



УДК 582.282.232:615.014.41

## СОХРАННОСТЬ СВОБОДНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В АЛЬГИНАТНОМ ГЕЛЕ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПОСЛЕ ХРАНЕНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

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

*Институт проблем криобиологии и  
криомедицины НАН Украины, Харьков*

*E-mail: viktoriia-may@mail.ru*

В статье представлены экспериментальные данные, полученные при сравнительной оценке влияния различных температур хранения на жизнеспособность свободных и иммобилизованных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Выявлены и обоснованы возможные механизмы криоповреждения и криозащиты клеток, для решения ряда практических задач связанных с повышением надежности и эффективности технологии консервации дрожжей. Установлено, что наиболее эффективным было хранение при температурах -80 и -196°C. В процессе хранения при 4°C выявлено временное увеличение количества колониеобразующих единиц, связанное с индукцией формирования аскоспор диплоидными клетками.

Ключевые слова: дрожжи, иммобилизация, жизнеспособность, низкотемпературные процессы.

### Введение

В биотехнологических производствах и в научных исследованиях, посвященных созданию новых векторных систем, широко используют дрожжи. С помощью штаммов-продуцентов на основе дрожжей в настоящее время получают аминокислоты, витамины, органические кислоты, антибиотики, гормоны и различные биологически активные вещества [1–3]. Все шире в технологических линиях применяют гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных дрожжевых клеток, которые имеют ряд экономических и экологических преимуществ. Нативные и модифицированные клетки дрожжей, иммобилизованные в носителях, используют в пищевой и фармацевтической промышленности, ветеринарии и сельском хозяйстве.

Для хранения стартовых культур микроорганизмов-продуцентов, промежуточных продуктов биотехнологических производств, медицинских и ветеринарных препаратов, а также пищевых продуктов, содержащих микроорганизмы, применяют гипотермическое хранение и хранение при умеренно низких температурах [1]. Для долгосрочного хранения коллекций микроорганизмов и некоторых коммерческих препаратов, содержащих микробные клетки, применяют лиофилизацию и криоконсервирование. Несмотря на то, что в настоящее время криобиологи имеют в своем распоряжении достаточно большое количество методов, позволяющих либо снизить отрицательное действие повреждающих факторов низких температур, либо полностью избежать некоторых из них, совершенствование старых и создание новых методов консервирования по-прежнему является актуальной проблемой в прикладной микробиологии [2].

Помимо прикладного значения исследование влияния низких температур на иммобилизованные дрожжевые клетки представляет значительный теоретический интерес, т.к. морфофункциональные особенности, метаболизм дрожжей позволяют изучать тонкие механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов в гелевых матрицах. Влияние низкотемпературного хранения на клетки дрожжей, иммобилизованных в гелевых носителях, изучено мало.

Цель работы – сравнительное изучение жизнеспособности свободных и иммобилизованных в геле альгината натрия клеток дрожжей *S.cerevisiae* после хранения при различных температурах.

### Объекты и методы исследования

Объектом исследования были дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (раса получена из РНИИ хлебопекарской промышленности, г. Санкт – Петербург). Дрожжи культивировали по стандартной методике в неохмеленном пивном сусле (8°Б), при 30°C с аэрацией, до начала стационарной фазы роста. Иммобилизацию клеток в геле альгината натрия (Foodchem International Corporation, Китай) проводили по методу, предложенному в [4]. Хранили образцы в холодильных камерах при температурах 4; -20; -80°C. Часть образцов замораживали погружением в жидкий азот (-196°C). При охлаждении образцов до -20 и -80°C были реализованы неконтролируемые скорости охлаждения в холодильных камерах. Деполимеризацию гранул



проводили в 4%-ном водном растворе ЭДТА (Simagchem Corporation, Китай). [5]. Жизнеспособность дрожжей *S.cerevisiae* оценивали по двум критериям: 1 – по способности образовывать макроколонии на поверхности агаризованных сред («чашечный» метод Коха); 2 – по дыхательной активности клеток (ТТС – тест) [6,7]. Дыхательную активность клеток определяли по количеству восстановленного в формазан хлорида тетразолия (Aikon, Китай) спектрофотометрически. Интенсивность окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 490нм на спектрофотометре «Pye Unicam SP-8000» (Англия). Количество формазана определяли, используя молярный коэффициент экстинкции – 20200. Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы *Excel*.

