  $-16^{\circ}\text{C}$ , в трехкомпонентной системе, содержащей комбинацию 1% альгината натрия и 5% ДМСО, – при  $-15^{\circ}\text{C}$ . Принимая во внимание полученные экспериментальные данные, можно сделать вывод о том, что коллоидные растворы и гель альгината натрия образуют при замораживании высоковязкую межклеточную среду, которая выполняет функцию механического барьера, предохраняющего клетки от повреждений кристаллами льда.

### Литература

1. Аксенова ПВ, Айбазов АММ, изобретатели; Государственное научное учреждение Ставропольский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства Российской академии сельскохозяйственных наук, патентообладатель. Среда консервирования спермы козлов. Патент России № 2010118373А. 05.06.2010.
2. Базелин СА, Ерофеев БВ, Подобаев НИ. Основы физической и коллоидной химии. Москва: Просвещение; 1975. 398 с.

on the driving force of supercooling as  $1/\Delta T$ . It was experimentally demonstrated that the rate of nucleation was really the function of supercooling and had the maximum at the certain temperature, determined for each solution [13].

It should be noted that in three-component system (cells + 5% DMSO + 1% sodium alginate) in the same volume of samples (1 ml) the water fraction was less than in previous two-component systems. Due to the nucleation at  $-15^{\circ}\text{C}$ , the concentration of the mother liquor increased simultaneously sharply in a three-component system. It is possible that the concentration of sodium alginate reached a critical point in this case, and it precipitated in the form of granules. When the fraction was warmed, the granules were gradually dissolved and virtually disappeared at temperature around  $-15^{\circ}\text{C}$ .

Thus, our findings testify to a change in crystal structure in the samples, frozen in alginate-containing cryoprotective media, if compared to samples under DMSO protection. The sodium alginate gel formation, observed during cooling, could occur due to a small admixture of polyvalent metal salts inside the polymer with a low degree of purity.

### Conclusions

The presence of sodium alginate in cryoprotective medium alters the crystallization character and shifts the phase transition area towards lower temperatures. The onset of phase transformations in the samples, frozen in 5% DMSO solution was noted at  $-8.5^{\circ}\text{C}$ , and in those containing 1% sodium alginate and in a three-component system, containing a combination of 1% sodium alginate and 5% DMSO it occurred at  $-16$  and  $-15^{\circ}\text{C}$ , respectively. Taking into account the experimental findings, we may conclude that the colloidal solutions and sodium alginate gel form a highly viscous intercellular medium during freezing, which acts as a mechanical barrier, protecting cells against damages by ice crystals.

### References

1. Aksenova PV, Aibazov AMM, inventors; State Scientific Institution Stavropol Scientific Research Institute of Livestock and Feed Production of the Russian Academy of Agricultural Sciences (RU), assignee. [Preservation medium for goat sperm]. Patent RU 2010118373A, 2010 Jun 05. Russian.
2. Balezin SA, Erofeev BV, Podobayev NI. [Fundamentals of physical and colloid chemistry]. Moscow: Prosvescheniye; 1975. 398 p. Russian.
3. Belous AM, Gordienko EA, Rozanov LF. [Freezing and cryoprotection]. Moscow: Vysshaya Shkola; 1987. 398 p. Russian.
4. Belous AM, Shrago MI, Pushkar NS. [Cryopreservatives]. Kyiv: Naukova Dumka; 1979. 198 p. Russian.



