

Влияние состава защитных сред и температуры хранения на сохранность лиофилизированных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

А.А. ЦУЦАЕВА¹, Л.М. БАЛЫБЕРДИНА¹, Н.В. ПАВЛЕНКО²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский государственный медицинский университет

Influence of Protective Media Composition and Storage Temperature on Frozen-Dried *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Survival

TSUTSAYEVA A.A.¹, BALLYBERDINA L.M.¹, PAVLENKO N.V.²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

²Kharkov State Medical University

Изучали влияние тиомочевина как антиоксиданта в защитной среде при лиофилизации на хранение лиофилизированных культур хлебопекарных дрожжей. Тиомочевина достоверно увеличивает срок их хранения в жизнеспособном состоянии при температуре 4 и -10°C. При температуре -25 и -75° С количество жизнеспособных клеток и их свойства не изменялись.

Ключевые слова: дрожжи, лиофилизация, антиоксиданты, хранение.

Вивчали вплив тiosечовини як антиоксиданту в захисному середовищі при ліофілізації на зберігання ліофілізованих культур хлібопекарських дріжджів. Присутність тiosечовини достовірно збільшує термін їх зберігання в життєздатному стані при температурі 4 і -10°C. При температурі -25 і -75°C кількість життєздатних клітин і їх властивості не змінювались.

Ключові слова: дріжджі, ліофілізація, антиоксиданти, зберігання.

The effect of thiourea, as an antioxidant in cryoprotective medium under freeze-drying, on the baker's yeast frozen-dried culture storage, was studied. Thiourea statistically and significantly increases their storage term in a viable state under 4° and -10°C. A number of viable cells and their properties remained unchanged under -25° and -75°C.

Key words: yeast, freeze-drying, antioxidants, storage.

Лиофилизация – наиболее часто используемый в практике способ консервирования микроорганизмов, удобный для хранения и транспортировки [3,5,6]. Одним из ведущих факторов, от которого зависит количество жизнеспособных микроорганизмов, является остаточная влажность: чем она выше, тем больше сохранность микроорганизмов, тем короче срок их хранения, особенно в воздушной среде [1]. В этих условиях реализуются биохимические процессы с малой энергией активации, в том числе перекисное окисление, в результате которого накапливаются продукты, оказывающие отрицательное влияние на микроорганизмы.

Известно, что в процессе хранения микроорганизмов при низких температурах и при использовании антиоксидантов на этапах лиофилизации снижается активность или останавливаются ферментативные реакции и окислительные процессы.

Цель данной работы – изучение влияния температуры хранения в атмосфере воздуха и некоторых антиоксидантов на количество жизнеспособных лиофилизированных дрожжей.

Адрес для корреспонденции: Цуцаева А.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Перяславская, 23, Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720126, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Freeze-drying is the most frequent way used in a practice for microorganism preservation, which is suitable for storage and transportation [3,5,6]. The residual humidity is one of the leading factors on which depends a number of viable microorganisms: the higher it is, the higher is the microorganism's integrity, the shortest is their storage term, especially in air [1]. Under these conditions the biochemical processes with a low activation energy are realised, including the peroxidation, resulting in the accumulation of products with negative effect on microorganisms.

It is known, that when storing microorganisms under low temperatures and using antioxidants at the stages of freeze-drying there is the activity decrease or the enzyme reaction and oxidative process stopping.

The aim of the work was to study the effect of storage temperature in air atmosphere and some antioxidants on the viable frozen-dried yeast amount.

Materials and methods

The investigation object was the race 608 *S.cerevisiae* baker's yeast. The yeast were cultured

Address for correspondence: Tsutsayeva A.A., Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720126, fax: +38 (057) 77200084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua.