### Результаты и их обсуждение

В ходе исследований были проведены две серии экспериментов. В первой серии исследовали жизнеспособность свободных и иммобилизованных клеток после краткосрочного хранения в течение 36 сут, при температуре 4°C. Свободные клетки были суспендированы в деионизированной воде и в пивном сусле, альгинатные гранулы с иммобилизованными в них клетками – в сухом виде и в деионизированной воде. После хранения суспензии свободных клеток в деионизированной воде количество КОЕ/мл через 8 сут снизилось до  $78 \pm 4.5\%$ . На 15-е и 20-е сутки количество КОЕ/мл повышалось соответственно до  $92.9 \pm 7.3$  и  $105 \pm 8.5\%$ , а на 36-е сутки хранения снизилось до  $71.9 \pm 5.3\%$ . Количество КОЕ/мл в образцах суспензии клеток в пивном сусле через 8 сут не изменилось, через 15 и 20 сут повышалось соответственно до  $120 \pm 8.7$  и  $135 \pm 9.8\%$  и через 36 сут снизилось до значений исходного контроля.

После хранения альгинатных гранул с иммобилизованными клетками в деионизированной воде количество КОЕ/мл в течение 15 сут не изменялось, через 20 сут повысилось до  $124 \pm 4.5\%$  и через 36 сут снизилось до значений исходного контроля. В сухих гранулах количество КОЕ/мл через 8 сут хранения не изменялось. При последующем хранении количество КОЕ/мл повысилось через 20 сут до  $157 \pm 9.7\%$  и через 36 сут снизилось до  $140 \pm 8.2\%$  (рис.1).

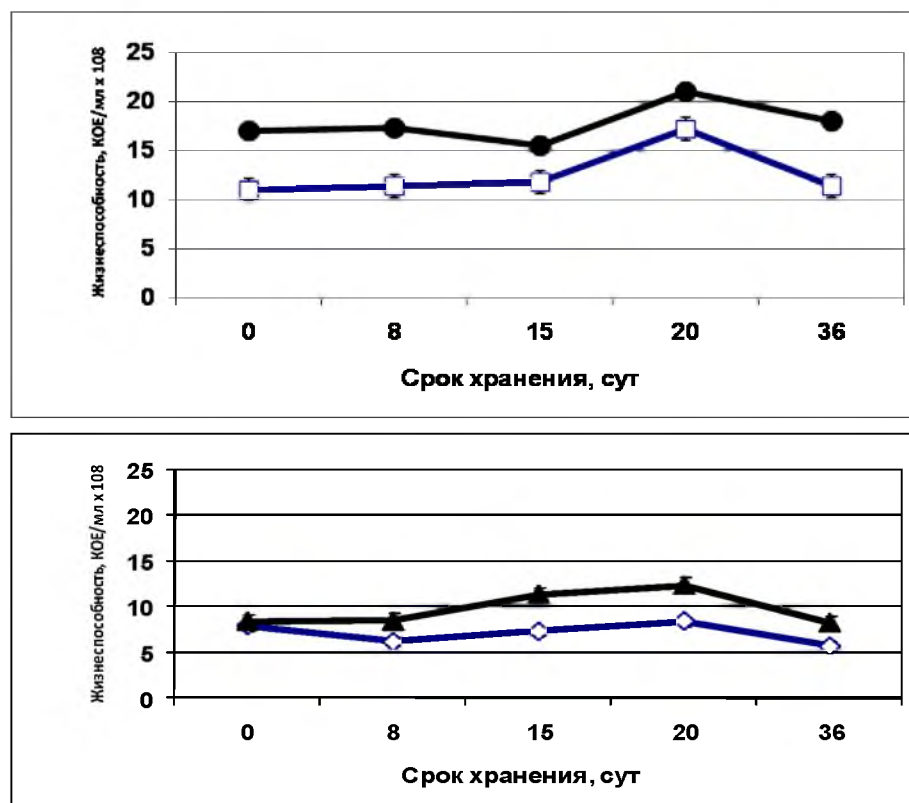


Рис. 1. Способность к колониеобразованию у дрожжей *S. cerevisiae* после хранения в течение 36 сут при 4°C: ● – сухие гранулы, □ – гранулы в деионизированной воде, ▲ – суспензия в пивном сусле, ◇ – суспензия в деионизированной воде

