

ВПЛИВ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ НА ЖИТТЕЗДАТНІСТЬ ДРІЖДЖІВ *Pichia anomala*

С. М. Шульга
О. О. Тігунова
А. Ф. Ткаченко
Н. Є. Бейко
А. І. Хоменко

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки»
НАН України, Київ

E-mail: Shulga5@i.ua

Збереження мікроорганізмів у колекціях чистих культур є актуальною проблемою. Існує багато методів збереження бактерій, але жоден з них не дає 100% -го захисту від мутацій, змін властивостей мікроорганізмів або їх загибелі. На життєздатність мікроорганізмів у процесі ліофілізації впливає низка факторів: умови культивування (рН і температура), вік культури, концентрація клітин, склад захисного середовища і метаболічна активність. Оптимізація цих процесів дозволяє зберегти до 80–90% життєздатних клітин. Для культури *Pichia anomala* визначено умови культивування, фази росту, в якій дріжджі виявляють найбільшу стійкість до несприятливих умов ліофілізації. Оптимізовано склад захисного середовища, що дало змогу досягти максимального (до 95%) збереження життєздатних клітин після ліофілізації. Високий рівень життєздатних клітин після заморожування відзначено у дріжджовій суспензії з 36 до 48 год росту. Визначено оптимальну температуру і термін зберігання ліофілізованих дріжджів з максимальною кількістю життєздатних клітин.

Ключові слова: дріжджі *Pichia anomala*, ліофілізація, захисне середовище, життєздатність клітин.

Традиційні методи підтримання культур мікроорганізмів зводяться до їх вирощування на багатих живильних середовищах із частими пересівами. При цьому спостерігаються мутаційні зміни і автоселекція, які часто призводять до втрати важливих фізіолого-біохімічних властивостей. Тривале зберігання культур мікроорганізмів без втрати властивостей продуцентів можливе, якщо різко припинити перебіг усіх процесів у клітині, тобто перевести її в стан, близький до анабіозу [1–3].

Відомо багато способів зберігання культур мікроорганізмів: періодичні пересіви, зберігання в 25% -му розчині гліцеролу при температурі –20 °С, у дистильованій воді, під вазеліновим маслом на агаризованому середовищі та в ліофілізованому стані. Жоден з відомих способів не є універсальним [4–6].

Під час ліофілізації у більшості мікроорганізмів відбувається часткова загибель клітин, а в деяких випадках — зміна їхніх властивостей [7–8]. Окрім того, характеристики ліофілізованих культур (кількість життєздатних клітин, залишкова вологість, структура сухого матеріалу та ін.) залежать від правильного проведення кожної операції і визначаються, у свою чергу, фізіологічними

та технологічними властивостями мікроорганізму, який підлягає ліофілізації. У зв'язку з цим існує необхідність визначення впливу різних чинників на життєздатність дріжджів *Pichia anomala* за їх ліофілізації.

Мета даної роботи — вивчення впливу умов культивування, віку культури та перенесення мікробних клітин в захисні середовища різного складу на життєздатність дріжджів *Pichia anomala* за ліофільного висушування.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були дріжджі *Pichia anomala* штаму L-1 з «Колекції штамів мікроорганізмів і ліній рослин харчової та сільськогосподарської біотехнологій» Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України.

Культури зберігали на солодовому агарі (8% сухих речовин, у тому числі 2% агару).

Дріжджі культивували глибинним періодичним способом на качалках (240 об/хв) при температурі 30 °С в колбах ємністю 0,75 дм³ з 0,05 дм³ живильного середовища такого складу (г/дм³): Н₂СОНН₂ — 1,0; КН₂РО₄ — 1,0; MgSO₄ · 7Н₂О; FeCl₃ —

0,05; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05; меляса — 60,0; рН 5,8. Культури висівали зі скошеного солодового агару, переносючи дріжджові клітини в колбу ємністю 0,25 дм³ із 0,1 дм³ стерильного живильного середовища, та культивували на шейкері-інкубаторі BIOSAN ES-20 (Латвія) зі швидкістю перемішування 200 об/хв та за температури 30 °С протягом 24 год. Посівний матеріал, виготовлений таким методом, вміщували в колби ємністю 0,5 дм³ з 0,2 дм³ середовища. Як джерело вуглеводів використовували мелясу в кількості 60 г/дм³.