Материалы и методы

Объектом исследования служили хлебопекарные дрожжи *S. cerevisiae* расы 608. Дрожжи выращивали 48 ч при температуре 30°C на скошенной сусло-агаровой среде, переводили в жидкую питательную среду УЕРД и культивировали в ней с аэрацией 24 ч до начала стационарной фазы роста. Затем клетки дрожжей осаждали центрифугированием и переводили в защитную среду, состоящую из 10% водного раствора мальтозы и 10% сухого обезжиренного молока. В качестве антиоксиданта к среде добавляли тиомочевину. Средняя концентрация клеток в суспензии составляла 1×10^8 кл/мл.

Приготовленную суспензию дрожжей вносили по 1 мл в пенициллиновые флаконы. Лиофилизацию дрожжей проводили на установке УЗВ-2 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины, г.Харьков). Контроль за процессом сушки осуществляли с помощью термопар (медь-константан), находящихся в контрольном образце и на полке.

Образцы охлаждали со скоростью 0,5°C/мин в камере сублимационной сушки до -25°C. Лиофилизацию проводили при остаточном давлении в камере 0,013-0,018 Па. Остаточная влажность образцов после лиофилизации составляла 2-3%.

После окончания лиофилизации и регидратации образцов определяли количество жизнеспособных клеток. Образцы регидратировали добавлением дистиллированной воды до исходного объема при температуре 20°C. Количество жизнеспособных клеток дрожжей определяли чашечным методом Коха по количеству макроколоний, сформировавшихся на сусло-агаре [4].

Лиофилизированные образцы дрожжей закладывали на хранение при разных температурных условиях. Дрожжи, лиофилизированные в мальтозно-молочной среде (среда 1), были контрольными образцами, опытными – в мальтозно-молочной среде с добавлением 1% тиомочевины (среда 2).

Количество клеток с нелетальными повреждениями определяли по методу активации метаболических процессов при температуре 37°C.

Часть образцов хранилась при температурах: 4, -10, -25 и -70°C.

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами [2].

Результаты и обсуждение

Установлено, если дрожжи лиофилизировались в мальтозно-молочной среде и экспонировались при температуре 37°C, то уже через 4 дня количество жизнеспособных клеток снижалось на порядок, через 12 дней – на 3 порядка, в конце первого

for 48 hrs under 30°C on a sloping wort-agar medium, transferred into the UERD liquid nutritive medium and cultured in it with 24 hrs aeration up to the stationary growth phase. Afterwards the yeast cells were precipitated by centrifuging and removed into a protective medium, consisted of 10% maltose aqueous solution and 10% dried skimmed milk. Thiourea was added to the medium as an antioxidant. An average cell concentration in suspension made 1×10^8 cells/ml.

The prepared yeast suspension was transferred into the penicillin flasks by 1 ml. The yeast freeze-drying was carried out with UZV-2 device (Special Design & Construction Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov). The control for freeze-drying process was carried-out using the thermocouples (copper-constantan), being in the control sample and on a shelf.

The samples were cooled down to -25°C with 0.5°C/min rate in a cryodesiccation chamber. Freeze-drying was carried-out under 0.013-0.018 Pa residual pressure in a chamber. The residual humidity of the samples after freeze-drying made 2-3%.

After finishing the samples' freeze-drying and rehydration processes there was determined a number of viable cells. The samples were rehydrated by adding a distilled water up to the initial volume under 20°C. A number of viable yeast cell was determined using the Koch's dish method upon a number of macrocolonies, formed on wort-agar [4].

Frozen-dried yeast samples were laid for storage under different temperature conditions. The yeast, frozen-dried in maltose-milk medium (medium 1) was the control sample, that in maltose milk medium with addition of 1% thiourea (medium 2) served as the experimental one.

Cell number with non-lethal damages was determined using the method of metabolic process activation under 37°C. A part of samples was stored under low temperatures: 4, -10, -25 and -70°C.

The results obtained were statistically processed with traditionally used methods [2].

Results and discussion

It was established, that if yeast were frozen-dried in maltose-milk medium and exposed under 37°C, even in 4 days a number of viable cells was decreased by one order, in 12 days by 3, to the end of the first month by 6 and in 2 months all microorganisms died.

