

Белих І.А., к.біол.н., доцент, Самойленко С.І., к.техн.н., доцент,
Висеканцев І.П., к.мед.н., с.н.с., Белінська А.П., к.техн.н., доцент,
Варанкіна О.О., к.техн.н., доцент, Близнюк О.М., д.техн.н., професор,
Масалітіна Н.Ю., к.техн.н., доцент, Мироненко Л.С., к.техн.н., Кукушкін А.І., к.біол.н.

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В БІОТЕХНОЛОГІЧНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ

Національний технічний університет "Харківський політехнічний інститут", Харків

Ключові слова: іммобілізація клітин, включення в структуру гелю, альгінатні мікросфери, кріоконсервування, життєздатність клітин, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*

Вступ

Одним із пріоритетних напрямків сучасної біотехнології є створення систем іммобілізованих клітин. В біотехнологічних виробництвах широке розповсюдження отримало використання іммобілізованих клітин – продуцентів біологічно активних речовин.

Всі способи іммобілізації клітин поділяють на п'ять груп: адсорбція клітин на поверхні носіїв, включення біоматеріалу у гель, мікрокапсулювання за допомогою мембранних технологій, зшивання біологічного матеріалу з поверхнею за допомогою біфункціональних реагентів, ковалентне зв'язування [1, 2].

Однією з галузей застосування іммобілізованих клітин є біотехнологічні виробництва, що використовують як продуценти промислові штами мікроорганізмів. Іммобілізовані мікроорганізми-продуценти дозволяють значно підвищити вихід біологічно активних речовин у культуральне середовище, забезпечують стерильність мікробіологічного виробництва, запобігають забрудненню навколишнього середовища в зоні виробництва (іммобілізація патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів), знижують собівартість продуктів виробництва за рахунок підвищення технологічності й продуктивності процесів [3, 4].

Враховуючи досвід, накопичений у виробництві, в теперішній час проводяться дослідження зі створення лікарських засобів іммобілізованих клітин. Все більше уваги дослідники і біотехнологи приділяють розробці препаратів пробіотиків, іммобілізованих в носіях із полісахаридних гелів [2]. Такі препарати мають низку переваг над класичними лікарськими формами (капсули, пігулки, ліофілізовані порошки, розчини). Препарати іммобілізованих клітин можна ціленаправлено транспортувати в органи та тканини з патологічними процесами [3]. Існують теоретичні передумови, що дозволяють очікувати більш високий терапевтичний ефект від застосування цих препаратів і можливість їхнього цілеспрямованого транспорту в певні органи та тканини.

Дослідження існуючих рішень проблеми

Іммобілізація шляхом адсорбції – найбільш м'який і кращий для живих клітин спосіб фіксації в порівнянні із включенням в органічні полімери [5, 6]. Він дозволяє значно підвищити ефективність біокаталізу і біодеградації [7].

Як адсорбенти мікробних клітин можуть використовуватися целюлозні плівки, пористе скло і хітозанові кульки. При порівнянні цих носіїв виявилось, що іммобілізація кластридій на целюлозних плівках більш ефективна для продукції олігосахаридів із полісахаридів, ніж на пористому склі та хітозані [8].

Перспективними носіями є пористі вуглецеві матеріали, зокрема, активоване вугілля. Атоми вуглецю на поверхні кристалів, особливо в місцях дефектів кристалічної решітки, перебувають в іншому електронному й енергетичному стані, ніж атоми, що знаходяться в об'ємі фази. Наявність у перших вільних валентностей полегшує їх хімічну і сорбційну взаємодію з різними речовинами [9]. Вугільні матеріали мають високу хімічну і біологічну стійкість, механічну міцність, достатню проникність для ферменту і субстратів, велику питому поверхню (1000 м²/г і більше). Вони забезпечують можливість одержання форм біокатализаторів, зручних у технологічному відношенні (гранул, тканин, волокон). Іммобілізацію біопрепаратів на вугільних матеріалах проводять за допомогою як адсорбції, так і хімічного зв'язування з використанням біфункціональних реагентів. Для іммобілізації цілих клітин можуть використовуватися глиняні та діатомові гранули [10, 11]. Торф'яні біофільтри з іммобілізованими бактеріями, що окислюють етилен, застосовуються в овочесховищах для адсорбції етилену, що є альтернативною хімічним уловлювальним агентам, які відрізняються високою вартістю і вимагають відновлення [12].

Були розроблені неорганічні носії, що містять вуглець, для створення високостабільних гетерогенних біокатализаторів. Макроструктуровані керамічні носії, покриті шаром каталітичного волокнистого вуглецю і графітоподібним вуглецем, успішно застосовувалися для іммобілізації як бактеріальних і дріжджових клітин, що зростають, так і тих, що знаходяться у спокої. Автори відзначили, що носії із шаром каталітичного волокнистого вуглецю забезпечують міцне зв'язування мікробних клітин, а також повне збереження ферментативної активності мікроорганізмів і максимальну стабілізацію отриманих біокатализаторів [13–15].

Ковалентна модифікація різних носіїв, вперше випробувана для іммобілізації ферментів, може бути використана також і при зв'язуванні цілих клітин. Ковалентні взаємодії відбуваються між реакційно здатними карбоксильними групами та аміногрупами на поверхні клітини і біфункціональним агентом, що забезпечує поперечну зшивку. Як агент, що зшиває, часто використовують глутаральдегід [16], хлориди хрому і титану [3], карбодіімід [17].

Цілі клітини можуть бути також іммобілізовані за допомогою метало-хелатного методу. Цей метод заснований на хелатуючих властивостях перехідних металів, зокрема, титану (IV), цирконію (IV) та ін., які є особливо привабливими через нетоксичність їхніх оксидів [18]. Відзначається підвищення стабільності, а також температурного і рН оптимумів дії ксилосо(глюкозо-)ізомерази *Arthrobacter sp.* при зв'язуванні цілих клітин за допомогою гідроксиду кобальту [19].

Включення клітин мікроорганізмів у структуру полімерного носія. Іммобілізація мікроорганізмів шляхом включення в структуру гелів дозволяє досягти високої щільності клітин у біореакторі, що збільшує продуктивність біотехнологічних процесів. Крім того, мікробні клітини, іммобілізовані в матриці гідрогелю, деякою мірою, захищені від несприятливих впливів навколишнього середовища, таких як зміна рН та температури, впливу органічних розчинників і токсичних сполук у високій концентрації, а також від контамінації чужорідною мікрофлорою [20, 21].

При такій іммобілізації мікроорганізмів, як носії застосовують полімерний гель, полімерну плівку або полімерне волокно. Нерозчинні матеріали, які є основою для мат-

риць подібних носіїв, можуть бути органічними або неорганічними сполуками, синтетичними похідними або природними продуктами [4].