Во второй серии экспериментов изучали жизнеспособность свободных и иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* после хранения в течение 6 мес при температурах 4; -20; -80; -196°C. Свободные клетки были суспендированы в дистиллированной воде, альгинатные гранулы с иммобилизованными клетками были в сухом виде. Жизнеспособность клеток при 4°C в этих экспериментах были аналогична результатам предыдущих экспериментов. После хранения свободных клеток в дистиллированной воде количество КОЕ/мл через сутки снизилось до

86.14±6.7%, через 10 дней повысилось до 109.47±9.4%, через 20 дней – до 116.12±8.6%. При последующем хранении количество КОЕ/мл понижалось и составляло на 180-е сутки 54.55±3.67% от исходного контроля. Количество КОЕ/мл в образцах иммобилизованных клеток на 20-е сутки хранения было значительно выше исходных показателей и составляло соответственно 164.2±3.6%. Далее с увеличением срока хранения происходило снижение этого показателя до 91.6±4.84% через 6 месяцев гипотермического хранения.

После хранения при температуре -20°C количество КОЕ/мл в образцах свободных клеток дрожжей *S.cerevisiae* через сутки снизилось до 47,02±1,7% от исходного контроля. С увеличением сроков хранения количество жизнеспособных клеток продолжало снижаться и составило через 180 дней 2.49±0.53%. В образцах с иммобилизованными клетками количество КОЕ/мл через сутки снизилось до 66.45±1.56%. При последующем хранении количество жизнеспособных иммобилизованных клеток продолжало снижаться и составило через 180 дней 13,46±0,93%.

При температуре -80°C показатель жизнеспособности в образцах свободных клеток через сутки снизился до 53.74±2.71%, через 10 сут – до 32.07±1.32% и оставался на этом уровне до 30 сут хранения. В последующие 40-180 сут хранения число КОЕ/мл снижалось соответственно до 16.83±1.1 и 16.37±1.7%. В образцах иммобилизованных клеток наблюдали снижение жизнеспособности через сутки до 77.69±1.88%, а через 10 сут – до 54.64±1.47%. В процессе последующего хранения дополнительная гибель иммобилизованных дрожжевых клеток не происходила (рис. 2).

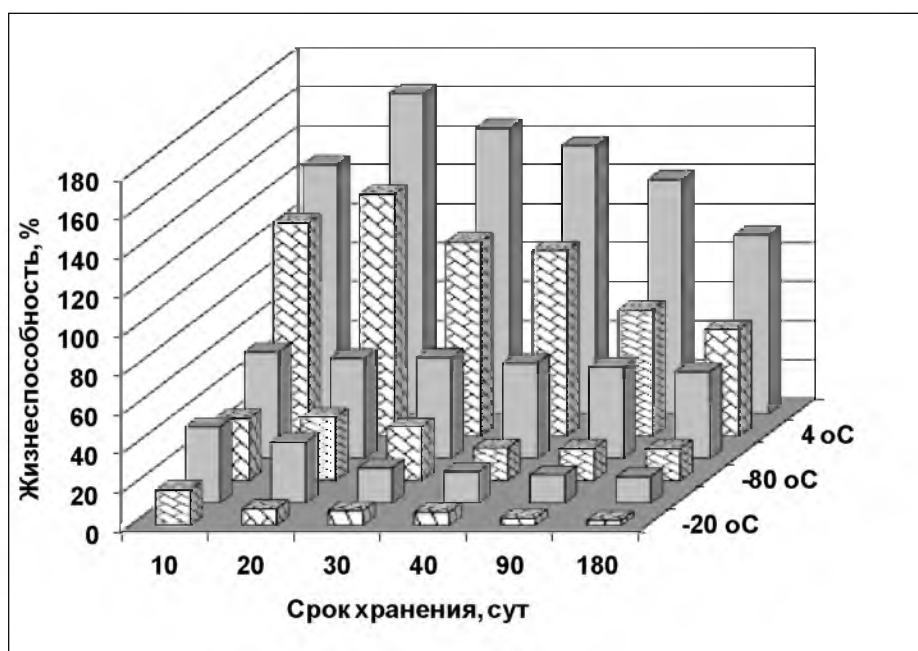


Рис.2. Жизнеспособность клеток дрожжей *S.cerevisiae* после хранения при различных температурах: – суспензия свободных клеток; – иммобилизованные клетки

В образцах свободных и иммобилизованных клеток, хранившихся при -196°C, гибель происходила только на этапах замораживания – оттаивания. Количество КОЕ/мл в образцах свободных клеток через сутки составляло 5.52±0.47%, в образцах иммобилизованных клеток – 1.10±0.28%. Через 180 сут количество КОЕ/мл в образцах свободных и иммобилизованных клеток не изменилось.

