

УДК 582.282.232:615.014.41

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

Влияние внутриклеточной трегалозы на сохранность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* после криоконсервирования

UDC 582.282.232:615.014.41

V.L. Ponomareva*, I.P. Vysekantsev, E.S. Onasenko

Effect of Intracellular Trehalose on Post-Thaw Survival of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells

Ключевые слова: дрожжи, криоконсервирование, иммобилизация, трегалоза, жизнеспособность.

Ключові слова: дріжджі, криоконсервування, іммобілізація, трегалоза, життєздатність.

Key words: yeast, cryopreservation, immobilization, trehalose, viability.

В настоящее время технологические процессы с использованием низких температур широко применяются в различных областях биотехнологических производств. На стадиях постферментационной обработки биологические материалы подвергаются замораживанию, сублимационной сушке, концентрированию вымораживанием, криогрануляции. Однако с началом использования низких температур в биотехнологии возникли проблемы, связанные с частичной утратой жизнеспособности и функциональных свойств различных промышленных штаммов микроорганизмов. Применение «классических» криопротекторов для решения этой проблемы не всегда приемлемо из-за нежелательного их присутствия в конечных продуктах биотехнологических производств по причине токсичности. По своей природе большинство широко используемых криопротекторов являются чужеродными веществами для живых клеток. При помещении клеток в растворы таких криопротекторов происходит их обезвоживание, наблюдаются химические реакции криопротекторов с клеточными веществами с образованием различных комплексов, изменяются физико-химические свойства как суспензионной, так и внутриклеточной сред. Решением этой проблемы может быть предварительное повышение внутриклеточного содержания природных криопротекторов, одним из представителей которых является трегалоза, которая надежно защищает клетку от стресса, вызванного обезвоживанием, действием высоких и низких температур. Известно, что определенная концентрация трегалозы

Nowadays the low temperature based technological processes are widely used in various fields of biotechnology industry. During post-enzyme treatment the biological specimens could be exposed to freezing, freeze-drying, concentrating by freezing-out or cryogranulation. Nevertheless, the application of low temperatures in biotechnology gave rise to the problems associated with partial loss of viability and functional properties of various industrial strains of microorganisms. Application of 'classical' cryoprotectants to solve this problem is not always reasonable because their presence in final products of biotechnological industry is undesirable due to their toxicity. Generally, the most commonly used cryoprotectants are foreign substances for viable cells. Placing the cells into cryoprotectant solutions leads to dehydration, chemical reactions of cryoprotectants with cell structures, that results in formation of various complexes as well as changes in physico-chemical properties of both suspension and intracellular environments. One of the answers to this problem may be preliminary raising of natural cryoprotectants concentration inside the cell. One of representatives of such substances is trehalose which protects cell from stress caused by dehydration, as well as the effect of high and low temperatures. It is known that a certain concentration of trehalose in the cells provides more homogeneous crystallization and the shift of eutectic zone to the lower temperature zone [1]. Since yeasts possess a natural ability to accumulate a large amount of trehalose, they are a convenient model for studying the response of free and immobilized cells to cold stress [2].

Отдел долгосрочного хранения биологических объектов при низких температурах, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Department of Long Term Storage of Biological Objects at Low Temperatures, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 372-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: viktorii_may@mail.ru

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: viktorii_may@mail.ru

Поступила 05.11.2013
Принята в печать 06.05.2014

Received November, 05, 2013
Accepted May, 06, 2014

в клетках обеспечивает более равномерное протекание процесса кристаллообразования и смещение эвтектической зоны в зону более низких температур [8]. Поскольку дрожжи обладают естественной способностью накапливать большое количество трегалозы, они представляют собой удобную модель для изучения ответа свободных и иммобилизованных клеток на холодовой стресс [9].

Целью данной работы было изучение влияния внутриклеточного содержания трегалозы в свободных и иммобилизованных клетках *Saccharomyces cerevisiae* на сохранность дрожжей в процессе замораживания.

