

Н.О. Паньків, Л.Я. Паляниця, Р.Б. Косів, Н.І. Березовська, О.В. Швабюк
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології органічних продуктів

КРІОПРОТЕКТОРИ ДРІЖДЖОВИХ КЛІТИН

© Паньків Н.О., Паляниця Л.Я., Березовська Н.І., Косів Р.Б., Швабюк О.В., 2012

Досліджено захисну дію кріопротекторів різного типу на дріжджі виду *Saccharomyces cerevisiae*. Встановлено, що найкраще виживання спостерігається при вирощуванні і заморожуванні дріжджів у середовищі з кріопротекторами.

Ключові слова: дріжджі виду *Saccharomyces cerevisiae*, заморожування, кріопротектори.

Protective effect of cryoprotectants of different types of yeast species *Saccharomyces cerevisiae* is investigated. It is determined that the best survival is observed in yeast's growing and freezing in a medium with cryoprotectants.

Key words: yeast of species *Saccharomyces cerevisiae*, freezing, cryoprotectants.

Постановка проблеми та її зв'язок з важливими науковими завданнями

Сьогодні генна інженерія та різні методи селекціонування можуть забезпечити промисловість високопродуктивними штамми мікроорганізмів. Але досі залишається актуальним питання їх зберігання. Відомо багато методів консервації мікроорганізмів, таких як: зберігання під мінеральними оліями, на адсорбентах, під вакуумом, ліофілізація, але вони потребують великих затрат на підготовку до зберігання. Найпоширенішим і працемістким є метод періодичних пересівів.

Для підтримання життєздатності мікроорганізмів використовують заморожування при низьких та ультранизьких температурах. Помічено, що деякі речовини (кріопротектори) володіють захисним впливом на мікроорганізми.

Метод зберігання за низьких температур вибирають індивідуально для окремих штамів мікроорганізмів. Для того, щоб він був високоефективним, актуальним є розроблення оптимальних умов заморожування, підбір і вивчення впливу кріопротекторів на мікроорганізми.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

У роботі [1] досліджено вплив концентрації кріопротекторів і режимів заморожування на пошкодження дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* в області субвтектичних температур при їх кріоконсервуванні і встановлено, що після їх заморожування і нагрівання, коли концентрації ДМСО, ПЕО-1500 та гліцеролу становлять 5, 6 і 7% відповідно, спостерігається стрибкоподібне збільшення життєздатності клітин на 18–25%. Також життєздатність цих клітин підвищується, якщо перетин субвтектичного температурного інтервалу здійснюється зі швидкістю охолодження 20...25°C/хв., а перетин температурного інтервалу склування – зі швидкістю охолодження 1°C/хв.

Інше дослідження [2] свідчить, що найбільшу здатність до виживання мають дріжджові клітини, які заморожували зі швидкістю 0,6°C/хв і проводили відтанення на водяній бані при температурі 37°C протягом 3 хв.

Також на життєздатні показники дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, цілісність мембран і флуоресцентні характеристики до та після кріоконсервування впливає озон. Результати досліджень показали, озон в дозі $1,5 \cdot 10^{-12}$ мгО₃/клітину позитивно впливає на підвищення життєздатності клітин порівняно з неозонованими [3].

Суттєвим фактором, що впливає на механізм пошкодження клітин дріжджів виду *Saccharomyces cerevisiae*, є розмір контейнера, в якому відбувається заморожування [4]. Встановлено, що найбільш

життєздатними (близько 90 %) залишаються клітини, що заморожувалися у контейнерах діаметром 20 мм зі швидкістю охолодження 5°C/хв.

У роботах [5,6] одержані значення коефіцієнтів проникності мембран клітин *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів, а також після їх обробки сульфгідрильним реагентом [5].

Постановка задачі

Робота присвячена вдосконаленню технології зберігання промислових штамів мікроорганізмів.

Мета роботи – дослідити вплив кріопротекторів для збереження життєздатності клітин дріжджів після їх заморожування.

Результати експериментів та їх обговорення

Дріжджі роду *Saccharomyces* володіють унікальними властивостями, що виділяють їх серед інших мікроорганізмів. Насамперед це здатність розвиватися в аеробних і анаеробних умовах, простота культивування, висока швидкість розмноження, наявність невеликої кількості стадій у циклі розвитку, зміна яких контролюється під час експерименту. Крім цього, дріжджі-сахароміцети – це важлива виробнича культура, за участю якої одержують харчові (пиво, вино, хлібопекарські дріжджі, вітаміни), кормові (білок) та технічні (технічний спирт) продукти. Тому збереження цінних властивостей даної культури вимагає пошуку ефективних способів консервації.

