

## Криоконсервирование дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* без использования традиционных криозащитных средств

В.Л. Пономарева, Л.Г. Кулешова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Cryopreservation of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells Without Conventional Cryoprotective Agents

V.L. Ponomareva, L.G. Kuleshova

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

В настоящее время особую актуальность приобрели исследования по разработке эффективных методов низкотемпературного хранения без использования классических криопротекторов.

Цель исследования – разработка эффективных способов низкотемпературного консервирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* без традиционных защитных средств.

Объектом исследования были клетки дрожжей *S. cerevisiae*. В первой серии экспериментов замораживали клетки дрожжей, суспендированные в 5%-м растворе ДМСО и взвешенные в 1%-м альгинатном геле. Контролем служила суспензия клеток в дистиллированной воде. Образцы замораживали со скоростями охлаждения 1, 5, 10, 15 град/мин до  $-40^{\circ}\text{C}$ . Во второй серии замораживали клетки, иммобилизованные в гранулах 1%-го альгинатного геля. Часть клеток перед иммобилизацией инкубировали в течение 15 мин в 5%-м растворе ДМСО. Образцы замораживали по указанным выше программам. В третьей серии экспериментов перед иммобилизацией и замораживанием у части клеток индуцировали дополнительный синтез внутриклеточной трегалозы. Контролем были клетки без термоиндукции синтеза трегалозы. Замораживали образцы путем погружения в жидкий азот. Жизнеспособность клеток дрожжей определяли «чашечным» методом Коха. Иммобилизацию клеток в альгинатном геле проводили капельным методом. Кинетику процесса замораживания-оттаивания исследовали с помощью криомикроскопии. Внутриклеточное содержание трегалозы определяли методом жидкостной хроматографии.

Установлено, что охлаждение со скоростью 1 град/мин с последующим погружением в жидкий азот обеспечивало на исходном уровне сохранность жизнеспособных клеток и их метаболическую активность во всех экспериментальных образцах (клетки, суспендированные в 5%-м ДМСО, взвешенные в 1%-м альгинатном геле, иммобилизованные в гелевых гранулах). Увеличение внутриклеточного содержания трегалозы перед иммобилизацией значительно повышало криорезистентность дрожжевых клеток *S. cerevisiae*. После быстрого замораживания показатели жизнеспособности клеток, у которых перед иммобилизацией вызывали термоиндукцию синтеза трегалозы, повышались в 30 раз по сравнению с контролем.

Данные результаты свидетельствуют о возможности эффективного криоконсервирования дрожжевых клеток без традиционных криопротекторов с использованием геля альгината натрия. Повышение внутриклеточного содержания трегалозы на этапе культивирования обеспечивало более высокий уровень жизнеспособности клеток при быстром замораживании.

Nowadays the studies on development of the efficient methods for low temperature storage without conventional cryoprotective agents have become particularly relevant.

This research was aimed to develop the efficient ways for low temperature preservation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* without the conventional protective agents.

The research object was the yeast *S. cerevisiae* cells. In the first series of experiments the yeast cell suspensions in a 5% DMSO solution and 1% alginate gel were frozen. The cell suspension in distilled water served as the control. The samples were frozen with 1, 5, 10, 15 deg/min cooling rates down to  $-40^{\circ}\text{C}$ . In the second series, the cells were immobilised in granules of 1% alginate gel before freezing. A part of cells prior to immobilisation was incubated for 15 min in a 5% DMSO solution. The samples were frozen according to the mentioned above protocols. In the third series of experiments an additional synthesis of intracellular trehalose was induced in some cells prior to immobilisation and freezing. Cells with no thermoinduced trehalose synthesis served as the control. The samples were frozen by immersion into liquid nitrogen. The viability of yeast cells was determined by the Koch's pour plate method. The cells were immobilised in alginate gel by drop method. The kinetics of freeze-thawing process was studied with cryomicroscopy. An intracellular content of trehalose was determined by liquid chromatography.

The cooling with 1 deg/min rate followed by immersion into liquid nitrogen preserved an initial level of cell viability and their metabolic activity in all the experimental samples (cells, suspended in 5% DMSO, 1% alginate gel and immobilised in gel granules). An increased intracellular content of trehalose before immobilisation significantly augmented the cryoresistance of yeast *S. cerevisiae* cells. After rapid freezing the viability of cells, treated with thermoinduced trehalose synthesis before immobilisation, was 30 times higher than the control.

These findings testify to the possibility of efficient cryopreservation of yeast cells without conventional cryoprotective agents using instead sodium alginate gel. An increase in intracellular content of trehalose at the stage of cultivation provided a higher level of cell viability at rapid freezing.