Объектом исследования были дрожжевые клетки *S. cerevisiae* (раса получена из РНИИ хлебопекарской промышленности, г. Санкт-Петербург). Дрожжи культивировали по стандартной методике в неохмеленном пивном сусле (8°Б) при 30°C с аэрацией до начала стационарной фазы роста [5]. Известно, что синтез трегалозы активизируется при переходе культуры из логарифмической в стационарную фазу роста [10].

Иммобилизацию клеток в альгинатном геле («Foodchem International Corporation», Китай) проводили по методу, предложенному в [7]. Альгинатные гранулы стабилизировали в водном растворе 0,1 М хлорида кальция в течение 15 мин. Исходная концентрация клеток во всех образцах составляла 10⁸ КОЕ/мл. Суспензии клеток и гелевые гранулы вносили в криопробирки («Nunc», Дания) с рабочим объемом 1,8 мл. В ходе исследования были реализованы неконтролируемые скорости охлаждения. Образцы замораживали прямым погружением криопробирок в жидкий азот (–196°C). Отогревали криопробирки на водяной бане при температуре 37°C. Деполимеризацию гранул проводили в 4%-м водном растворе этилендиаминтетраацетата («Simagchem Corporation», Китай). Жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae* оценивали по их способности образовывать макроколонии на поверхности агаризованных сред («чашечный» метод Коха) [2]. Внутриклеточное содержание трегалозы измеряли методом жидкостной хроматографии на высокоэффективном хроматографе («Zibo», Китай). Для подготовки образцов к анализу использовали метод, описанный в работе Т. Nakamura [10]. Контролем служили образцы, не подвергавшиеся охлаждению.

С целью изучения влияния внутриклеточных протекторов на криорезистентность клеток *S. cerevisiae* были взяты образцы свободных в суспензии и иммобилизованных в гранулах клеток дрожжей.

Учитывая то, что оптимальными для накопления трегалозы в клетках дрожжей являются температуры в интервале 35...45°C, часть образцов перед замораживанием культивировали 2 ч в термостате при температуре 40°C. Клетки, в некоторых образцах были

The research aim was to study the effect of intracellular trehalose in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells on the survival of yeast during freezing.

The objects of research were *S. cerevisiae* yeast cells (samples were obtained from Scientific Research Institute of Baking Industry, Russia). Yeasts was cultured by standard method in unhopped beer wort (8°Balling) at 30°C with aeration until the start of the stationary growth phase [6]. It is known that the synthesis of trehalose is activated after the transition of culture from the logarithmic to the stationary phase [5].

Immobilization of cells in alginate gel (Foodchem International Corporation, China) was performed by the method proposed previously [11]. Alginate beads were stabilized in aqueous solution of 0.1 M calcium chloride for 15 min. The initial cell concentration in all the samples was 10⁸ CFU/ml. Cell suspensions and gel beads were put to cryovials (Nunc, Denmark) of 1.8 ml handling volume. The study was performed using uncontrolled cooling rates. The samples were frozen by direct plunging of cryovials into liquid nitrogen (–196°C). The cryovials were warmed in water bath at 37°C. The beads were depolymerized in 4% aqueous solution of ethylenediaminetetraacetate (Simagchem Corporation, China). Viability of *S. cerevisiae* yeast was assessed by their ability to form macrocolonies on the surface of agar media (Koch's Pour Plate method) [4]. Intracellular trehalose content was measured by liquid chromatography with high-performance chromatograph (Zibo, China). To prepare the samples for analysis we used the method of T. Nakamura [5]. The samples not exposed to cooling were denoted as the control.

To study the effect of intracellular protective agents on cryoresistance of *S. cerevisiae* cells the samples of free (in suspension) and immobilized (in beads) yeast cells were compared.

