

Изучение биологических свойств деконсервированных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в составе альгинатных гранул

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Biological Features of Frozen-Thawed *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells Incapsulated in Alginate Granules

V.L. Ponomareva, I.P. Vysekantsev, E.S. Onasenکو

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

Целью исследования было изучение влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность и функциональную активность иммобилизованных в альгинатных гранулах клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Разработан эффективный метод криоконсервирования, позволяющий достичь высокую степень сохранности клеток дрожжей без использования криопротекторов. При иммобилизации в гранулы альгината натрия и экспериментально выбранном режиме охлаждения (со скоростью 1 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот) наблюдается почти 100%-я жизнеспособность клеток. Проведена оценка ферментативной и пролиферативной активности свободных и иммобилизованных клеток.

Для изучения ферментативной активности дрожжей после замораживания определяли подъемную силу, зимазную, мальтазную активность и общую бродильную способность клеток во время роста. Установлено, что указанные условия криоконсервирования не влияют на генетически детерминированный спектр сахаролитических свойств дрожжей. Газообразование регистрировалось во всех исследуемых образцах, однако в образцах со свободными клетками после замораживания отмечали более выраженное снижение функциональной активности и обратимое ингибирование процессов метаболизма. Это свидетельствует о большем количестве нелетальных повреждений в свободных клетках на этапах охлаждения-оттаивания. После криоконсервирования иммобилизованные в альгинатные гранулы клетки быстрее восстанавливали пролиферативную и метаболическую активность по сравнению со свободными клетками в суспензии.

В ходе исследования дыхательной активности клеток методом ЭПР было установлено, что в процессе криоконсервирования в свободных жизнеспособных клетках развиваются нелетальные повреждения в энергообразующих органеллах. Степень ингибирования восстановления спинового зонда и соответственно активность дыхательной цепи митохондрий в образцах иммобилизованных клеток после криоконсервирования значительно не отличались от аналогичных показателей нативных клеток.

Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что стрессовая реакция клетки, инициируемая процессом иммобилизации, сопровождается повышением генерации активных форм кислорода. Мы полагаем, что энергия, освобождаемая при многочисленных реакциях рекомбинации радикалов в результате их превращений в устойчивые молекулы, используется клеткой для активации репаративных процессов и быстрого восстановления метаболической активности деконсервированных клеток. Метаболическая и митохондриальная активность иммобилизованных клеток может быть одной из причин высокой степени сохранности их в процессе криоконсервирования.

The research was targeted to study the influence of cryopreservation conditions on the viability and functional activity of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in alginate granules. There was developed an efficient method of cryopreservation, enabling to achieve a high preservation degree in yeast cells without use of traditional cryoprotectant. Following immobilization into sodium alginate granules, and performing cooling by experimentally selected regimen (with 10 deg/min rate down to -40°C , and further immersion into liquid nitrogen) we observed almost 100% cell viability. The enzymatic and proliferative activities of free and immobilized cells were assessed.

In order to study the yeast enzymatic activity after freezing we determined an elevating power, zymase and maltase activities, and total fermentation ability of cells during growth. The obtained results of cryopreservation showed no effect on genetically determined range of yeast saccharolytic properties. The gas production was found in all the samples under study. However, in samples with free cells we noted more pronounced reduction in functional activity and reversible inhibition of metabolic processes after freezing. This testified to a greater number of non-lethal injuries in free cells at freeze-thawing stages. After cryopreservation the cells immobilized into alginate granules recovered their proliferative and metabolic activities more rapidly than free cells in suspension.

When studying a respiratory activity of cells by EPR method we established the development of non-lethal damages in energy producing organelles in free viable cells during cryopreservation. The inhibition degree of spin probe reduction, as well as the activity of mitochondrial respiratory chain in the samples of immobilized cells after cryopreservation did not differ significantly from similar indices for native cells. Using flow cytometry we established the stress response of cell initiated by immobilization process to be accompanied by an increased AOS generation. We believe that the energy, released in numerous radical recombination reactions as a result of their transformation into stable molecules is used by cell to activate reparative processes and a rapid recovery of metabolic activity of frozen-thawed cells. Metabolic and mitochondrial activity of immobilized cells may be one of the reasons of their high survival after cryopreservation.