Полученные результаты подтверждают предположение, установленное нами ранее, что при высоких скоростях охлаждения происходит нарушение целостности структуры альгинатных гранул, что является дополнительным повреждающим фактором гибели иммобилизованных клеток.

Анализ показателей жизнеспособности клеток дрожжей *S. cerevisiae* свидетельствует о различиях в реакции клеток на повреждающие факторы, воздействующие на клетки при 4°C и температуре ниже 0°C. Исследуемые нами образцы находились в разных температурных зонах, вызывающих те или иные изменения в структурно-функциональном состоянии клеток и оказывающих определенное влияние на обмен веществ и другие показатели жизнеспособности.



Общеизвестно, что механизмы летальных повреждений клеток различного уровня организации при температурах ниже  $0^{\circ}\text{C}$  и при субнулевых температурах различаются. При замораживании ниже  $0^{\circ}\text{C}$  повреждения клеток связаны с процессами кристаллообразования льда внутри клеток и во внеклеточной среде. Помимо возможного механизма повреждения клеток кристаллами льда ведущую роль в криоповреждениях отводят осмотическим градиентам, процессам дегидратации, приводящим к уменьшению их объема, гиперконцентрации солей, изменению значения pH внутриклеточной среды и некоторым другим факторам [8].

Механизмы летальных повреждений клеток при температурах близких к  $0^{\circ}\text{C}$  связаны не с процессами кристаллообразования льда, а с температурозависимыми и пролонгированными по времени изменениями свойств и структур клеток [8]. При этом у разных по строению клеток (бактерий, дрожжей, эритроцитов, гепатоцитов, перевиваемых клеток эукариот) преобладают те или иные изменения структур и функций клеток. Общими из них являются ослабление гидрофобных взаимодействий и фазовые переходы аннулярных липидов в мембранах, нарушение транспорта кислорода и метаболитов, воды, ионов и биомолекул, поддерживающих нормальный уровень метаболизма. Эти нарушения приводят к изменению системы синтеза белков, нуклеиновых кислот и процессов энергопродукции, активации мембранных фосфолипидов [9,10]. Можно было предполагать, что во всех образцах с клетками *S.cerevisiae*, хранившимися при  $4^{\circ}\text{C}$ , будет происходить постепенное снижение количества КОЕ/мл. Однако во всех проведенных экспериментах при хранении, как клеточных суспензий, так и альгинатных гранул с иммобилизованными в них клетками мы наблюдали временное повышение числа КОЕ/мл, превышающее показатели исходного контроля. В образцах с суспензиями клеток максимальное повышение числа КОЕ/мл было в пивном сусле, в образцах с иммобилизованными клетками – в сухих гранулах. Наиболее вероятным объяснением наблюдаемого явления может быть видовая особенность биологии дрожжей *S.cerevisiae* [11]. Популяция дрожжей состоит из клеток гаплоидной и диплоидной форм, размножающихся вегетативным путем. Показано, что если диплоидные клетки перенести в обедненную среду или среду, содержащую индуктор споруляции, а также подвергнуть воздействию стресса, в том числе и низких температур, они переходят в стадию спорообразования [12]. Клетка превращается в аск, содержащий 4 аскоспоры. Аскоспоры устойчивы к воздействию различных физико-химических факторов. В экспериментах использовали дрожжи, выращенные на богатой питательной веществами среде и имеющие хорошо развитую клеточную стенку, которая при указанных выше условиях модифицируется и выполняет функцию стенки аска. Хранение клеток в течение первых 10 сут при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  индуцировало в диплоидных клетках образование аскоспор, и при высеве образцов на агаризованной среде формировалось большее количество макроколоний, состоящее из жизнеспособных клеток и аскоспор. Гибель клеток в деионизированной воде была максимальной, а суммарное число КОЕ/мл – минимальным. В пивном сусле и в гранулах альгинатного геля жизнеспособность клеток была выше, и увеличивалось суммарное число колоний, сформированных клетками и аскоспорами. Количество жизнеспособных клеток и аскоспор в сухих гранулах альгината превышало соответствующие показатели во взвеси гранул в деионизированной воде. При увеличении сроков хранения суспензии клеток в дистиллированной воде до 90 сут, а в сухих гранулах – до 180 сут количество жизнеспособных клеток начинало снижаться до значений, при котором суммарное число КОЕ/мл уменьшалось по сравнению с исходным контролем.