Тривале зберігання клітин є необхідним етапом сучасних біотехнологій. Біотехнологічні процеси є яскравим прикладом високих технологій, з якими пов'язують перспективи багатьох виробництв. В даний час все більш пильна увага фахівців у нашій країні та за кордоном привертають питання довгострокового зберігання клітин в іммобілізованому стані [22, 23, 24, 26, 27].

В Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України вивчали зберігання і метаболічну активність мезенхімальних стромальних клітин (МСК) людини у вигляді суспензії одиночних клітин та інкапсульованих в альгінатні мікросфери [25].

Було встановлено, що процедура інкапсуляції не справляла істотного впливу на життєздатність і метаболічну активність МСК. Після кріоконсервування під захистом як 5 %, так і 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО) альгінатні мікросфери зберігали структурну цілісність, а включені в них МСК характеризувалися життєздатністю і метаболічною активністю, порівнянними з відповідними показниками деконсервованої суспензії одиночних МСК [25]. Отримані результати свідчать про можливість збереження життєздатності та метаболічної активності інкапсульованих в альгінатні мікросфери МСК після кріоконсервування [25].

Вивчено вплив тривалого зберігання клітин мікроорганізмів, іммобілізованих у кріогель полівінілового спирту, на їх виживання та біосинтез цільових метаболітів [26].

Було показано, що пробіотичні штами мікроорганізмів *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, які були іммобілізовані в 1%-му альгінатному гелі без добавок або з додаванням лактози, сахарози, знежиреного молока та захисного сахарозо-молочно-лактозного середовища, зберігали адгезивну активність після іммобілізації в альгінатному гелі та зберіганні за різних низьких температур протягом 24 місяців (термін спостереження) [27].

Таким чином, на наш погляд, перспективним напрямком використання іммобілізованих клітин у біотехнологічному виробництві є включення клітин мікроорганізмів у гель з подальшим кріоконсервуванням. Одним з найбільш перспективних носіїв є гель альгінату натрію.

Мета та основні задачі дослідження

Метою даної роботи є вивчення та модифікація методики іммобілізації дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) в гелі та довгострокове зберігання отриманих систем іммобілізованих клітин.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні задачі:

- ознайомитись з існуючими методиками іммобілізації клітин;
- вибрати та модифікувати методику одержання іммобілізованих клітин стосовно даного біологічного об'єкта і носія;
- відпрацювати метод об'єктивної оцінки життєздатності іммобілізованих в альгінатні гелі дріжджових клітин;
- дослідити вплив умов кріоконсервування на життєздатність дріжджових клітин, іммобілізованих в гелі.

Матеріали та методи досліджень

В роботі використані основні загальноприйняті методи досліджень і культивування, що використовуються в системі біотехнологічної промисловості, а саме: культивування дріжджів; оцінка життєздатності по колонієутворенню на агаризованих сере-

довищах (чашковий метод Коха); нефелометричний метод визначення кількості мікробних клітин.

За основу технології іммобілізації клітин дріжджів *S. cerevisiae* в альгінатному гелі була використана методика, запропонована Shen T.J., Marshall R.T. (1993 р.) та модифікована в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України [22–24].

Для іммобілізації клітин *S. cerevisiae* в альгінатні гранули використовували 2%-вий розчин альгінату натрію та 0,2 М розчин кальцію хлориду CaCl_2 , а для розчинення гранул – 4%-вий розчин дигідрату динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (Na_2 -ЕДТА). Розчини стерилізували 30 хвилин при 0,5 атм [22–24].

Як кріопротектор застосовували 5% розчин ДМСО. Кріоконсервуючі захисні середовища: дистильована вода, 1% розчин альгінату натрію, 5% розчин ДМСО, 1 % розчин альгінату натрію з додаванням 5% ДМСО.

Швидкість охолодження: 1, 5, 10, 15°C/хв. до мінус 40 °C з наступним зануренням зразків у рідкий азот [22–24].

Відігрів зразків проводили на водяній бані при температурі 37 °C [22–24].

Дріжджі, що підлягали консервації, вирощували в аеробних умовах, при оптимальній температурі (25–35 °C) на сусло-агарі. Культури дріжджів, в залежності від швидкості росту, інкубували протягом 2–3 діб – до переходу їх в фазу стаціонарного росту. Вирощені на агарі культури змивали захисним середовищем Файбича і готували густу суспензію -10^8 – -10^9 КУО/мл [22, 23, 28].

Вихідне сусло (з показниками цукру = 11 та рН = 5,5) розбавляли водопровідною водою до показника цукру = 8 (по цукрометру), доводили рН до 6,8–7,2 та стерилізували в автоклаві 40 хвилин при $\Delta P = 0,8$ атм. Частину поживного середовища готували з 2 % агару і розливали на чашки та косяки [24, 28].

Для приготування щільного поживного середовища використовували неохмелене пивне сусло, яке розбавляли водопровідною водою до вмісту цукру 7–8° по Баллінгу (вимірювали цукрометром) і стерилізували у бутлях при 110 °C протягом 10 хвилин. Перед використанням надосадову рідину обережно зливали. Далі до 1 л стерильного сусла додавали 18 г агар-агару, нагрівали до розчинення агару і розливали середовище в стерильні пробірки або чашки, стерилізували при 110° 10 хвилин [28].

Рідке сусло після зливання відстоюної рідини з осаду розливали у пробірки або колби і стерилізували при режимі, зазначеному для сусла-агару [28].

В ході експерименту були досліджені наступні середовища заморожування [22–24]: 1. суспензія клітин + дистильована вода; 2. суспензія клітин + 1 % альгінат натрію; 3. суспензія клітин + 5 % ДМСО; 4. суспензія клітин + 5 % ДМСО + 1 % альгінат натрію.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням «Statistica V.6.» програмного забезпечення.

Результати дослідження

Етапи іммобілізації клітин *S. cerevisiae* в альгінатні гранули

1. Змивали клітини зі скошеного агару в 5 мл фізіологічного розчину, таким чином отримали вихідну суспензію клітин з концентрацією змиву $C_{\text{сусп.}} \approx 1 \times 10^{10}$ КУО/мл. Кількість мікробних клітин визначали нефелометричним методом за допомогою фотоелектроколориметра [22, 23].

2. Змішували отриману суспензію клітин з 2%-вим розчином альгінату натрію у співвідношенні 1:1 (до 1 мл клітин суспензії додавали 1 мл 2%-вого розчину альгінату натрію) [22, 23].

3. У 2 мл стерильний шприц набирали 1 мл суспензії і давали урівноважитись суміші протягом 5 хвилин [22, 23].

4. В колбу, що містить 50 мл 0,2 М розчину CaCl_2 , з висоти 5 см із гранулятора по краплям випускали суміш клітин при безперервному колиханні колби (з 1 мл отримували 97–98 крапель, тобто об'єм крапель складав 0,01 мл, а діаметр – 2,6–2,7 мм) та залишали на 1 годину для затвердіння при температурі $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ [22, 23].