Дріжджі вирощували в біореакторі для культивування мікроорганізмів — АКЛ — 10М (Росія). Інокулят вирощували тим самим методом, що й посівний матеріал, і вносили у кількості 10%.

Склад окремих компонентів середовища змінювався залежно від поставленого завдання.

Кислотність середовищ визначали на рН-метрі — рН-150М (Білорусь).

Для одержання желатози 10%-й розчин желатини готували на бідистильованій воді та автоклавували протягом 1 год. Одержаний розчин желатози фільтрували і згодом використовували для приготування захисних середовищ.

Для отримання суспензії дріжджів культуральну рідину осаджували центрифугуванням і ресуспендували в захисних середовищах до концентрації $6,5 \cdot 10^6$ клітин/дм³. Для дослідження ефективності захисного середовища було використано метод, за яким пряме виявлення зв'язаної води можна замінити визначенням порівняльної гідрофільності, зокрема залишкової вологості в біологічних препаратах за їх одночасної ліофілізації [9, 10].

Для з'ясування впливу захисного середовища на життєздатність клітин після ліофілізації досліджували захисні середовища такого складу (%): глюкоза або цукроза — 1,0; 10,0; 30,0; желатоза — 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; агар — 0,2.

Дріжджі вносили в захисне середовище з розрахунку концентрації клітин $6,5 \cdot 10^6$ клітин/дм³, потім дріжджову суспензію в кількості 5 см³ вміщували в пеніцилінові флакони.

Одержані зразки заморожували в низькотемпературному холодильнику LAB 11/EL19LT фірми Elcold (Данія) за температури -80 °С. Заморожені зразки переносили в спеціальних касетах в попередньо охолоджену камеру (температура конденсатора -50 °С) ліофільної сушарки CRUODOS-50 фірми TELSTAR (Іспанія). Тривалість висушування становила 24 год.

Під час підготовки ліофілізованого матеріалу для досліджень слід було виконати дві умови: максимально точно відновити попередній (до висушування) об'єм матеріалу та вивести живі клітини зі стану анабіозу. Для виконання цих умов ліофілізований матеріал доводили дистильованою водою до об'єму $5 \cdot 10^{-3}$ дм³ і витримували за кімнатної температури в дистильованій воді протягом 30 хв.

Кількість клітин (живих і мертвих) виваховували за методикою, викладеною в роботі [11].

Підрахунок загальної кількості клітин дріжджів у культуральній рідині проводили за допомогою камери Горяєва з паралельним розсівом у чашки Петрі з сусло-агаром. Життєздатність дріжджів *Pichia anomala* штаму L-1 визначали за кількістю підрахованих колоній на чашках Петрі після двох діб культивування [12].

Після регідратації дріжджі піддавали глибинному культивуванню упродовж двох діб.

У процесі ліофілізації мікроорганізми іноді залишаються життєздатними, але з порушеними обмінними функціями клітин, що призводить до зниження фізіологічної активності.

Дріжджі *Pichia anomala* — продуцент ліпідів, тому їхню фізіологічну активність встановлювали за кількістю накопиченої біомаси і синтезом ліпідів.

Біомасу визначали таким способом: осад після центрифугування культуральної рідини протягом 30 хв при 5 000 g висушували в бюксах за температури 105 °С до незмінної маси (у трьох повторях) з подальшим зважуванням висушеної наважки дріжджів на вагах RADWAG WPS 4000/C/1 (Польща).

Для обчислення кількості ліпідів висушену біомасу (наважка 10 г) вкладали в пакетик з фільтрувального паперу та зважували. Потім пакетик вносили до екстрактора і герметично з'єднували всі частини апарата. Колбу апарата ставили у киплячу водяну баню. Через верх холодильника проводили послідовне екстрагування діетиловим ефіром і сумішшю хлороформ + етанол в апараті Сокслета протягом 5–6 год. Дріжджову масу, яка залишилась після першої екстракції, піддавали обробленню 10%-ю HCl на киплячій водяній бані впродовж 3 год, після чого тими самими розчинниками екстрагували частину ліпідів, яка залишилась.