Considering the fact that temperature range of 35...45°C is optimal for providing the accumulation of trehalose in the yeast cells, a part of the samples before freezing was cultured in thermostat for 2 hrs at 40°C. Cells in part of the samples were immobilized in sodium alginate beads after temperature control. Thus, all the samples were divided into 5 experimental groups: 1 – free cells; 2 – immobilized cells; 3 – free cells incubated at 40°C; 4 – free cells incubated at 40°C with the following immobilization; 5 – immobilized cells with the following incubation at 40°C.

The data were statistically processed by Student's t-test using Excel (Microsoft, USA) [3]. The data were presented as arithmetic mean ± arithmetic mean error. Differences between the groups were considered as significant at $p < 0.05$.

It was found that trehalose content in yeast cells before incubation was (4.37 ± 0.15) mg/g of dry matter



иммобилизованы в гранулы альгината натрия после термостатирования. Таким образом, все образцы были разделены на 5 экспериментальных групп: 1 – свободные клетки; 2 – иммобилизованные клетки; 3 – свободные клетки, инкубированные при температуре 40°C; 4 – свободные клетки, инкубированные при температуре 40°C с последующей иммобилизацией; 5 – иммобилизованные клетки с последующей инкубацией при температуре 40°C.

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с учетом коэффициента Фишера с применением компьютерной программы Excel («Microsoft», США) [1]. Данные представляли как среднее арифметическое значение ± ошибка среднего арифметического. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Установлено, что концентрация трегалозы в нативных клетках дрожжей до термостатирования составляла $(4,37 \pm 0,15)$ мг/г сухого вещества (таблица). Полученные результаты свидетельствуют о том, что культивирование в течение 2 ч как свободных, так и иммобилизованных клеток дрожжей при температуре 40°C приводит к повышению внутриклеточного содержания трегалозы. Вместе с тем уровень концентрации трегалозы в образцах с иммобилизованными клетками был значительно выше, чем у свободных клеток в суспензии. Мы полагаем, что это может быть связано с тем, что клетки дрожжей, иммобилизованные в геле альгината натрия перед замораживанием, находились в двойной стрессовой ситуации: от неблагоприятного действия повышенной температуры и иммобилизации. Как известно, трегалоза в дрожжах играет роль протектора целостности клеток при неблагоприятных условиях культивирования. В ходе исследования было установлено, что удельная концентрация трегалозы в дрожжевых клетках группы 4 перед замораживанием была в 2 раза выше, чем в образцах группы 5. В связи с этим нами было высказано предположение, что более низкое содержание трегалозы в образцах группы 5 может быть связано с тем, что негативное влияние повышенной температуры смягчалось предварительной иммобилизацией клеток. Следует отметить, что данное утверждение базируется на проведенных ранее исследованиях, которые свидетельствуют о том, что, с одной стороны, альгинатная матрица выполняет функцию защитного экрана от неблагоприятных условий окружающей среды (температура, pH), с другой – стрессовая реакция клетки, инициируемая процессом иммобилизации, сопровождается генерацией активных форм кислорода, активацией энергетического метаболизма [4]. Это является причиной роста метаболической активности и увеличения количества резервных полисахаридов (гликогена и трегалозы) в иммобилизованных клетках дрожжей.

Внутриклеточное содержание трегалозы в клетках дрожжей *S.cerevisiae* до и после криоконсервирования

Intracellular content of trehalose in *S.cerevisiae* yeast cells prior to and after cryopreservation.

Группы Groups	Концентрация трегалозы, мг/г сухого вещества Trehalose content, mg/g of dry matter	
	До замораживания (контроль) Prior to freezing (control)	После замораживания After freezing
1	$4,37 \pm 0,15$	$2,67 \pm 0,11^1$
2	$6,56 \pm 0,23$	$2,62 \pm 0,12^1$
3	$10,93 \pm 0,76$	$5,33 \pm 0,26^1$
4	$28,65 \pm 1,01^{2,3}$	$24,87 \pm 0,89$
5	$13,44 \pm 0,87^{2,3,4}$	$9,13 \pm 0,83^1$

Примечание: ¹ – различия статистически значимы по отношению к контролю; ² – относительно группы 2; ³ – относительно группы 3; ⁴ – относительно группы 4; $p < 0,05$.