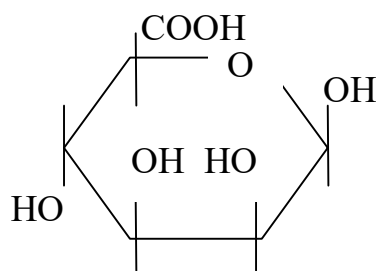
5. Отримані гранули діставали з розчину CaCl_2 за допомогою сита або мікробіологічної петлі, частину гранул поміщали у кріокапсули (по 10 гранул у 1 мл кріокапсулу) для подальшого кріоконсервування, а частину розчиняли у 4%-вому розчині $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ при кімнатній температурі та визначали життєздатність чашковим методом для контролю: 10 гранул поміщали в 10 мл 4%-вого $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ на 20 хвилин, при цьому розбавлення складає (-2). Після розчинення сіяли на чашки з агаром з розведень (-5) і (-6) [22, 23].

6. До 1 мл суспензії клітин з концентрацією $C_{\text{сусп}} \approx 1 \times 10^{10}$ КУО/мл додавали 1 мл фізіологічного розчину та проводили посів з розведень (-5) і (-6) для контролю [22, 23].

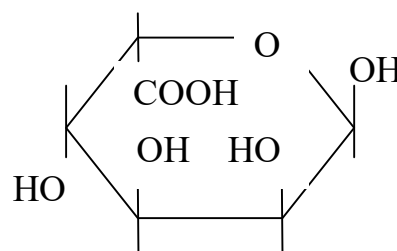
7. Заморожування клітинної суспензії та гранул проводили по програмах розробленим в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України: 1-етапне охолодження зі швидкостями 0,4; 4; 40 $^\circ\text{C}/\text{хв.}$, 2-етапне зі швидкістю охолодження на першому етапі 0,02–0,2 $^\circ\text{C}/\text{хв.}$ від 20 $^\circ\text{C}$ до мінус 20 $^\circ\text{C}$ та зі швидкістю на другому етапі 2–3 $^\circ\text{C}/\text{хв.}$ в інтервалі температур від мінус 20 $^\circ\text{C}$ до мінус 196 $^\circ\text{C}$, а також занурення в рідкий азот. Заморожені зразки відігрівали на водяній бані при 37 $^\circ\text{C}$ [22, 23].

Назва «альгінати» об'єднує велику групу природних полімерних речовин, склад, структура і молекулярна маса яких залежить від джерела походження виділення, району вирощування сировини, сезону заготівлі тощо. Рослинні альгінати добувають лужною екстракцією з бурих водоростей, що належать до родів *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Fucus*, *Macrocystis*, *Sargassum* та ін. [4].

Що стосується будови, то всі альгінати представляють собою нерозгалужені блок-сополімери солей двох уронових кислот [4]:



D-маннуорова кислота



L-гулуорова кислота

Полісахаридні ланцюги включають блоки, що складаються переважно з одного виду вуглеводних залишків, а також ділянки з більш-менш регулярним чергуванням ланок обох кислот, з'єднаних 1→4-глікозидними зв'язками. Сумарне співвідношення: маннуронат / гулурунат – одна з найважливіших характеристик альгінатів, що визначає гелеутворюючі властивості тієї або іншої марки полімеру. Справа в тому, що ділянки з олігоманнуруновими послідовностями мають близьку до лінійної «стрічкову» структу-

ний біокатализатор, присутні, наприклад, іони натрію, то завдяки обміну Ca^{2+} на Na^+ відбувається поступове розм'якшення і наступне розчинення гелю. З точки зору стабільності носія це – небажане явище, але з іншого боку, даний прийом розчинення гелю, що містить клітини, дозволяє провести підрахунок кількості мікроорганізмів у біокатализаторі на різних етапах його функціонування. Якщо в середовищі знаходяться речовини, здатні при взаємодії з іонами кальцію утворювати сполуки, константи дисоціації яких нижче відповідних констант дисоціації іонних пар у гелі, то за рахунок зсуву рівноваги буде відбуватися «екстракція» зшивача і руйнування матриці носія. Саме із цієї причини альгінатні студні не стабільні в присутності фосфатів, сульфатів, комплексонів типу ЕДТА, а також деяких органічних кислот [4].

Розчин ДМСО належить до проникних кріопротекторів та перешкоджає формуванню кристалів льоду за рахунок утворення водневих зв'язків з молекулами води. Це попереджає швидке наростання концентрації солей в позаклітинному середовищі та пошкодження клітин в результаті осмотичного шоку [29].

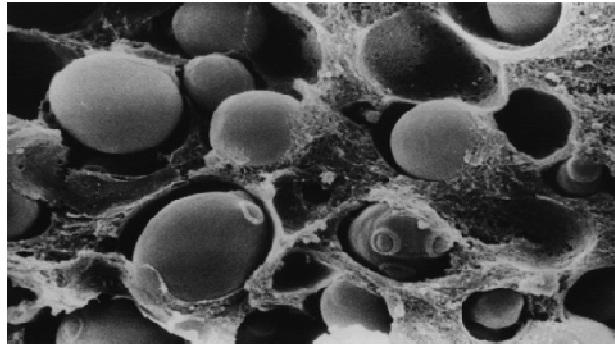


Рисунок 2 – Зображення дріжджових клітин, що іммобілізовані в альгінат кальцію [4]

Обладнання для іммобілізації клітин в іонотропні гелеві матриці. Для приготування великих кількостей гранул використовували спеціальні пристрої – гранулятори. Принципові схеми двох грануляторів [4] зображені на рис. 3.

У першому випадку (а) суспензія мікроорганізмів у розчині гелеутворювача 1 продавлюється через капіляр 3, а в коаксіальну з ним зовнішню трубку 4 подається регульований потік стерильного повітря або інертного газу, який зриває краплі рідкої фази з отвору капіляра. Підбором внутрішніх діаметрів каналів, тиском, що прикладається до рідини, а також і швидкістю потоку газу можна в широких межах варіювати розмір крапель і продуктивність гранулятора.

У другому випадку (б) рідина з клітинами 1 під тиском надходить у невелику камеру 7, що має знизу на виході капіляр 3, а функцію верхньої кришки камери виконує міцна гумова мембрана 8, в яку впирається шток 9, що передає на мембрану змінні коливання певної частоти. Ці коливання далі поширюються по рідині та порушують цілісність струменя, що виходить з капіляра, дроблячи його на краплі. Було показано, що за допомогою такого гранулятора можна успішно і у великих кількостях отримувати не тільки кульки альгінатного студню, що містять мікроорганізми, а й аналогічні частинки на основі термотропних гелевих матриць [4].