Після екстракції пакетик з матеріалом висушували спочатку при 20–30 °С (за кімнатної температури), а потім при 100–105 °С. Зважували і за різницею між

масою до та після екстрагування визначали кількість жиру.

Кількість цукрів вираховували за стандартом СОУ.15.9-37-240 2005 р.

Ефективність синтезу ліпідів оцінювали за показником жирового коефіцієнта (дорівнює кількості мг ліпідів/мг цукрів $\times 100$).

Усі досліди проводили в трьох повторах, статистичне оброблення результатів виконували згідно з [13]. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Збереження життєздатності та інших біологічних властивостей мікроорганізмів залежить від багатьох чинників: віку культури (деякі види мікроорганізмів найбільш стійкі до заморожування [14] наприкінці логарифмічної стадії та на початку стаціонарної фази росту), концентрації клітин, складу захисного середовища, активності метаболічних процесів тощо.

Нами досліджено вплив віку дріжджової культури на життєздатність клітин під час заморожування й визначено тривалість фаз росту дріжджових клітин за їх культивування в рідкому середовищі. Початок логарифмічної фази зафіксовано на 7–8-й год, а початок стаціонарної — на 28-й год культивування. У середині кожної фази розвитку культури відбирали біомасу і відповідно до наведеної вище методики піддавали заморожуванню. Результати визначення життєздатності заморожених дріжджів наведено на рис. 1.

Високий рівень збереження життєздатних клітин після заморожування відзначено в дріжджовій суспензії лише з 36-ї до 48-ї год росту. Після 48 год життєздатність

клітин починала знижуватись. Цей факт можна пояснити тим, що на кріостійкість суспензії впливає різний фізіологічний стан клітин, співвідношення чутливих і стійких особин в популяції культури. Окрім того, стійкість залежить від хімічного складу клітин, передусім плазматичної мембрани.

Результати проведених досліджень дозволили встановити оптимальний вік культури (42 год росту) для збереження життєздатності клітин після заморожування.

На життєздатність мікроорганізмів на етапах заморожування і висушування впливають також умови їх культивування. Суттєвий вплив на кріорезистентність та життєздатність клітин за глибинного культивування мікроорганізмів під час висушування справляють рН і температура середовища.

Результати проведених експериментів дали змогу вивчити, як впливає рН середовища на життєздатність дріжджових клітин (табл. 1).

Оптимальним для синтезу біомаси є рН 5,5, кількість життєздатних клітин — 75,7% за максимального накопичення біомаси — 4,0 гАСБ/дм³. Якщо рН середовища становить 6,0, синтез біомаси знижується до 3,9 гАСБ/дм³, однак процес накопичення ліпідів триває і вміст їх досягає 2,0 г/гАСБ.

Також можна зробити висновок, що зміна рН середовища від 5 до 6 не має значного впливу на кількість ліпідів.

Таким чином, ліпіди як важливі компоненти цитоплазматичних мембран, так само як трегалоза і глікоген, виконують роль резервного матеріалу [15] і виявляють захисну дію стосовно біологічних мембран під час ліофілізації.

Досліджено вплив температури культивування дріжджів на біомасу та накопичення ліпідів (рис. 2).