Note: ¹ – the differences are statistically significant if compared to the control; ² – if compared to the group 2; ³ – if compared to the group 3; ⁴ – if compared to the group 4; $p < 0.05$.

(Table). The obtained results showed that culturing for 2 hrs of both free and immobilized yeast cells at 40°C caused the increase of intracellular trehalose content. Level of trehalose concentration in the samples with immobilized cells was significantly higher than in those with free cells in suspension. This is probably associated with the fact that yeast cells immobilized in sodium alginate gel before freezing suffered a double stress due to unfavorable conditions of culturing. It is known that trehalose in yeast provides a defence of cell structures when being in unfavorable conditions of culturing. In this study we have found that the specific concentration of trehalose in yeast cells of group 4 before freezing was 2 times higher than in the samples of group 5. The lower trehalose content in the samples of group 5 may be likely associated with the fact that the negative influence of high temperature was lessened by cell immobilization in alginate gel. It should be noted that this suggestion is based on the previous studies, which show that on the one hand alginate matrix functions as a protective envelope against adverse environmental conditions (temperature, pH), on another – the immobilization procedure initiates the cell stress response, accompanied by generation of reactive oxygen species, and activation of energy metabolism [9]. This could be the reason for the observed increase in metabolic activity and rise in the amount of reserve polysaccharides (glycogen and trehalose) in immobilized yeast cells.

At the second stage of the research we studied the effect of trehalose content on cell viability of *S. cerevisiae* cells during cryopreservation (Figure).



На втором этапе исследования было изучено влияние содержания трегалозы на жизнеспособность клеток дрожжей *S. cerevisiae* в процессе криоконсервирования (рисунок).

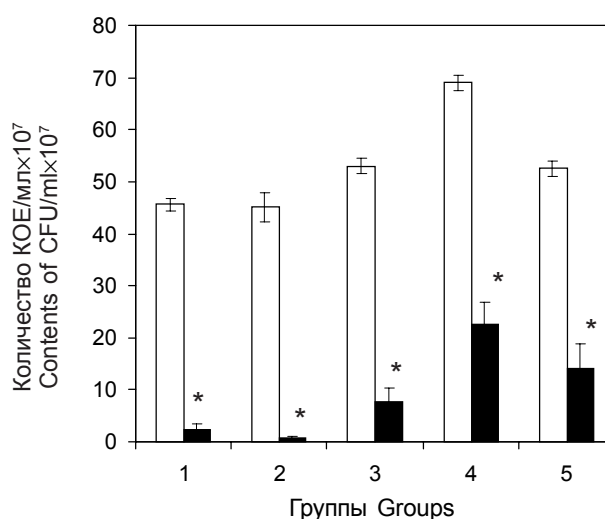
Проведенные нами ранее исследования свидетельствуют о том, что наиболее оптимальными как для свободных клеток дрожжей, так и иммобилизованных, являются медленные скорости охлаждения [3]. При быстром охлаждении микроорганизмов происходит изменение барьерных свойств мембран, в них образуются гидрофильные каналы, через которые происходит утечка из клеток веществ. Потеря некоторых структурных белков мембран сильно снижает выживаемость клеток. Однако для того, чтобы продемонстрировать наибольший эффект от влияния предварительной подготовки клеточной суспензии к криоконсервированию нами была выбрана не оптимальная, а наиболее жесткая программа замораживания.

Установлено, что показатели жизнеспособности образцов (группы 3–5) культивированных перед охлаждением при температуре 40°C, были значительно выше, чем у образцов не подвергшихся культивированию при данной температуре (группы 1 и 2). Жизнеспособность клеток в образцах соответственно составляла (14,72 ± 4,7); (32,75 ± 7,11); (27,06 ± 6,36)% от контроля. Вероятно, что такие высокие показатели сохранности клеток обусловлены повышенным содержанием трегалозы в этих образцах.