У лабораторії при отриманні невеликих партій іммобілізованих біокатализаторів ці операції можна виконувати за допомогою звичайного шприца або дозуючого насоса, подбавши про дотримання стерильності.

Після вивчення впливу концентрації альгінату, концентрації клітин та діаметра гранул на ефективність процесу включення дріжджових клітин в альгінатний гель було розроблено умови іммобілізації.

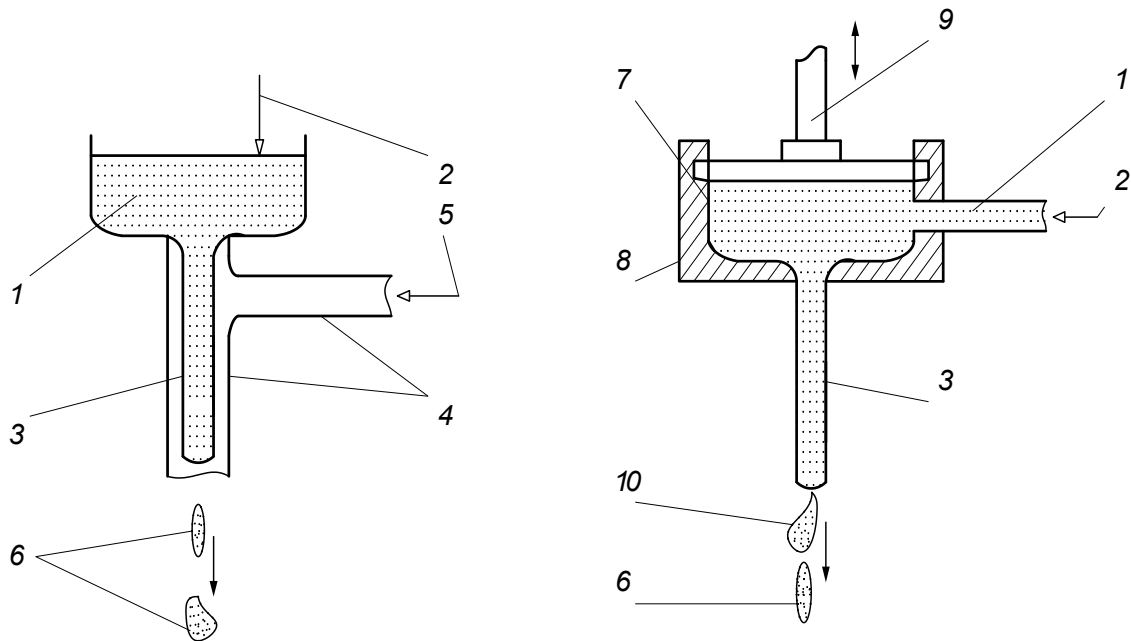


Рисунок 3 – Схеми грануляторів, призначених для отримання значних кількостей частинок іонотропних гелів, що містять іммобілізовані клітини [4]

- 1 – клітини, що підлягають іммобілізації, суспендовані в розчині гелеутворюючого полімеру;
 2 – тиск, прикладений до суспензії клітин; 3 – капіляр; 4 – трубка для подачі потоку газу;
 5 – подача стерильного повітря або інертного газу; 6 – краплі рідкої фази;
 7 – камера гранулятора; 8 – гумова мембрана; 9 – шток;
 10 – струмінь рідини на виході з капіляра

Вивчення впливу середовища заморожування на життєздатність клітин *S. cerevisiae* при різних режимах в процесі кріоконсервування

Етапи проведення експерименту:

1. Змивали з семи косяків дистильованою водою (по 5 мл) в одну колбу 35 мл суспензії клітин [22–24].
2. Підраховували концентрацію клітин у камері Горяєва і розбавляли отриману суспензію до концентрації 5×10^8 КУО/мл. В процесі розбавлень посівна концентрація дорівнювала у всіх зразках $2,5 \times 10^8$ КУО/мл [22–24].
3. Перша експериментальна група – 10 мл суспензії клітин ($C = 5 \times 10^8$ КУО/мл) + 10 мл дистильованої води [22–24].
4. Друга експериментальна група – 10 мл суспензії клітин ($C = 5 \times 10^8$ КУО/мл) + 10 мл 2 % альгінату натрію (1% альгінату натрію в загальному об'ємі) [22–24].
5. Третя експериментальна група – 10 мл суспензії клітин ($C = 5 \times 10^8$ КУО/мл) + 10 мл 10 % ДМСО (5 % ДМСО у загальному об'ємі) [22–24].
6. Четверта експериментальна група – 10 мл суспензії клітин ($C = 5 \times 10^8$ КУО/мл) + 5 мл 20 % ДМСО + 5 мл 4 % альгінату натрію (5% ДМСО і 1 % альгінату натрію у загальному об'ємі) [22–24].

7. Контрольну групу (K1, K2, K3, K4) – зразки з кожної експериментальної групи – висівали на чашки Петрі з сусло-агаром (по 5 штук) із розбавлень (-5) та (-6) [22–24].

8. Дослідні зразки охолоджували зі швидкостями: 1; 5; 10; 15 °C/хв. до мінус 40 °C з подальшим зануренням у рідкий азот. Також заморожування зразків проводили безпосереднім зануренням у рідкий азот [22–24].

9. Зразки відігрівали на водяній бані при температурі 37 °C [22–24].

10. Життєздатність дріжджів *S. cerevisiae* оцінювали чашковим методом Коха.

11. Контроль здійснювали за життєздатністю нативних клітин дріжджів *S. cerevisiae*, ресуспендованих у вищезазначених захисних середовищах, висіваючи їх на агаризовані ростові середовища [22–24].

У ході досліджень було встановлено, що на життєздатність клітин *S. cerevisiae* у процесі кріоконсервування впливають як склад середовища кріоконсервування, так і режими охолодження. У всіх середовищах заморожування, як без захисних компонентів, так і з додаванням кріопротектора, найбільш високі результати отримані при охолодженні зі швидкістю 1 °C/хв. (рис. 4). Показники життєздатності в зразках становили відповідно: 73,1 % – у дистильованій воді; 90,8 % – в 1 % розчині альгінату натрію; 87,1 % – в 5 % розчині ДМСО і 86,1 % – в 1 % розчині альгінату натрію з додаванням 5 % ДМСО [22–24].

При підвищенні швидкості охолодження від 5 °C/хв. до 15 °C/хв. кількість життєздатних клітин вірогідно зменшувалася. При зануренні в рідкий азот показник життєздатності знижувався відповідно по групах: до 0,4; 1,9; 0,7; 0,6 % [22–24] (рис. 4, рис. 5).