Жизнеспособность клеток после замораживания зависит от большого количества физико-химических факторов: кристаллообразования и рекристаллизации воды, осмотических градиентов, гиперконцентрации электролитов, изменений pH, фазовых переходов в мембранах и др. Выраженность этих факторов напрямую зависит от фазовых и фазово-структурных превращений внутри- и внеклеточной воды [13].

Наиболее низкие показатели жизнеспособности клеток имели образцы, хранящиеся при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . При данной температуре клетки дрожжей находились в зоне кристаллизации охлажденной вне- и внутриклеточной воды и перехода биообъекта в состояние неполного анабиоза [14]. Полученные результаты можно объяснить тем, что эвтектическая температура многих солей находится ниже  $-20^{\circ}\text{C}$  и клетки, хранящиеся при этой температуре, подвергаются длительному воздействию кристаллических структур и жидкой фазы из гиперконцентрированных растворов электролитов.

Температура  $-80^{\circ}\text{C}$  – это зона кристаллизации фракции связанной воды и рекристаллизационных процессов [15]. Количество жизнеспособных клеток в образцах, хранящихся при этой температуре на протяжении 180 сут (срок наблюдения), было выше, чем при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Число КОЕ/мл снижалось дважды. Первый раз в процессе охлаждения (результаты сохранности через 1 сут), второй раз – через 10 сут. Очевидно, что первое, наиболее выраженное снижение количества жизнеспособных клеток произошло за счет кристаллизационных процессов внутри -



и внеклеточной воды на этапе замораживания до  $-80^{\circ}\text{C}$  и второе – за счет кристаллизационных процессов во фракции связанной воды. Гелевая матрица, иммобилизованных клеток дрожжей, на этапе охлаждения до  $-20$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  и при последующем хранении при этих температурах обеспечивала защитное действие. Показатель жизнеспособности иммобилизованных клеток был значительно выше, чем у свободных клеток в суспензии. При замораживании до  $-196^{\circ}\text{C}$  гибель клеток и в суспензии, и в иммобилизованном состоянии происходила только на этапах замораживания – оттаивания. При последующем хранении в течение 180 сут гибель клеток отсутствовала. Образцы, погруженные в жидкий азот, находились в температурном интервале завершения кристаллизации и отсутствия рекристаллизационных процессов, перехода льда в стекловидное состояние. Поскольку в исследовании мы использовали замораживание погружением в жидкий азот с быстрой скоростью охлаждения, выживаемость клеток после процесса замораживания в жидком азоте была ниже по сравнению с замораживанием до  $-20$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  в холодильных камерах с более медленными скоростями охлаждения. Ранее нами было показано, что медленное замораживание до  $-196^{\circ}\text{C}$  по двухэтапным программам (со скоростью 1 и  $5^{\circ}/\text{мин}$  до  $-40^{\circ}\text{C}$  с последующим погружением в жидкий азот) обеспечивает почти 100%-ную сохранность клеток *S.cerevisiae*, иммобилизованных в альгинатном геле [В.Л. Пономарева, 16]. Естественно, что при использовании медленных скоростей охлаждения показатель жизнеспособности после замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  был бы значительно выше полученных в данной экспериментальной работе.

Проведенные исследования представляют практический интерес, так как иммобилизация клеток в альгинатном геле и оптимально подобранные температуры хранения позволяют достичь высокой степени жизнеспособности клеток дрожжей без использования криопротекторов. Это особенно важно в отношении дрожжей *S.cerevisiae*, которые в дальнейшем будут использованы в пищевой промышленности, поскольку многие из криопротекторов токсичны для организма животных и человека.