Отже, об'єктом дослідження було вибрано дріжджі виду *Saccharomyces cerevisiae*.

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* культивували у середовищах з кріопротекторами, після чого біомасу відокремлювали від культуральної рідини центрифугуванням. Дріжджі досліджували за забарвленням метиленовим синім після їх заморожування при -17°C та -30°C.

Серед численних кріопротекторів обрали гліцерол і етиленгліколь, які належать до протекторів *першого типу*, що легко проходять через клітинну мембрану та забезпечують внутрішньо-клітинний і позаклітинний захист від заморожування, а також глюкозу та сахарозу – протекторів *другого типу*, що забезпечують захисту дію на зовнішній поверхні клітинної мембрани.

Основою усіх середовищ було базисне середовище Рідер без глюкози, до якого додавали кріопротектори: 2 % глюкози та 7 % етиленгліколю, 2 % глюкози та 7 % гліцеролу, 10 % глюкози, 20 % глюкози, 10 % сахарози. Як контрольне використовували середовище Рідер з 2 % глюкози. Вміст протекторів у середовищах вибирали, враховуючи нагромаджені сьогодні теоретичні та експериментальні дані інших авторів.

Дослідження заморожування дріжджів, культивованих у середовищах з протекторами першого типу, показали, що їх кріостійкість значно погіршується, особливо при температурі заморожування -17°C. На відміну від цього, використання кріопротекторів другого типу дало кращі результати (рис. 1).

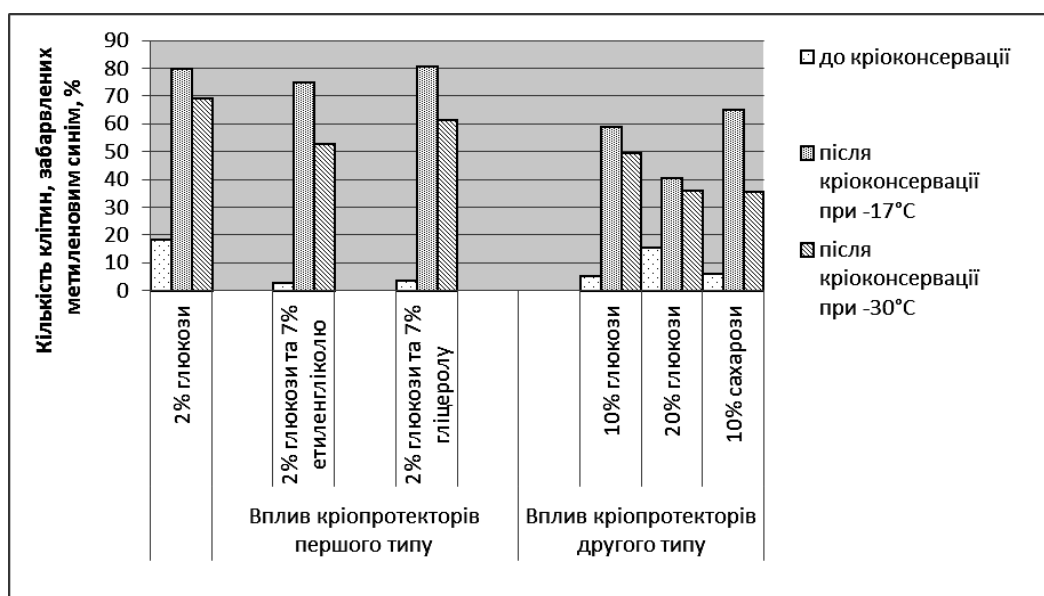


Рис. 1. Кріостійкість дріжджів, культивованих у середовищах з протекторами

Як показали результати, дріжджі, культивовані у середовищах з протекторами другого типу, містили 50 % і менше клітин, забарвлених метиленовим синім. Це свідчить про захисну роль клітинної стінки дріжджів протекторами другого типу.

Наступним етапом досліджень було вивчення заморожування дріжджів у середовищах з кріопротекторами (рис. 2).