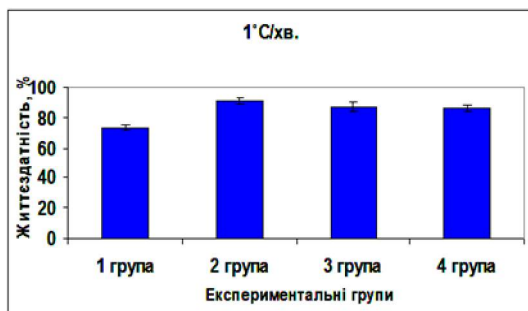


Рисунок 4 – Життєздатність клітин *S. cerevisiae* після заморожування зі швидкістю 1 °C/хв

1 групі – дистильованій воді; 2 групі – 1% розчині альгінату натрію; 3 групі – 5% розчині ДМСО; 4 групі – 1% розчині альгінату натрію + 5% ДМСО

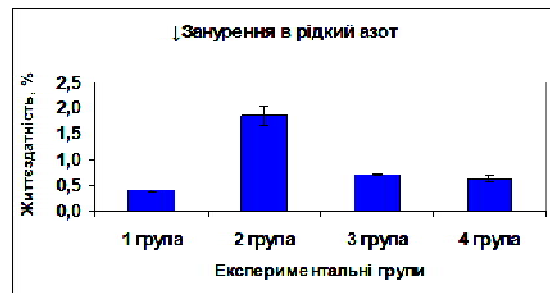


Рисунок 5 – Життєздатність клітин *S. cerevisiae*, суспендованих в наступних експериментальних середовищах, після занурення в рідкий азот

1 група – дистильована вода; 2 група – 1% розчин альгінату натрію; 3 група – 5% розчин ДМСО; 4 група – 1% розчин альгінату натрію + 5% ДМСО

Що стосується середовищ заморожування, найбільш низьку життєздатність спостерігали при заморожуванні клітин, ресуспендованих у дистильованій воді, при цьому встановлена залежність життєздатності від режимів охолодження (рис. 6).

При заморожуванні дріжджів в 1 % розчині альгінату натрію зі швидкостями 1, 5, 10, 15 °C/хв. і при зануренні в рідкий азот кількість життєздатних клітин становила

відповідно: 90,8; 74,5; 38,1; 16,0; 1,8 % [22–24] (рис. 7).

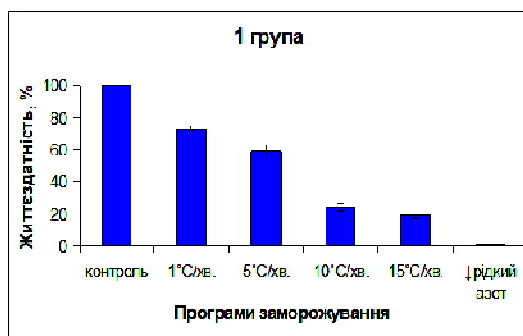


Рисунок 6 – Залежність життєздатності клітин *S. cerevisiae* від режимів охолодження при заморожуванні клітин, ресуспендованих в дистильованій воді

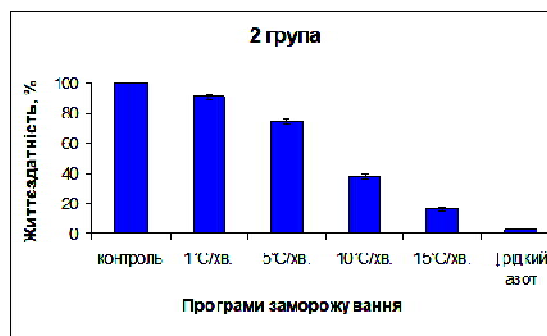


Рисунок 7 – Залежність життєздатності клітин *S. cerevisiae* від режимів охолодження при заморожуванні клітин в 1% розчині альгінату натрію

При заморожуванні клітин в 5 % розчині ДМСО і в 1 % розчині альгінату натрію з додаванням 5 % ДМСО, кількість життєздатних клітин також зменшувалася в міру підвищення швидкості охолодження, але вірогідно не відрізнялася від показника життєздатності клітин у зразках заморожених в 1 % розчині альгінату натрію [22–24] (рис. 8, рис. 9).

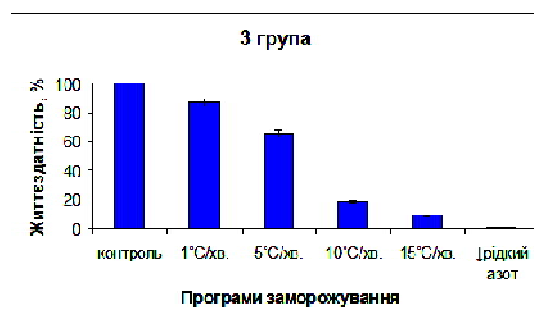


Рисунок 8 – Залежність життєздатності клітин *S. cerevisiae* від режимів охолодження при заморожуванні клітин в 5% розчині ДМСО



Рисунок 9 – Залежність життєздатності клітин *S. cerevisiae* від режимів охолодження при заморожуванні клітин в 1% розчині альгінату натрію з додаванням 5% ДМСО

Висновки. Спираючись на літературні данні було обрано методику іммобілізації та довгострокового зберігання дріжджових клітин *S. cerevisiae*.

Встановлено, що на життєздатність неіммобілізованих і іммобілізованих в альгінатному гелі клітин *S. cerevisiae* впливає режим охолодження.

Показана залежність життєздатності клітин від швидкості охолодження. Мінімальне значення кількості життєздатних клітин спостерігали при швидкому охолодженні. Зі зниженням швидкості охолодження життєздатність клітин у заморожених зразках зростала.

При всіх режимах заморожування спостерігали кризахистний ефект альгінатного гелю. Життєздатність клітин іммобілізованих препаратів була вірогідно вище в порівнянні з неіммобілізованими клітинами.

Результати експериментів показали, що життєздатність іммобілізованих клітин була вище, чим вільних клітин дріжджів. Можливо, гелева матриця проявляє протективну дію на клітини дріжджів у процесі заморожування.