Рис. 1. Синтез біомаси та життєздатність дріжджів залежно від фаз росту

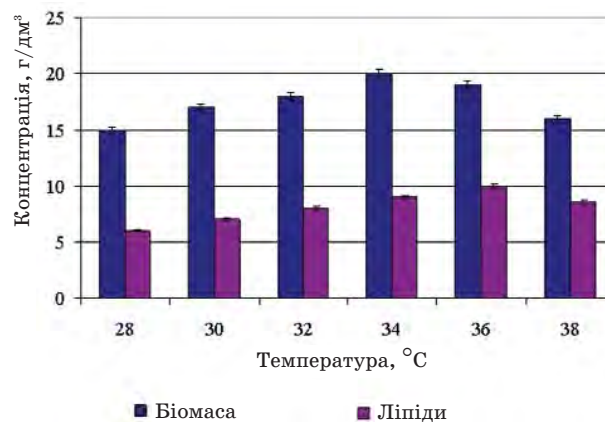


Рис. 2. Вплив температури на накопичення ліпідів *Pichia anomala* штаму L-1

Таблиця 1. Вплив рН середовища на виживаність дріжджових клітин

рН	Біомаса, гАСБ*/дм ³	Вміст ліпідів, г/гАСБ	Кількість живих клітин		
			До ліофілізації, КУО · 10 ⁹	Після ліофілізації, КУО · 10 ⁹	Вживаність, %
4,0	2,40±0,10	1,30±0,01	6,00±0,12	2,20±0,04	33,9
4,5	3,00±0,05	1,60±0,02	6,50±0,11	1,80±0,01	27,7
5,0	3,40±0,08	1,80±0,01	6,90±0,14	3,00±0,06	43,5
5,5	4,00±0,07	1,80±0,03	7,50±0,13	5,00±0,11	72,5
6,0	3,90±0,10	2,00±0,01	7,40±0,15	5,60±0,09	75,7
6,5	3,60±0,06	1,90±0,02	7,00±0,10	3,00±0,05	59,4
7,0	3,00±0,08	1,70±0,01	6,50±0,09	2,60±0,03	40,0

Примітка. АСБ — абсолютно суха біомаса.

Підвищення температури від 28 °С до 34 °С зумовлювало збільшення накопичення біомаси. З підвищенням температури до 38 °С синтез біомаси зменшувався, однак синтез ліпідів продовжувався і максимальна кількість ліпідів спостерігалася за температури 36 °С.

Кількість життєздатних клітин після ліофілізації значною мірою залежить від складу захисних середовищ.

Вживаність дріжджових клітин під час ліофілізації можна збільшити, підбираючи захисні середовища до оптимального їх складу і співвідношення компонентів у середовищі, що запобігають або зменшують інтенсивність деструктивних процесів.

Існують загальні вимоги до захисних середовищ. Вони мають бути гідрофільними (речовини, які не зв'язують воду, не є захисними для мікроорганізмів за їх ліофілізації) і не містити солей (для цього їх готують на дистильованій або бідистильованій воді). Крім того, слід запобігати потраплянню солей із середовища культивування разом з мікробною масою. Для цього перед змиванням мікробної маси захисним середовищем потрібно видалити конденсаційну воду з пробірок, в яких вирощували культуру.

Дослідження різних захисних середовищ допомогло підібрати середовища, до складу яких входили вуглеводи (глюкоза і сахароза як гідрофільні речовини), желатина й агар (як колоїди), що максимально захищали клітини мікроорганізму від шкідливого впливу ліофілізації і не мали антигенних властивостей. Ці середовища можна вважати гідрофільними, але вміст зазначених речовин не повинен бути надмірним. Занадто великий вміст гідрофільних речовин уповільнює процес висушування, створює підвищену залишкову вологість і зменшує розчинність сухого препарату. Тобто вміст цих речовин має лише забезпечувати оптимальну залишкову вологість [16].

Було досліджено гідрофільність дріжджових суспензій залежно від концентрації в них глюкози і цукрози (табл. 2).

З даних таблиці видно, як змінювалася залишкова вологість кінцевого матеріалу залежно від вмісту вуглеводів і їхньої концентрації за одних і тих самих умов ліофілізації. З використанням глюкози та цукрози в кількості 10% одержали показники залишкової вологості 2,85 і 1,94%, відповідно. Для подальшої роботи з підбору захисного середовища для ліофілізації дріжджів як гідрофільний компонент було обрано цукрозу в концентрації 10%.

Окрім наявності речовин, від яких залежить гідрофільність матеріалу, в середовищі мають бути ще й речовини, які максимально захищають клітини мікроорганізму від шкідливого впливу заморожування і висушування.

У роботі [17] показано, що желатоза здатна захищати мікроорганізми від згубної дії процесів заморожування та ліофілізації. Найбільш цінними властивостями желатози в захисних середовищах було те, що вона забезпечувала ліофільну структуру сухого матеріалу і, на відміну від желатини, була не дуже в'язкою, не утворювала гелів навіть за високої концентрації і не мала антигенних властивостей.