Известно, что трегалоза является уникальным природным криопротектором. При глубоком замораживании она защищает клетку от обезвоживания, что, в свою очередь, предотвращает разрушение мембраны и повреждение клеточных органелл, препятствует инактивации и агрегации белков. Более высокие показатели жизнеспособности в образцах групп 4 и 5, очевидно, связаны с тем, что внутриклеточное содержание трегалозы в образцах иммобилизованных клеток было выше, чем в образцах свободных клеток (группа 3), после инкубирования в термостате при температуре 40°C.

Другим важным качеством трегалозы, определяющим ее криозащитные свойства, является способность к увеличению вязкости цитоплазмы, что приводит к уменьшению вероятности формирования внутриклеточных кристаллов льда и, как результат, к снижению гибели клеток. С помощью электронной микроскопии установлено, что иммобилизованные клетки дрожжей отличаются от свободных большей плотностью цитоплазмы [6].

Иммобилизованные дрожжи (группа 2) с низким содержанием трегалозы имели минимальные показатели жизнеспособности, что, вероятно, связано как с недостаточным защитным действием присутствующей в клетках трегалозы, так и с повреждением целостности структуры альгинатной гранулы при



Влияние внутриклеточного содержания трегалозы на жизнеспособность свободных и иммобилизованных клеток дрожжей *S. cerevisiae*: □ – до замораживания; ■ – после замораживания-отогрева; * – различия статистически значимы по отношению к контролю, $p < 0,05$.
Effect of intracellular trehalose content on viability of free and immobilized *S.cerevisiae* cells; □ – before freezing; ■ – post-thaw; * – the differences are statistically significant as compared to the control, $p < 0.05$.

Our previous studies indicate that slow cooling rates are the most optimal for both free and immobilized yeast cells [8]. Rapid cooling of microorganisms is accompanied with the changes in membrane barrier properties, including formation of hydrophilic channels through which substances leave the cells. Loss of several membrane structural proteins results in a sharp fall in cell survival. In order to demonstrate the effect on cryopreservation outcome exhibited by cell suspension pretreatment, we chose the most rigid freezing program.

It was established that post-thaw viability in the samples (groups 3–5) cultured before cooling at 40°C was significantly higher than those in the samples not exposed to culturing at the stated temperature (groups 1 and 2). Cells viability in groups 3–5 in relation to the control made (14.72 ± 4.7); (32.75 ± 7.11); and (27.06 ± 6.36)%, respectively. Such high indices are likely stipulated by the increased trehalose content in these samples.

It is known that trehalose is a unique natural cryoprotectant. During deep freezing it protects a cell from dehydration, which in turn prevents the membrane damage and destruction of cell organelles, inhibits inactivation and aggregation of proteins. Higher rates of viability in the samples of the groups 4 and 5 if compared with group 3 are obviously stipulated due to the fact that intracellular trehalose content in the samples of immobilized cells was higher than in the samples of free cells (group 3) after incubation in thermostat at 40°C.

использовании высоких скоростей охлаждения. Что неоднократно было установлено нами в ходе исследований [3]. Поскольку показатель жизнеспособности клеток в образцах иммобилизованных клеток после термостатирования (группы 4 и 5) был значительно выше по сравнению группой 2, можно предположить о суммарном криозащитном эффекте трегалозы и альгинатного геля.