Література

1. Белых И.А., Грек А.М., Сакун А.В., Марущенко В.В., Гаташ С.В. Аналиты в биосенсорах // *Біофізичний вісник*. 2010. Т. 2. № 25. С. 144–158.
2. Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. *Int J Nutr Metab*. Oct 28; 2013: 716861.
3. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы. / Под ред. Дж. Вудворда. – М.: Мир., 1988. – 215 с.
4. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. – М.: Изд-во МГУ, 1994. 288 с.
5. Самони В.В., Еликова Е.Е. Изучение закономерностей адсорбции бактериальных клеток на пористых носителях // *Микробиология*. 2004. Т. 73, № 6. С. 810–816.
6. Слабова О.И., Никитин Д.И. Иммобилизация олиготрофных бактерий на пористых носителях методом сорбции // *Микробиология*. 2005. Т. 74, № 3. С. 430–432.
7. Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А. Аэробная биodeградация формальдегида, метанола и метиламина иммобилизованными клетками *Methylobacterium extorquens* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1997. № 2. С. 162–165.
8. Nakajima N., Ishihara K., Matsuura Y. Dietary-fiber-degrading enzymes from a human intestinal *Clostridium* and their application to oligosaccharide production from non-starchy polysaccharides using immobilized cells // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2002. V. 59. P. 182–189.
9. Олонцев В.Ф., Безруков Р.А. Российские активные угли. М.: Изд-во ГУ ВШЭ, 1999. 90 с.
10. Feng Y., Racke K.D., Bollag J.-M. Use of immobilized bacteria to treat industrial wastewater containing a chlorinated pyridinol. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1997. V.47. P. 73–77.
11. Shan, H., Obbard, J. P. Ammonia removal from prawn aquaculture water using immobilized nitrifying bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001. Vol. 57. P. 791–798.
12. Elsgaard, L. Ethylene removal by a biofilter with immobilized bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 1998. Vol. 8. P. 4168–4173.
13. Kovalenko, G.A., Kuznetsova, E.V., Mogilnykh, I.S. Catalytic filamentous carbons for immobilization of biologically active substances and non-growing bacterial cells // *Carbon*. 2001. V. 39. P. 1033–1043.
14. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Хомов В.В., Комова О.В., Чуенко Н.В., Симаков А.В., Рудина Н.А. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов. IV. Биокаталитические, свойства адсорбированных дрожжевых мембран // *Биотехнология* 2004. № 6. С. 34–43.
15. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Ившина И.Б., Куюкина М.С., Рычкова М.И. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов. V. Иммобилизация нерастущих клеток дрожжей и растущих клеток алканотрофных родококков // *Биотехнология*. 2006. № 1. С. 76–83.
16. Shriver-Lake L.C., Gammeter W.B., Bang S.S., Pazirandeh M. Covalent binding of genetically engineered microorganisms to porous glass beads. // *Analytica Chimica Acta*. 2002. V.470. P. 71–78.

17. Jirku, V., Turkova, J., Colowick S.P., Kaplan N.O. Cell immobilization by covalent linkage: Methods in enzymology. Orlando: Academic Press, 1987. V. 135. P. 341–357.
18. Cabral, J.M.S., Kennedy, J.F., Colowick S.P., Kaplan N.O. Immobilization of microbial cells on transition metal-activated supports: Methods in enzymology. Orlando: Academic Press, 1987. V. 135. P. 357–372.
19. Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Парахня Е.В., Казакевич И.О. Свойства препарата иммобилизованных клеток *Arthrobacter sp.* продуцента ксилозо(глюкозо)изомеразы // Микробиология. 2003. Т. 72, N. 3. С. 395–399.
20. Domingo J.S., Radway J.C., Wilde E. W., Hermann P., Hazen T.C. Immobilization of Burkholderia ceracia in polyurethanebased foams: embedding efficiency and effect on bacterial activity. // J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 1997. V.18. P. 389–395.
21. Park, J.K., Chang, H.N. Microencapsulation of microbial cells // Biotechnol. Advances. 2000. V. 18. P. 303–319.
22. Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Гурина Т.М., Онасенко Е.С., Пишко О.В. Изучение влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, иммобилизованных в альгинатном геле // Вісник проблем біології і медицини. 2012. № Т.1, № 2. С. 14–17.
23. Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Гурина Т.М., Онасенко Е.С. Изучение влияния режимов охлаждения и защитных сред, содержащих альгинат натрия, на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Вісник проблем біології і медицини. 2011. № 3 (1). С. 35–37.
24. Подпоріна М.С., Белих І.А., Бабінець О.М., Висеканцев І.П. Визначення умов іммобілізації пробіотиків *Saccharomyces boulardii* та *Bifidobacterium bifidum* на ентеросорбентах // Матер. V Всеукр. наук.-практич. конф. Кам'янець-Подільський, 2011.
25. Правдюк А.И., Петренко Ю.А., Холодный В.С., Грищук В.П., Петренко А.Ю. Изучение криочувствительности мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер // Пробл. криобиологии. 2010. Т. 20, № 3. С. 235–245.
26. Еременко Е.Н., Татарина Н.Ю. Влияние длительного хранения клеток микроорганизмов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, на их выживаемость и биосинтез целевых метаболитов // Микробиология. 2007. Т. 76. № 3. С. 383–389.
27. Висеканцев І.П., Петров І.В., Буряк І.А., Марценюк В.П. Життєздатність та адгезія до еритроцитів людини пробіотичних штамів мікроорганізмів після іммобілізації в альгинатному гелі і зберігання за різних низьких температур // Вісник Українська медична стоматологічна академія. 2020. Т.2, Вип. 4 (72). С. 115–124.
28. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Под ред. М.О. Бигера Изд-во «Медицина» Москва, 1967. С. 85–86.
29. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. Криоконсервирование клеточных суспензий. К.: Наук. думка, 1983. 240 с.

Bibliography (transliterated)

1. Bielykh I.A., Grek A.M., Sakun A.V., Maruschenko V.V., Gatash S.V. Analitiy v biosensorah // Biofizichniy visnik. 2010. Т. 2. N 25. P. 144–158.
2. Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. Int J Nutr Metab. Oct 28; 2013: 716861.
3. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы. / Под ред. Д.В. Вудворда. – М.: Мир., 1988. – 215 с.
4. Sinitsyn A.P., Raynina E.I., Lozinskiy V.I., Spasov S.D. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. – М.: Изд-во МГУ, 1994. 288 с.