Нами досліджено вплив різних концентрацій желатози на кількість життєздатних дріжджових клітин після ліофілізації. Результати подано в табл. 3.

Таблиця 2. Порівняльна гідрофільність суспензії *Pichia anomala* залежно від концентрації глюкози та цукрози

Захисне середовище з глюкозою, %	Залишкова вологість, %	Захисне середовище з цукрозою, %	Залишкова вологість, %
1	19,67	1	18,11
10	2,85	10	1,94
30	40,43	30	50,33

Таблиця 3. Вплив концентрації желатози на кількість дріжджових клітин в сухому матеріалі

Концентрація желатози, %	Кількість мікроорганізмів КУО · 10 ⁹		Життєздатність, %	Залишкова вологість, %
	До ліофілізації	Після ліофілізації		
5	4,90±0,06	2,35±0,01	47,9	4,0
6	5,10±0,09	3,21±0,02	63,0	2,9
7	5,00±0,10	3,36±0,05	67,2	3,0
8	5,60±0,10	4,60±0,09	82,1	3,1
9	5,50±0,11	4,20±0,06	81,8	2,8
10	5,40±0,08	5,20±0,12	96,3	1,9
11	5,00±0,04	4,20±0,08	96,0	2,0

Дані таблиці свідчать, що концентрацію желатози в захисному середовищі потрібно було довести до 10%, щоб забезпечити максимальну фіксацію клітин дріжджів у сухому матеріалі і запобігти надмірному висушуванню клітин (залишкова волога — на рівні 1,9%).

За результатами досліджень оптимізовано склад захисного середовища, яке містило такі компоненти (%): глюкоза — 10,0; желатоза — 10,0; агар — 0,02.

Для визначення часу зберігання без значної втрати життєздатності та фізіологічної активності дріжджових клітин після ліофілізації слід вивести їх з анабіотичного стану. Якщо не забезпечити оптимальних умов виведення клітин з анабіозу, то одержані дані щодо життєздатності мікроорганізму будуть занижені.

Особливе значення під час зберігання ліофілізованих мікроорганізмів мають температурні умови. Чим вища температура зберігання культур, тим швидше знижувалась кількість життєздатних клітин мікроорганізмів. Між температурою зберігання ліофілізованих мікроорганізмів і швидкістю відмирання спостерігалась певна залежність (рис. 3).

У разі зберігання зразків ліофілізованих дріжджів упродовж місяця за температури 6 °С кількість життєздатних клітин не зменшувалась порівняно з вихідною культурою, а з підвищенням температури — поступово знижувалась і за температури 34 °С втрачалося приблизно 13%. Відповідно і кількість синтезованих ліпідів зменшувалась з підвищенням температури.

Спостереження за сухим матеріалом дріжджів, одержаним з урахуванням усіх чинників, які позитивно впливали на процес ліофілізації культури, показали, що під час зберігання за температури 6 °С протягом року (рис. 4) життєздатність дріжджів наприкінці року досягала 94–95%. За кімнатної

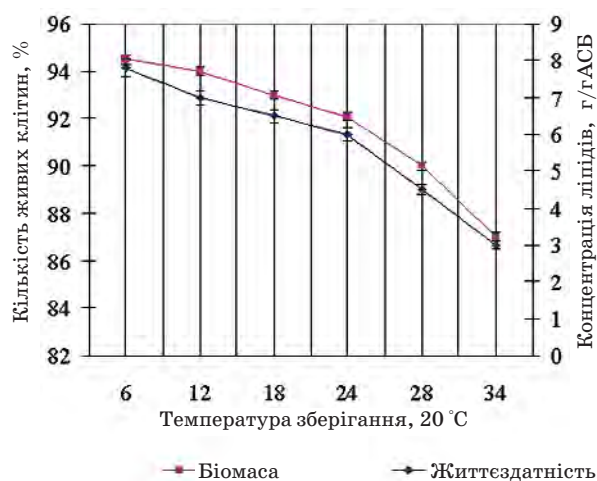


Рис. 3. Вплив температури зберігання на життєздатність і синтез ліпідів ліофілізованих дріжджів

температури (20 °С) кількість життєздатних клітин поступово зменшувалась і через рік зберігання становила 90%.