In the samples, frozen-dried with thiourea in all observation terms a number of viable cells was statistically and considerably higher, than in those without thiourea. Starting from the 12th day their number in the samples with thiourea was by 2 orders higher, than in those without it (Table 1).

Таблица 1. Влияние среды консервирования на жизнеспособность лиофилизированных дрожжей *S. cerevisiae* в процессе хранения при температуре 37°C

Table 1. Influence of preservation medium on the viability of *S. cerevisiae* frozen-dried yeast during storage under 37°C

Температура хранения, °C Temperature of storage, °C	Защитная среда Protective medium	Количество жизнеспособных клеток после хранения (1 мл) Number of viable cells after storage (in 1 ml)				
		Контроль Control	4 дня 4 days	8 дней 8 days	12 дней 12 days	1 мес 1 month
		$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
Контроль после лиофилизации Control after freeze-drying	1	$(1,69 \pm 0,27) \times 10^8$ *				
	2	$(2,35 \pm 0,34) \times 10^8$ *				
37	1		$(2,8 \pm 0,35) \times 10^7$ *	$(1,1 \pm 0,32) \times 10^7$ *	$(7,0 \pm 0,35) \times 10^5$ *	$(4,5 \pm 0,3) \times 10^{2*}$
	2		$(7,8 \pm 0,29) \times 10^7$ *	$(6,4 \pm 0,32) \times 10^7$ *	$(1,12 \pm 0,3) \times 10^7$ *	$(0,2 \pm 0,32) \times 10^{4*}$

Примечания: \bar{x} – среднее значение; $\pm S\bar{x}$ – среднее квадратичное отклонение. Достоверность расчетов 95%. Среда 1 – водный раствор мальтозы + сухое обезжиренное молоко; среда 2 – среда 1 + 1% тиомочевины; * – уровень достоверной вероятности между средними значениями количества жизнеспособных клеток после лиофилизации и после хранения; $p < 0,05$.

Notes: \bar{x} – average mean; $\pm S\bar{x}$ – standard deviation. Statistical significance of calculations is 95%. Medium 1 – an aqueous maltose solution + dried skimmed milk; medium 2 – medium 1 + 1% thiourea. * – level of statistical and significant probability between average values of a number of viable cells after freeze-drying and after storage; $p < 0.05$.

месяца – на 6 порядков, через 2 мес все микроорганизмы погибли.

В образцах, лиофилизированных с тиомочевинной, во все сроки наблюдения количество жизнеспособных клеток было достоверно выше, чем в образцах, лиофилизированных без тиомочевины. Начиная с 12-го дня, их количество в образцах с тиомочевинной было на 2 порядка выше, чем в образцах, лиофилизированных без тиомочевины (табл.1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что под влиянием лиофилизации в клетках развиваются нелетальные повреждения, которые репарируются при их переводе в физиологические условия культивирования. С помощью тиомочевины у 50% клеток нелетальные повреждения не развиваются и они менее интенсивно трансформируются в летальные.

С понижением температуры хранения достоверно увеличивались сроки хранения. Так, в образцах, хранившихся при температуре 4°C, количество жизнеспособных клеток, лиофилизированных в среде с тиомочевинной, было выше, чем в образцах, лиофилизированных без тиомочевины, гибель клеток отмечалась спустя 6 мес.

При снижении температуры до -10°C через 12 мес хранения количество жизнеспособных клеток без тиомочевины снижалось на 2 порядка, в то время как с тиомочевинной было достоверно выше и уменьшалось в 2 раза в пределах 1 порядка – от $2,35 \times 10^8$ до $1,2 \times 10^8$. В образцах, лиофилизированных без тиомочевины и хранившихся при

The results obtained testify to the fact, that under freeze-drying effect in cells there is the development of non-lethal damages, which are repaired during their transferring under physiological conditions of culturing. There is no non-lethal damage development in 50% of cells when using thiourea and they are less intensively transformed into the lethal ones. With a decrease in storage temperature there was a statistical and significant augmentation of storage term. Thus, in the samples, stored under 4°C the amount of viable cells, frozen-dried in the medium with thiourea was higher, than in those, frozen-dried without it, a cell death was noted after 6 months.