### Заключение

Таким образом, в ходе исследования представлен эффективный метод хранения клеток дрожжей *S.cerevisiae* при различных температурах. Показано, что иммобилизованные клетки дрожжей *S.cerevisiae* лучше сохраняются по сравнению со свободными клетками, суспендированными в дистиллированной воде. Гибель клеток *S.cerevisiae*, хранящихся при  $-20^{\circ}\text{C}$ , происходит в течение всего процесса хранения. При температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  на этапах замораживания – оттаивания и в течение первых 10 сут хранения. При  $-196^{\circ}\text{C}$  гибель клеток происходит только на этапах замораживания – оттаивания. Установлено, что при гипотермическом хранении ( $4^{\circ}\text{C}$ ) иммобилизованных и свободных клеток дрожжей *S.cerevisiae* происходит временное повышение количества колоний, связанное с индукцией образования аскоспор диплоидными клетками, которые и формируют дополнительные колонии.

### Список литературы

1. Morgan C. A. Preservation of microorganisms by drying: A review. // J. of Microbiological Methods. – 2006. – Vol. 66. – № 2. – P. 183–193.
2. Espinel-Ingroff A. Long-Term Preservation of Fungal Isolates in Commercially Prepared Cryogenic Microbank Vials // J. of Clinical Microbiology. – 2004. – Vol. 42. – №3. – P. 1257–1259.
3. Ghidoni I., Chlapanidas T., Bucco M. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine // J. Cytotechnology. – 2008. – Vol. 58. – №1. – P. 49–56.
4. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. – М.: МГУ, 1994. – С. 162.
5. Thu B., Smidsrød O., Skjåk-Bræk G. Alginate gels – Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells // J. Progress in Biotechnology. – 1996. – Vol.11. – P. 19–30.
6. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. – Пушкино, 1990. – 186с.
7. Otero A.J., Rodrigues J., Falero G. 2,3,5 – triphenyl tetrazolium chloride (TTC) reduction as potential growth phase marker for mammalian cells in culture and for myeloma hybridization experiments // J.Cytotechnology. – 1991. – Vol.6. – №2. – P. 137–142.
8. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – К.: Наукова думка, 1982. – 256с.
9. Chapman D., Gomez-Fernandez J.E., Coni F.M. Intrinsic protein lipid interactions. Physical and biochemical evidence // FEBS Lett. – 1979. – Vol.98. – №2. – P. 211–223.
10. Lee A.G. Functional properties of biological membranes // J.Biochemistry. – 1974. – Vol.13. – №18. – P. 3699–3705.
11. Берри Д. Биология дрожжей. – М.: Мир, 1985. – 96с.
12. Бабаева И.П. Биология дрожжей. – М.: Мир, 1992. – 96с.



13. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 1984. – Vol. 247. – №3. – P. 125–142.
14. Белоус А.М., В.И. Грищенко Криобиология. – К: Наук. думка, 1994. – 431с.
15. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К: Наук. думка, 1994. – 142с.
16. Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Гурина Е.М., Онасенко Е.С. Изучение влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, иммобилизованных в альгинатном геле // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Вип.2. – Т.1 (92). – С. 14–17.

## **PRESERVATION OF FREE AND ALGINATE GEL IMMOBILIZED *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEASTS FOLLOWING STORAGE AT DIFFERENT TEMPERATURES**

**V.L. Ponomarova,  
I.P. Vysekantsev, E.S. Onasenko**

*Institute for problems of Cryobiology  
and Cryomedicine of the National  
Academy of Sciences of Ukraine, Khar-  
kov, 61000, Ukraine*

*E-mail: viktoriia-may@mail.ru*

The paper presents experimental results obtained after a comparative assessment of the influence of different storage temperatures on the viability of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* yeasts cells. Possible mechanisms of cells cryodamage and cryoprotection are identified and proved to solve some practical problems associated with increased reliability and efficiency of yeasts preservation technology. It was established that the most effective storage temperature was -80 and -196 °C. Temporary increase in the number of colony forming units, associated with induction of forming ascospores by diploid cells was revealed during storage at 4 °C.

Keywords: yeasts, immobilization, viability, cryopreservation, low-temperature processes.