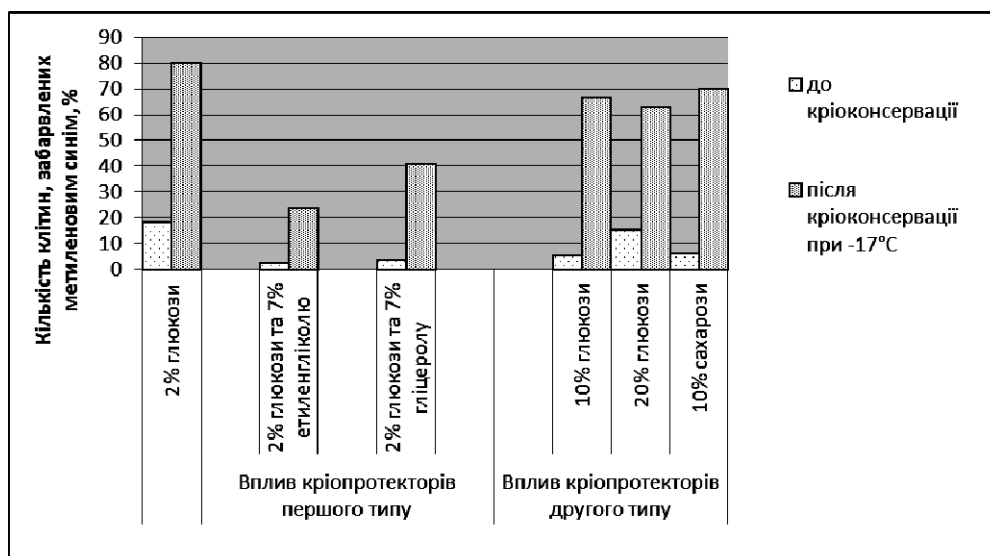


Рис. 2. Кріостійкість дріжджів, культивованих і заморожуваних у середовищах з протекторами

Використання сахарози та глюкози у кількості 10–20 % не має значного впливу на кріостійкість дріжджових клітин. Проте застосування кріопротекторів першого типу – етиленгліколю та гліцеролу – виявилось ефективнішим, адже кількість клітин, забарвлених метиленовим синім, зменшувалась у 2,3–3,7 раза.

Висновки

На основі теоретичних узагальнень та результатів експериментальних досліджень запропоновано використовувати у бродильних виробництвах кріоконсервації для зберігання чистих культур дріжджів та застосування кріопротекторів, які забезпечують збереження важливих технологічних властивостей дріжджів. З метою захисту дріжджових клітин при їх заморожуванні при -17°C і -30°C доцільно використовувати протектори двох типів. Внесення протекторів під час культивування дріжджів і заморожування в цьому середовищі при -17°C і -30°C виявило кращу дію цукрів (першого типу) для збереження більшого відсотка живих клітин. Використання протекторів лише під час культивування дріжджів і заморожування відцентрифужованих клітин при -17°C і -30°C виявило кращу дію етиленгліколю та гліцеролу на вміст залишкових живих дріжджів.

1. Кирилюк Г.Л. Вплив кріопротекторів і режимів заморожування на механічне пошкодження клітин в області субвектичних температур: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2008. – 22 с. 2. Tsonka Uzunova-Doneva, Todor Donev. Influence of the freezing rate on the survival of strains *Saccharomyces cerevisiae* after cryogenic preservation/ journal of culture collections, volume 3, 2000-2002, pp. 78-83. 3. Буряк І.А. Застосування озону для підвищення ефективності кріоконсервування еритроцитів людини та дріжджів *Sacch. Cerevisiae*: Автореф. дис. ... канд. біолог. наук. – Харків, 2008. – 18 с. 4. Сақун О.В. Механізми кріопошкодження дріжджових грибів *Saccharomyces cerevisiae* при заморожуванні у водному розчині диметилсульфоксиду з постійною швидкістю у контейнерах циліндричної форми // Проблеми кріобіології, 2010. – Т. 20. – № 1. – С.59–65. 5. Давыдова Е.В., Коваленко И.Ф., Гордиенко О.И. Влияние температуры и блокатора белковых каналов на коэффициенты проницаемости мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для воды и кріопротекторов // Вестник Харьковського нац. ун-та. – 2009. – Вип. 10. – № 878. – С. 82–88. 6. Сақун О.В., Коваленко І.Ф., Сіренко А.Ю., Висеканцев І.П., Давидова О.В., Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І. Коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів // Вісник Харківського нац. ун-ту. – 2008. – Вип. 10. – № 814. – С.141–147.