Таким образом, в ходе исследований установлено, что внутриклеточное содержание трегалозы коррелирует с показателями жизнеспособности свободных и иммобилизованных в альгинатном геле клеток дрожжей *S.cerevisiae* после быстрого замораживания. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности метода, позволяющего прогнозировать исходную криорезистентность клеток дрожжей, повышая устойчивость к неблагоприятным факторам замораживания на этапе культивирования.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 460 с.
2. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. – Пущино, 1990. – 186 с.
3. Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Гурина Т.М. и др. Изучение влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, иммобилизованных в альгинатном геле // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Т.1, № 92. – С. 14–17.
4. Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Онасенко Е.С. и др. Функциональная активность криоконсервированных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, иммобилизованных в альгинатном геле // Материалы Международной заочной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии». – Сыктывкар, 2014. – С. 214–219.
5. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – С.115.
6. Саривили Н.Г. Микробиологические основы технологии шампанских вин. – М.: Пищевая пром., 2000. – 364 с.
7. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. – М.: МГУ, 1994. – С. 162.
8. de Antoni G.L., Perez P., Abraham A. et al. Trehalose, a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus* // Cryobiology. – 1989. – Vol. 26. – P. 149–153.
9. Diniz-Mendes L., Bernandes E., de Araujo P.S. et al. Preservation of frozen yeast cells by trehalose // Biotechnol. Bioeng. – 1999. – Vol. 65, №5 – P. 572–578.
10. Nakamura T., Takagi H., Shima J. Effects of ice-seeding temperature and intracellular trehalose contents on survival of frozen *Saccharomyces cerevisiae* cells // Cryobiology. – 2009. – Vol. 58 – P. 170–174.
11. Panek AD. Trehalose metabolism – new horizons in technological applications // Braz. J. Med. Biol. Res. – 1995. – Vol. 28, №2. – P. 169–181.

Another important feature of trehalose determining its cryoprotective properties is the ability to increase the viscosity of cytoplasm, that in its turn decreases the probability of intracellular ice crystal formation. Electron microscopy allowed us to reveal that immobilized yeast cells differ from the free ones by higher cytoplasm density [10].

Immobilized yeast (group 2) samples with lower trehalose content had minimal viability that was possibly due to both insufficient amount of trehalose to exhibit significant protective effect and damaged structure of alginate beads stipulated by high cooling rates [8]. Since the viability in the samples of immobilized cells after incubation at 40°C (groups 4 and 5) was significantly higher than in group 2 we might suggest the existence of cryoprotective effect of trehalose and alginate gel.

Thus, the conducted investigations allowed to establish the dependence of intracellular trehalose content and the viability indices of free and immobilized in alginate gel *S.cerevisiae* cells after rapid freezing and thawing. The experimental data indicate a prospective method predicting an initial cryoresistance of yeast cells, by means of increasing the resistance to unfavorable factors of freezing at the culturing stage.

References

1. de Antoni G.L., Perez P., Abraham A. et al. Trehalose, a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus* // Cryobiology. – 1989. – Vol.26. – P. 149–153.
2. Diniz-Mendes L., Bernandes E., de Araujo P.S. et al. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. *Biotechnol Bioeng* 1999; 65(5): 572–578.
3. Glantz S.A. *Primer of biostatistics*. New York: McGraw Hill; 2004.
4. Lusta K.A., Fikhte B.A., editors. *Methods for determination of microorganism viability*. Puschino; 1990.
5. Nakamura T., Takagi H., Shima J. Effects of ice-seeding temperature and intracellular trehalose contents on survival of frozen *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Cryobiology* 2009; 58: 170–174.
6. Netrusov A.I., editor. *Course in microbiology*. Moscow: Akademiya; 2005.
7. Panek AD. Trehalose metabolism – new horizons in technological applications. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28(2): 169–181.
8. Ponomareva V.L., Vysekantsev I.P., Gurina T.M. et al. Study of cryopreservation effect on viability of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells immobilized in alginate gel. *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny* 2012; 1(92): 14-17.
9. Ponomareva V.L., Vysekantsev I.P., Onasenko E.S. et al. Functional activity of cryopreserved *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells immobilized in alginate gel. *Proceedings of the International Scientific-Practical Conference 'Theoretical and Practical Aspects of Modern Cryobiology'*; Syktyvkar; 2014; p. 214–219.
10. Sarishvili N.G., editor. *Microbiological basics of champagne technology*. Moscow: Pischevaya Promyshlennost; 2000.
11. Sinitsin A.P., Raynina E.I., Lozinsky V.I., Spasov S.D., editors. *Immobilized cells of microorganisms*. Moscow: Moscow State University; 1994.