5. Samoni V.V., Elikova E.E. Izuchenie zakonomernostey adsorbtsii bakterialnykh kletok na poristyykh nositelyakh // *Mikrobiologiya*. 2004. T. 73, N 6. P. 810–816.
6. Slabova O.I., Nikitin D.I. Immobilizatsiya oligotrofnyykh bakteriy na poristyykh nositelyakh metodom sorbtsii // *Mikrobiologiya*. 2005. T. 74, N 3. P. 430–432.
7. Doronina N.V., Ezhov V.A., Trotsenko Yu.A. Aerobnaya biodegradatsiya formaldegida, metanola i metilamina immobilizovannyimi kletkami *Methylobacterium extorquens* // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 1997. N 2. P. 162–165.
8. Nakajima N., Ishihara K., Matsuura Y. Dietary-fiber-degrading enzymes from a human intestinal *Clostridium* and their application to oligosaccharide production from non-starchy polysaccharides using immobilized cells // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 59. P. 182–189.
9. Olontsev V.F., Bezrukov R.A. Rossiyskie aktivnyie ugli. M.: Izd-vo GU VShE, 1999. 90 s.
10. Feng Y., Racke K.D., Bollag J.-M. Use of immobilized bacteria to treat industrial wastewater containing a chlorinated pyridinol. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997. V.47. P. 73–77.
11. Shan, H., Obbard, J. P. Ammonia removal from prawn aquaculture water using immobilized nitrifying bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001. Vol. 57. P. 791–798.
12. Elsgaard, L. Ethylene removal by a biofilter with immobilized bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 1998. Vol. 8. P. 4168–4173.
13. Kovalenko, G.A., Kuznetsova, E.V., Mogilnykh, I.S. Catalytic filamentous carbons for immobilization of biologically active substances and non-growing bacterial cells // *Carbon*. 2001. V. 39. P. 1033–1043.
14. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Homov V.V., Komova O.V., Chuenko N.V., Simakov A.V., Rudina N.A. Uglersoderzhaschie makrostrukturirovannyye keramicheskie nositeli dlya adsorbtsionnoy immobilizatsii fermentov i mikroorganizmov. IV. Biokataliticheskie, svoystva adsorbiruyemykh drozhzhevyykh membran // *Biotehnologiya* 2004. N 6. P. 34–43.
15. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Chuenko T.V., Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Ryichkova M.I. Uglersoderzhaschie makrostrukturirovannyye keramicheskie nositeli dlya adsorbtsionnoy immobilizatsii fermentov i mikroorganizmov. V. Immobilizatsiya nerastuschih kletok drozhzhey i rastuschih kletok alkanotrofnyykh rodokokkov // *Biotehnologiya*. 2006. N 1. P. 76–83.
16. Shriver-Lake L.C., Gammeter W.B., Bang S.S., Pazirandeh M. Covalent binding of genetically engineered microorganisms to porous glass beads. // *Analytica Chimica Acta*. 2002. V.470. P. 71–78.
17. Jirku, V., Turkova, J., Colowick S.P., Kaplan N.O. Cell immobilization by covalent linkage: *Methods in enzymology*. Orlando: Academic Press, 1987. V. 135. P. 341–357.
18. Cabral, J.M.S., Kennedy, J.F., Colowick S.P., Kaplan N.O. Immobilization of microbial cells on transition metal-activated supports: *Methods in enzymology*. Orlando: Academic Press, 1987. V. 135. P. 357–372.
19. Sapunova L.I., Lobanok A.G., Parahnya E.V., Kazakevich I.O. Svoystva preparata immobilizovannykh kletok *Arthrobacter* sp. produtsenta ksilozo(glyukozo)izomerazyi // *Mikrobiologiya*. 2003. T. 72, N. 3. P. 395–399.
20. Domingo J.S., Radway J.C., Wilde E. W., Hermann P., Hazen T.C. Immobilization of *Burkholderia cepacia* in polyurethanebased foams: embedding efficiency and effect on bacterial activity. // *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 1997. V.18. P. 389–395.
21. Park, J.K., Chang, H.N. Microencapsulation of microbial cells // *Biotechnol. Advances*. 2000. V. 18. P. 303–319.
22. Ponomareva V.L., Vysekantsev I.P., Hurya T.M., Onasenko E.S., Pyshko O.V. Yzuchenye vliyaniya uslovyi kryokonservirovaniya na zhyznesposobnost kletok drozhei

Saccharomyces cerevisiae, уммобыльзованных в алънатыном хеле // *Visnyk problem biolohii i medytsyny*. 2012. № Т.1, № 2. P. 14–17.

23. Ponomarieva B.L., Vysekantsev I.P., Huryna T.M., E.S. Onasienko E.S. Izuchenye vlyaniya rezhymov okhlazhdeniya y zashchytnykh sred, sodержashchykh алънаты натрыя, на zhyznesposobnost kletok drozhzhei *Saccharomyces cerevisiae* // *Visnyk problem biolohii i medytsyny*. 2011. N 3 (1). P 35–37.

24. Podporina M.S., Bielykh I.A., Babinets O.M., Vysekantsev I.P. Vyznachennia umov immobilizatsii probiotykyv *Saccharomyces boulardii* та *Vifidobacterium bifidum* на enterosorbentakh // *Mater. V Vseukr. nauk.-praktych. konf. Kamianets-Podilskyi*, 2011.

25. Pravdiuk A.Y., Petrenko Yu.A., Kholodnyi V.S., Hryshchuk V.P., Petrenko A.Iu. Izuchenye kryochuvstvytelnosti mezenkhymalnykh stromalnykh kletok v sostave алънатыnykh mykrosfer // *Probl. kryobyolohyy*. 2010. T. 20, № 3. P. 235–245.

26. Eremenko E.N., Tatarynova N.Iu. Vlyaniye dlytelnoho khraneniya kletok mykroorhanizmov, ummobыльзованыkh v kryohel polyvynylovoho spyрта, на ykh vyzhyvaemost i byosyntezy tselevykh metabolitov // *Mykrobyolohyia*. 2007. T. 76. N 3. P. 383–389.

27. Vysekantsev I.P., Petrov I.V., Buriak I.A., Martseniuk V.P. Zhyttiezdatnist та adhezii do erytrocytiv liudyny probiotychnykh shtamiv mikroorhanizmiv pislia immobilizatsii v алънатыному хели i zberihanniya за rизnykh nyzkykh temperatur // *Visnyk Ukrainaska medychna stomatolohichna akademiia*. 2020. T. 2, Vyp. 4 (72). P. 115–124.

28. Spravochnyk po mykrobyolohycheskym y vyrusolohycheskym metodam yssledovaniya. Pod red. M.O. Byhera Yzd-vo «Medytsyna» Moskva, 1967. P. 85–86.

29. Tsutsaeva A.A., Ahranenko V.A., Fedorova L.Y. Kryokonservyrovanye kletochnykh suspenzyi. – K.: Nauk. dumka, 1983. 240 p.

УДК 663.14;57.086.1

Белих І.А., к.біол.н., доцент, Самойленко С.І., к.техн.н., доцент,
Висеканцев І.П., к.мед.н., с.н.с., Белінська А.П., к.техн.н., доцент, Варанкіна О.О.,
к.техн.н., доцент, Близнюк О.М., д.техн.н., професор, Масалітіна Н.Ю., к.техн.н., доцент,
Мироненко Л.С., к.техн.н., Кукушкін А.І., к.біол.н.

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В БІОТЕХНОЛОГІЧНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ

Робота присвячена сучасному стану та проблемам іммобілізації клітин мікроорганізмів, а також довгостроковому зберіганню систем іммобілізованих клітин для потреб біотехнологічних виробництв.

В експериментальній частині розроблені умови іммобілізації дріжджових клітин *S. cerevisiae* в альгінатному гелі та визначення їх життєздатності, що давало високу повторюваність результатів дослідів.