3. Белоус АМ, Гордиенко ЕА, Розанов ЛФ. Замораживание и криопротекция. Москва: Высшая школа; 1987. 80 с.
4. Белоус АМ, Шраго МИ, Пушкарь НС. Криоконсерванты. Киев: Наукова думка; 1979. 198 с.
5. Большакова ЛС, Литвинова ЕВ, Жмурина НД, Бурцева ЕИ. Влияние различных технологических факторов на реологические характеристики альгинатных гелей. Современные проблемы науки и образования [Интернет]. 2012; (6). [Цитировано 9.07.2018]. Доступно на: [www.science-education.ru/106-8024](http://www.science-education.ru/106-8024).
6. Гурина ТМ, Высеканцев ИП, Полякова АЛ. Влияние скорости охлаждения в области эвтектической температуры водного раствора криопротектора на жизнеспособность клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013; 24(1): 15–26.
7. Егорова НС. Практикум по микробиологии. Москва: МГУ; 1976. 307 с.
8. Козлова ОГ. Морфогенетический анализ кристаллов. Москва: МГУ; 1991. 224 с.
9. Кулешова Л.Г. Криомикроскопический комплекс для криобиологических исследований. Цитология. 2004; 46(9): 809–10.
10. Пономарева ВЛ, Высеканцев ИП, Гурина ТМ, Онасенко ЕС. Изучение влияния режимов охлаждения и защитных сред, содержащих альгинат натрия, на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Вісник проблем біології і медицини. 2011; (1): 35–7.
11. Щипунов ЮА, Конева ЕЛ, Постнова ИВ. Гомогенные гели альгината: фазовое поведение и реологические свойства. Высокомолекулярные соединения. 2002; 44(6): 1201–11.
12. Юсова АА, Гусев ИВ, Липатова ИМ. Свойства гидрогелей на основе альгината натрия с другими полисахаридами природного происхождения. Химия растительного сырья. 2014; (4): 59–66.
13. Breunig HG, König K. Two-photon imaging of intact living plants during freezing with a flexible multiphoton tomography. Laser Physics Letters [Internet]. 2015; [Cited 2018 Aug 21]; 12(2): 025601. Available from: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1612-2011/12/2/025601/meta>.
14. Fuller B, Green C, Greschenko VI. Cryopreservation for cell banking: current concepts at the turn of the 21st century. Problems of Cryobiology. 2003; (2): 62–83.
15. Han B, Bischof JC. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. Cryobiology. 2004; 48(1): 8–21.
16. Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and Potential applications. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2002; 3: 39–48.
17. König K, Uchugonova A, Breunig HG. High-resolution multiphoton cryomicroscopy. Methods. 2014; 66(2): 230–6.
18. Mazur P, Cole KW. Roles of unfrozen fraction salt concentration and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. Cryobiology. 1989; 26(1): 1–29.
19. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1984; 247(3): 125–42.
20. Polezhaeva TV, Zaitseva OO, Khudyakov AN, et al. Use of pectin polysaccharides for cryopreservation of biological objects. Arch. Biol. Sci. 2014; 66(3): 1025–33.
5. Bolshakova LS, Litvinova EB, Zhmurina ND, Burtseva EI. [The influence of various technological factors on rheological characteristics of alginate gels]. Sovremennyye Problemy Nauki i Obrazovaniya [Internet]. 2012; (6); [Cited Jul 9 2018] Available from: <http://www.science-education.ru/106-8024>. Russian.
6. Breunig HG, König K. Two-photon imaging of intact living plants during freezing with a flexible multiphoton tomography. Laser Physics Letters [Internet]. 2015; [Cited 2018 Aug 21]; 12(2): 025601. Available from: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1612-2011/12/2/025601/meta>.
7. Egorova NS. [Practical course on microbiology]. Moscow: Moscow State University; 1976. 307 p. Russian.
8. Fuller B, Green C, Greschenko VI. Cryopreservation for cell banking: current concepts at the turn of the 21st century. Problems of Cryobiology. 2003; (2): 62–83.
9. Gurina TM, Vysekantsev IP, Polyakova AL. Influence of speed of cooling in area of eutectic um temperature of water solution of cryoprotectant on viability of cages of *Saccharomyces cerevisiae*. Probl Cryobiol Cryomed. 2013; 24(1): 15–26.
10. Han B, Bischof JC. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. Cryobiology. 2004; 48(1): 8–21.
11. Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. Curr Issues Intest Microbiol. 2002; 3: 39–48.
12. König K, Uchugonova A, Breunig H. G. High-resolution multiphoton cryomicroscopy. Methods. 2014; 66(2): 230–6.
13. Kozlova OG. [Morphogenic analysis of crystals]. Moscow: Moscow State University; 1991. 224 p. Russian.
14. Kuleshova LG. Cryomicroscopic complex for cryobiological studies. Tsitologiya. 2004; 46(9): 809–10.
15. Mazur P, Cole KW. Roles of unfrozen fraction salt concentration and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. Cryobiology. 1989; 26(1): 1–29.
16. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol Cell Physiol. 1984; 247(3): 125–42.
17. Ponomareva VL, Vysekantsev IP, Gurina TM, Onasenko ES. [Study of the influence of cooling regimes and protective media containing sodium alginate on the viability of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae*]. Bulletin of Problems Biology and Medicine. 2011;(1): 35–7. Russian.
18. Polezhaeva TV, Zaitseva OO, Khudyakov AN, et al. Use of pectin polysaccharides for cryopreservation of biological objects. Arch Biol Sci. 2014; 66(3): 1025–33.
19. Shchipunov YA., Koneva EL, Postnova IV. [Homogeneous alginate gels: phase behavior and rheological properties]. Polymer Sciences Series A. 2002; 44(6): 1201–11. Russian.
20. Yusova AA, Gusev IV, Lipatova IM. [Properties of the hydrogels based on a mixture of sodium alginate with other polysaccharides of natural origin]. Khimiia Rastitel'nogo Syr'ia. 2014; (4): 59–66.