During temperature decrease down to -10°C in 12 months of storage a number of viable thiourea-free cells reduced by 2 orders, whereas it was statistically and significantly higher with thiourea and reduced in 2 times within the following order: from 2.35×10^8 to $1,2 \times 10^8$. In the frozen-dried thiourea-free samples, stored under -25°C the viable cell amount decreased by one order after 6 months of storage, and under -70°C their number remained without change during 1 year of observation.

In the samples frozen-dried with thiourea, stored under -25 and -70°C the viable cell amount remained without change during 12 months in comparison with their content in those, rehydrated after freeze-drying (Table 2).

The results obtained testify to the fact that at these stages of freeze-drying there is a damage in the systems, controlling the activity of peroxidation reaction course and free radical formation. As a

Таблица 2. Влияние среды консервирования и температуры хранения на жизнеспособность лиофилизированных дрожжей *S. cerevisiae*

Table 2. Influence of preservation medium and storage temperature on the viability of *S. cerevisiae* frozen-dried yeast

Температура хранения, °С Temperature of storage, °C	Защитная среда Protective medium	Количество жизнеспособных клеток после хранения (1 мл) Number of viable cells after storage (in 1 ml)					
		Контроль Control	1 мес 1 month	2 мес 2 months	3 мес 3 months	6 мес 6 months	12 мес 12 months
		$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
Контроль после лиофилизации Control after freeze-drying	1	$(1,69 \pm 0,27) \times 10^{8**}$					
	2	$(2,35 \pm 0,34) \times 10^{8**}$					
4	1		$(8,97 \pm 0,27) \times 10^{7*}$	$(8,0 \pm 0,36) \times 10^{7*}$	$(1,6 \pm 0,28) \times 10^{7*}$		
	2		$(1,39 \pm 0,34) \times 10^{8**}$	$(1,03 \pm 0,33) \times 10^{8**}$	$(6,8 \pm 0,31) \times 10^{7*}$		
- 10	1			$(9,7 \pm 0,26) \times 10^{7*}$		$(3,22 \pm 0,3) \times 10^{7*}$	$(4,9 \pm 0,34) \times 10^{6*}$
	2			$(1,86 \pm 0,26) \times 10^{8**}$		$(1,92 \pm 0,35) \times 10^{8**}$	$(1,2 \pm 0,31) \times 10^{8**}$
- 25	1					$(9,7 \pm 0,32) \times 10^{7*}$	$(6,8 \pm 0,34) \times 10^{7*}$
	2					$(2,17 \pm 0,3) \times 10^{8**}$	$(2,15 \pm 0,32) \times 10^{8**}$
- 70	1					$(1,22 \pm 0,28) \times 10^{8**}$	$(1,13 \pm 0,29) \times 10^{8**}$
	2					$(2,33 \pm 0,3) \times 10^{8**}$	$(2,47 \pm 0,36) \times 10^{8**}$

Примечания: \bar{x} – среднее значение; $\pm S\bar{x}$ – среднеквадратичное отклонение. Достоверность расчетов 95%. Среда 1 – водный раствор мальтозы + сухое обезжиренное молоко; среда 2 – среда 1 + 1% тиомочевины; * – уровень достоверной вероятности между средними значениями количества жизнеспособных клеток после лиофилизации и после хранения; $p < 0,05$.

Notes: \bar{x} – average mean; $\pm S\bar{x}$ – standard deviation. Statistical significance of calculations is 95%. Medium 1 – an aqueous maltose solution + dried skimmed milk; medium 2 – medium 1 + 1% thiourea; * – level of statistical and significant probability between average values of a number of viable cells after freeze-drying and after storage; $p < 0.05$.

-25°C, количество жизнеспособных клеток снижалось на 1 порядок спустя 6 мес хранения, а при -70°C их количество в образцах достоверно не изменялось в течение 1 года наблюдения.