Результати експериментів показали, що життєздатність іммобілізованих клітин була вище, чим вільних клітин дріжджів. Так, при заморожуванні дріжджів в 1 % розчині альгінату натрію зі швидкостями 1, 5, 10, 15°C/хв. і при зануренні в рідкий азот кількість життєздатних клітин становила: 90,8; 74,5; 38,1; 16,0; 1,8 %. На основі аналізу літературних джерел, можна зробити висновок що, гелева матриця проявляє кріопротективну дію на клітини дріжджів у процесі заморожування.

Вивчено комплексний вплив режимів охолодження та консервуючих захисних середовищ, що містять альгінат натрію, на життєздатність дріжджів. Експериментально показано перевагу зберігання клітин в іммобілізованому стані. Встановлено, що на життєздатність клітин *S. cerevisiae* в процесі кріоконсервування впливають швидкість охолодження і склад середовища консервування. У всіх середовищах заморожування,

як без захисних компонентів, так і з додаванням криопротектора, найбільш високі результати отримані при охолодженні зі швидкістю 1 °С/хв. Показники життєздатності в зразках становили: 73,1 % – у дистильованій воді; 90,8 % – в 1 % розчині альгінату натрію; 87,1 % – в 5 % розчині ДМСО і 86,1 % – в 1 % розчині альгінату натрію з додаванням 5 % ДМСО. При заморожуванні клітин в 5 % розчині ДМСО і в 1 % розчині альгінату натрію з додаванням 5 % ДМСО, кількість життєздатних клітин також зменшувалася в міру підвищення швидкості охолодження, але вірогідно не відрізнялася від показника життєздатності клітин у зразках заморожених в 1 % розчині альгінату натрію. Для клітин *S. cerevisiae* найкращі результати за життєздатністю отримані при повільному охолодженні для всіх криозахисних середовищ.

Одержані результати дозволяють рекомендувати альгінат натрію як носій криоконсервованих іммобілізованих клітин при використанні в біотехнологічних виробництвах для одержання біологічно активних речовин.

Ключові слова: іммобілізація клітин, включення в структуру гелю, альгінатні мікросфери, криоконсервування, життєздатність клітин, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*

Белых И.А., Самойленко С.И., Высеканцев И.П., Белинская А.П., Варанкина А.А.,
Близнюк О.Н., Масалитина Н.Ю., Мироненко Л.С., Кукушкин А.І.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ ДРОЖДЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Работа посвящена современному состоянию и проблемам иммобилизации клеток микроорганизмов, а также долгосрочному хранению систем иммобилизованных клеток для биотехнологических производств.

В экспериментальной части разработаны условия иммобилизации дрожжевых клеток *S. cerevisiae* в альгинатном геле и определение их жизнеспособности, что давало высокую воспроизводимость результатов опытов.

Результаты экспериментов показали, что жизнеспособность иммобилизованных клеток была выше, чем свободных клеток дрожжей. Так, при замораживании дрожжей в 1 % растворе альгината натрия со скоростями 1, 5, 10, 15 °С/мин. и при погружении в жидкий азот количество жизнеспособных клеток составляло: 90,8; 74,5; 38,1; 16,0; 1,8 %. На основе анализа литературных источников, можно сделать вывод, что гелевая матрица оказывает криопротективное действие на клетки дрожжей в процессе замораживания.

Изучено комплексное влияние режимов охлаждения и консервирующих защитных сред, содержащих альгинат натрия, на жизнеспособность дрожжей. Экспериментально показано преимущество хранения клеток в иммобилизованном состоянии. Установлено, что на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* в процессе криоконсервирования оказывают влияние скорость охлаждения и состав среды консервирования. Во всех средах замораживания, как без защитных компонентов, так и с добавлением криопротектора, наиболее высокие результаты получены при охлаждении со скоростью 1 °С/мин. Показатели жизнеспособности в образцах составляли: 73,1 % – в дистиллированной воде; 90,8 % – в 1 % растворе альгината натрия; 87,1 % – в 5 % растворе ДМСО и 86,1 % – в 1 % растворе альгината натрия с добавлением 5 % ДМСО. При замораживании клеток в 5 % растворе ДМСО и в 1 % растворе альгината натрия с добавлением 5 % ДМСО, количество жизнеспособных клеток также уменьшалось по мере повышения скорости охлаждения, но вероятно не отличалось от показателя жизнеспособности клеток в образцах, замороженных в 1 % растворе альгината натрия. Для клеток

S. cerevisiae наилучшие результаты по жизнеспособности получены при медленном охлаждении для всех криозащитных сред.

Полученные результаты позволяют рекомендовать альгинат натрия как носитель иммобилизованных криоконсервированных клеток при использовании в биотехнологических производствах для получения биологически активных веществ.

Ключевые слова: иммобилизация клеток, включение в структуру геля, альгинатные микросферы, криоконсервирование, жизнеспособность клеток, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*

Bielykh I.A., Samoilenko S.I., Belinska A.P., Varankina O.O., Blyzniuk O.N.,
Masalitina N.Yu., Myronenko L.S., Kukushkin A.I.

USE OF ANALYSIS TECHNIQUE FOR IMMOBILIZED YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN THE BIOTECHNOLOGICAL INDUSTRY

Article is devoted to the current state and problems of microbial cells immobilization and also prolonged storage of immobilized cells systems for the aims of biotechnological industry.

In the experimental part immobilization conditions for the cells *S. cerevisiae* in alginate gel and vitality test, which had given high reproducibility of experimental results, were developed.

Experimental results showed that viability of immobilized cells was higher than that of free yeast cells. It is possible that gel matrix has a protective effect on yeast cells during freezing.

Comprehensive effect of cooling modes and preservation protective mediums, which contain sodium alginate, on viability of yeasts has been investigated. Advantage of yeast cells storage in immobilized state was shown experimentally. It was found that cooling mode and composition of preservation medium affect on the viability of *S. cerevisiae* cells during cryopreservation. In all freezing medium, both without protective components and with addition of a cryoprotective agent, the best results were obtained with cooling at a rate of 1°C/min. Viability indices in the samples were: 73.1 % – in distilled water; 90.8 % – in 1 % sodium alginate solution; 87.1 % – in 5 % DMSO solution and 86.1 % – in 1 % sodium alginate solution with the addition of 5 % DMSO. When cells were frozen in a 5 % DMSO solution and in a 1 % sodium alginate solution with the addition of 5 % DMSO, number of viable cells also decreased as cooling rate increased, but, probably, did not differ from the cell viability index in those samples that were frozen in 1 % sodium alginate solution. The highest results of viability for *S. cerevisiae* yeast cells were obtained during slow cooling for all cryoprotective mediums. For the first time, high cryoprotective properties of sodium alginate solution, were shown.

Obtained results are enable to recommend the sodium alginate as a carrier for cryopreserved immobilized cells when using it in biotechnological processing for biologically active substances production.

Keywords: cell immobilization, gel inclusions into structure, alginate microspheres, cryopreservation, cell viability, yeast *Saccharomyces cerevisiae*.