Дослідженнями процесу ліпидоутворення ліофілізованих дріжджів під час зберігання протягом року встановлено, що синтез ліпідів наприкінці терміну зберігання зменшився на 5% за температури зберігання 6 °С і на 10% за кімнатної температури (рис. 4). Відповідно змінювалась і величина жирового коефіцієнта. Це є важливим чинником для зберігання продуцента в ліофільному стані впродовж року.

З'ясовано, що для зберігання ліофілізованих дріжджів *Pichia anomala* протягом року з концентрацією 93–95% життєздатних клітин, стабільною фізіологічною активністю і синтезом ліпідів потрібно:

- перед заморожуванням культивувати дріжджі протягом 48 год за температури 36 °С і рН 6,0;
- переносити дріжджі в захисне середовище такого складу (%): цукроза — 10,0; желатоза — 10,0; агар — 0,2.

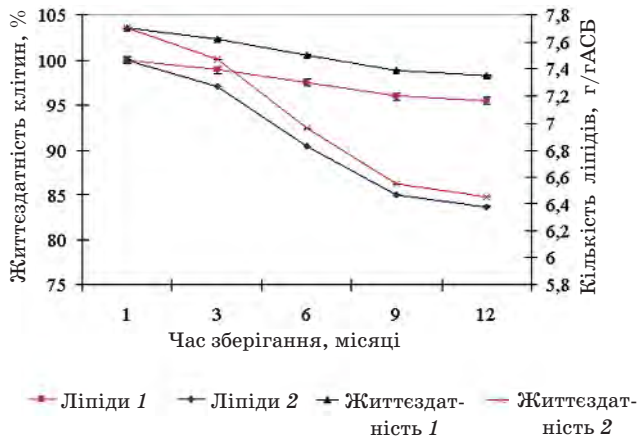


Рис 4. Порівняльна характеристика ліофілізованих дріжджів при різних температурах зберігання упродовж року:

1 — за температури 6 °C;
2 — 20 °C

ЛІТЕРАТУРА

1. Мацкевич Н. В. Спонтанная изменчивость и кариология несовершенных грибов. — М.: Наука, 1981. — 184 с.
2. Филиппова С. М., Кузнецов В. Ю., Бадяутдинов Д. Н. и др. Изучение внутрипопуляционных спонтанных морфологических вариантов *Streptomyces oligocarpophilus* ISP5589 // Микробиология. — 1999. — Т. 68, № 3. — С. 375–382.
3. Ганбаров Х. Г., Абдулгамидова С. М. Изучение внутрипопуляционных морфо-культуральных изменений дрожжевых грибов, хранившихся в коллекции культур // Вестн. Бакин. гос. ун-та, сер. биол. наук. — 2007. — № 1. — С. 42–46.
4. Куплетская М. Б., Аркадьева З. А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ // Микробиология. — 1997. — Т. 66, № 2. — С. 283–288.
5. Стоянова Л. Г., Аркадьева З. А. Сравнения способов хранения молочнокислых бактерий // Там же. — 2000. — Т. 69, № 1. — С. 98–104.
6. Fernandez-Segovia I., Escriche A., Fuentes A., Serra I. A. Microbial and sensory changes during refrigerated storage of desalted cod (*Gadus morhua*) preserved by combined methods // Int. J. Food Microbiol. — 2007. — V. 116, Is. 1. — P. 64–72.
7. Михайлова Р. В., Семашко Т. В., Лобанок А. Т., Осока О. М. Спонтанная изменчивость *Penicillium feniculosum* — продуцента глюкозооксидазы // Микол. фитопатол. — 2001. — Т. 35, Вып. 3. — С. 73–79.
8. Абдулгамидова С. М., Ганбаров Х. Г. Выживаемость дрожжевых культур при хранении в коллекции на сусло-агаре // Сб. научн. тр. Ин-та микробиол. НАН Азербайджана. — Баку, 2007. — Т. 4. — С. 34–39.
9. Абдулгамидова С. М. Сравнительная эффективность различных методов длительного хранения дрожжей // Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Сер.: біол. — 2008. — Вип. 8, № 828. — С. 132–136.
10. Бланков Б. И., Клебанов Д. Л. Применение лиофилизации в микробиологии. — М.: Изд-во мед. лит-ры, 1961. — 263 с.
11. Бабьева И. В., Голубева В. И. Методы выделения и идентификации дрожжей. — М., 1979. — С. 120.
12. Луста К. А., Фихте Б. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Ред. В. К. Ерошин. — Пуццино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. — С. 186.
13. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 300 с.
14. Осадчая А. И., Кудрявцев В. А., Софронова Л. А. Влияние некоторых факторов на криорезистентность и сохранение жизнеспособности при лиофилизации культур *Vacillus subtilis* // Биотехнология. — 2002. — Т. 3. — С. 45–54.
15. Квасников Е. И., Щелокова И. Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования / Отв. ред. Смирнов В. В.; АН УССР. Ин-т микробиол. вирусол. им. Д. К. Заболотного. — К.: Наук. думка. — 1991. — 328 с.
16. Данилова М. В., Надирова И. М., Кудрявцев В. И. Лиофилизация бактерий / Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. — М.: Наука. — 1967. — С. 131.
17. Похилено В. Д., Баранов А. М., Детушев К. В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Изв. высш. уч. зав. Поволж. рег. — 2009. — № 4. — С. 99–121.

**ВЛИЯНИЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ
*Pichia anomala***

*С. М. Шульга
Е. А. Тигунова
А. Ф. Ткаченко
Н. Е. Бейко
А. И. Хоменко*

ГУ «Институт пищевой биотехнологии
и геномики» НАН Украины, Киев

E-mail: Shulga5@i.ua

Сохранение микроорганизмов в коллекциях чистых культур является актуальной проблемой. Существует много методов сохранения бактерий, но ни один из них не дает 100% -й защиты от мутаций, изменений свойств микроорганизмов или их гибели. На жизнеспособность микроорганизмов при лиофилизации влияет ряд факторов: условия культивирования (рН и температура), возраст культуры, концентрация клеток, состав защитной среды и метаболическая активность. Оптимизация этих процессов позволяет сохранить до 80–90% жизнеспособных клеток. Для исследуемой культуры *Pichia anomala* определены условия культивирования, фаза роста культуры, при которой дрожжи проявляют наибольшую устойчивость к неблагоприятным условиям процесса лиофилизации. Оптимизирован состав защитной среды, что позволило получить после процесса лиофилизации максимальное (до 95,5%) сохранение жизнеспособных клеток. Высокий уровень жизнеспособных клеток после замораживания отмечен в дрожжевой суспензии с 36 до 48 ч роста. Определены оптимальная температура и срок сохранения лиофилизированных дрожжей с максимальным количеством жизнеспособных клеток.

Ключевые слова: дрожжи *Pichia anomala*, лиофилизация, защитная среда, жизнеспособность клеток.

**LYOPHILIZATION EFFECT
ON *Pichia anomala*
YEASTS VIABILITY**

*S. M. Shulga
O. O. Tigunova
A. F. Tkachenko
N. E. Beyko
A. I. Khomenko*

State organization «Institute of Food
Biotechnology and Genomics» of the National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: Shulga5@i.ua

Saving microorganisms in clean culture collections is an actual problem. There is a lot of methods to save bacteria, but none of them give 100% protection from mutation, changing microorganism properties or their death. A lot of factors influence on microorganism survival: cultivation factors (pH and temperature), culture age, cell concentration, protection medium consistency and metabolic activity. Optimization of this process enables to have about 80–90% survival cells. Cultivation factors, culture grown phase for the investigated *Pichia anomala* culture, were determined, in which yeasts showed the most stability for unfavorable conditions of lyophilization process. Composition of the protective environment were optimized that enabled us to obtain maximum (up to 95.5%) saving of the viable cells after the lyophilization process. High level of the viable cells was observed after freezing in the yeast suspension from 36 to 48 hours of growth. The optimum temperature and time saving of lyophilized yeast with the highest number of the viable cells were determined.

Key words: *Pichia anomala* yeasts, liophilization, protective environment, cell viability.