В образцах, лиофилизированных с тиомочевинной, хранившихся при температуре -25 и -70°C, количество жизнеспособных клеток не изменялось в течение 12 мес по сравнению с их содержанием в образцах, регидратированных после лиофилизации (табл 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на этапах лиофилизации повреждаются системы, контролирующие активность течения реакции перекисного окисления и образования свободных радикалов. В результате этих процессов на этапах хранения лиофилизированных образцов при умеренно низких температурах часть клеток погибает. С помощью тиомочевины достигается защита этих систем и процессов у части клеток, в результате этого при умеренно низких температурах сохраняется более высокий процент жизнеспособных клеток. Не менее важной причиной гибели лиофилизированных клеток в

result of these processes at the stages of frozen-dried sample storage under moderately low temperatures there is a death in a part of cells. Using thiourea we achieve the protection for these systems and processes in some cells, resulting in the preservation of higher percentage of viable cells under moderately low temperatures. Biochemical processes with a low activation energy, resulting in the accumulation of intermediate products with a negative effect on cells right up to their death, are quite important reason of frozen-dried cell death during storage under moderately low temperatures. The inhibition of processes under -25° and -70°C contributes to the prolongation of culture storage terms in a viable state under these temperatures.

Conclusions

The results obtained stipulate the expediency to use the antioxidants in cryoprotective media before freeze-drying and when storing the frozen-dried samples under the temperature, higher than -25°C. Under lower temperatures the inhibition of main biological processes occurs, that allows to maintain

процессе хранения при умеренно низких температурах являются биохимические процессы с малой энергией активации, в результате чего накапливаются промежуточные продукты, отрицательно влияющие на клетки вплоть до их гибели. Ингибция процессов при температуре -25 и -70°C способствует продлению сроков хранения культур в жизнеспособном состоянии при этих температурах.

Выводы

Полученные результаты обуславливают целесообразность использования антиоксидантов в защитных средах перед лиофилизацией и при хранении лиофилизированных образцов при температуре выше -25°C. При более низких температурах ингибируются основные биологические процессы, что позволяет сохранять количество жизнеспособных клеток в течение года на исходном уровне в образцах лиофилизированных дрожжей, содержащих тиомочевину и без нее.

a number of viable cells during 1 year at the initial level in the frozen-dried yeast samples with thiourea and without it.

References

1. *Arkadieva Z.A.* Factors, affecting the viability and properties of microorganisms under different methods of storage // *Biologicheskie nauki.* – 1983. – N4. – P. 93-105.
2. *Ashmarin I.P., Vorobiev A.A.* Statistical methods in microbiological studies. – Leningrad: Medgiz, 1962. – 180 p.
3. *Bekker M.E., Lamberg A.N., Rapoport A.I.* Anabiosis of microorganisms. – Riga: Zinatis, 1981. – 247 p.
4. *Practical works on microbiology* / Edited by Egorov N.S. – Moscow: Publishing House of Moscow State University, 1976. – 307 p.
5. *Ruban E.L.* Storage of microorganism cultures // *Applied biochemistry and microbiology.* – 1989. – 25. N3. – P. 291-301.
6. *Bound C.J.* Cryopreservation of yeast cultures // *Methods Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 38. – P. 39-47.

Accepted in 04.11.2003

Литература

1. *Аркадьева З.А.* Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения // *Биологические науки.* – 1983. – № 4. – С. 93-105.
2. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.
3. *Беккер М.Е., Ламберг А.Н., Рапопорт А.И.* Анабиоз микроорганизмов. – Рига: Зинатис, 1981. – 247 с.
4. *Практикум по микробиологии* / Под ред. Н.С.Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 307 с.
5. *Рубан Е.Л.* Хранение культур микроорганизмов // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 1989. – Vol. 25, №3. – С. 291-301.
6. *Bound C.J.* Cryopreservation of yeast cultures // *Methods Mol Biol.* – 1995. – Vol. 38. – P. 39-47.

Поступила 04.11.2003