

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012142153/10, 04.10.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
04.10.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.10.2012

(45) Опубликовано: 27.02.2014 Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: CHOUDHARY K. K. Post-storage viability and metabolic stability of immobilized cyanobacteria, Nova Hedwigia, 2010, v.90 (1-2), p.215-226. ЛОЗИНСКИЙ В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения, Успехи химии, 2002, т.71, с.559-585. RU 2236466 C2, 20.09.2004.

Адрес для переписки:

119334, Москва, ул. Косыгина, 4, ИБХФ  
РАН, Отдел интеллектуальной  
собственности и инноваций

(72) Автор(ы):

Ефременко Елена Николаевна (RU),  
Сенько Ольга Витальевна (RU),  
Махлис Татьяна Абрамовна (RU),  
Мамедова Фахрия Тахир кызы (AZ),  
Холстов Александр Викторович (RU),  
Варфоломеев Сергей Дмитриевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биохимической  
физики им. Н.М. Эмануэля Российской  
академии наук (ИБХФ РАН) (RU)

## (54) СПОСОБ КРИОКОНСЕРВАЦИИ КЛЕТОК ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способам криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов. Способ предусматривает суспензирование биомассы клеток до концентрации 15-30 мас.% в растворе поливинилового спирта с концентрацией 6-9 мас.%, приготовленном на питательной среде, специфичной для выращивания конкретного фототрофного микроорганизма, замораживание и хранение аликвот

полученной суспензии объемом 0,1-0,5 см<sup>3</sup> при -80÷-70°C. Способ позволяет упростить процесс криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, увеличить выживаемость клеток до 90-95%, обеспечить этот уровень выживаемости при хранении клеток в течение срока до полутора лет и использовать размороженные образцы клеток в качестве концентрированного посевного материала. 13 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*C12N 1/04* (2006.01)*C12N 11/04* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012142153/10, 04.10.2012**(24) Effective date for property rights:  
**04.10.2012**

Priority:

(22) Date of filing: **04.10.2012**(45) Date of publication: **27.02.2014 Bull. 6**

Mail address:

**119334, Moskva, ul. Kosygina, 4, IBKhF RAN,  
Otdel intellektual'noj sobstvennosti i innovatsij**

(72) Inventor(s):

**Efremenko Elena Nikolaevna (RU),  
Sen'ko Ol'ga Vital'evna (RU),  
Makhlis Tat'jana Abramovna (RU),  
Mamedova Fakhrija Takhir kyzy (AZ),  
Kholstov Aleksandr Viktorovich (RU),  
Varfolomeev Sergej Dmitrievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Institut biokhimicheskoy  
fiziki im. N.M. Ehmanuehlja Rossijskoj akademii  
nauk (IBKhF RAN) (RU)****(54) CRYOPRESERVATION METHOD OF CELLS OF PHOTOTROPHIC MICROORGANISMS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: method provides for suspension of a biomass of cells till concentration is 15-30 wt % in the solution of polyvinyl alcohol with concentration of 6-9 wt %, which is prepared on a feed medium specific for growth of a certain phototrophic microorganism, freezing and storage of aliquots of the obtained suspension with the volume

of 0.1-0.5 cm<sup>3</sup> at -80÷-70°C.

EFFECT: method allows simplifying a cryopreservation process of cells of phototrophic microorganisms, increasing survival capacity of cells, providing this level of survival capacity at storage of cells during the period of up to a year and a half and using unfrozen specimens of cells as a concentrated seed grain.

13 ex

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способам хранения клеток фототрофных микроорганизмов (микроводорослей и цианобактерий) в замороженном состоянии, обеспечивающем в наибольшей степени длительное сохранение ими жизнеспособности и пролиферативной способности. Изобретение может быть  
5 использовано для хранения клеток фототрофных микроорганизмов в коллекциях, на производстве и в научно-исследовательской практике.

Фототрофные микроорганизмы (микроводоросли и цианобактерии) представляют собой прокариотические и эукариотические, одноклеточные или многоклеточные  
10 организмы, обитающие как в пресной, так и морской воде. Химический состав биомассы фототрофных микроорганизмов позволяет получать из нее, как возобновляемого источника энергии, широкий спектр ценных коммерчески значимых продуктов в биодоступной органической форме (антиоксиданты, аминокислоты, макро- и микроэлементы) и целый ряд различных видов биотоплива, таких как  
15 пиролизная нефть (бионефть), биоводород, биодизель, биогаз, биоэтанол и др. В связи с огромным интересом к научно-производственному потенциалу биомассы фототрофных микроорганизмов возникает необходимость их хранения.

Известно, что при хранении фототрофных микроорганизмов помимо потери  
20 клетками жизнеспособности также имеют место процессы популяционной изменчивости. При этом доминантный фенотип замещается другими с измененными исходными свойствами и продуктивностью, происходит потеря клетками хранящейся культуры приоритетных свойств [А.А.Цуцаева, А.Е.Ананьина, Л.М.Балыбердина, Л.В.Степанюк, Н.В.Павленко (2008) Опыт долгосрочного хранения промышленных  
25 штаммов микроорганизмов. // Микробиология, Т.77, №5, С.696-700].

В этой связи очевидна потребность в использовании эффективных способов хранения в условиях специализированных коллекций, производственных и научно-исследовательских лабораторий клеток микроводорослей и цианобактерий, которые  
30 могут представлять коммерческий интерес, в частности, в качестве источника получения биомассы, являющейся возобновляемым сырьем для нефтехимической, химической и пищевой промышленности. При этом одним из основных условий применения того или иного способа хранения клеток фототрофных микроорганизмов является адекватный выбор условий их хранения, обеспечивающих длительное  
35 сохранение клетками своих популяционных характеристик и максимально возможного уровня жизнеспособности.

Известно несколько различных способов, позволяющих сохранять клетки фототрофных микроорганизмов в жизнеспособном и репродуктивном состоянии:  
40 поддержание клеток на жидких и агаризованных средах, хранение в иммобилизованном виде, лиофилизация и криоконсервация с использованием защитных сред и криопротекторов [Сидякина Т.М. (1991) Консервация микроорганизмов в коллекциях культур // Консервация генетических ресурсов. Методы. Проблемы. Перспективы: сб. науч. тр. / АН СССР, Пушинский научн. центр.  
45 Институт биологической физики, Пущино, С.81-159; Chen Y.-C. (2003) Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for longterm storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures. // J. Appl. Phycol., V.15, P.439-444; Marsalek B., Rojickova-Padrtova R. (1988) Long-tem maintenance of alga strains for use in biomassays and biotechnology // Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud. - V.124, P.121-136; Poncet J.M, Benoit V.(2003) Cryopreservation of the unicellular marine alga, *Nannochloropsis oculata*. II  
50 Biotechnol. Lett., V.25, №23, P.2017-2022]. При этом самым эффективным способом долгосрочного хранения различных фототрофных микроорганизмов является

криоконсервация. Этот способ состоит в переводе биологических объектов в состояние холодового анабиоза с последующим возвратом их к метаболической активности в физиологически оптимальных условиях культивирования. Согласно большинству известных способов криоконсервации фототрофных микроорганизмов, она  
 5 осуществляется путем замораживания клеток в различных условиях с последующим их хранением в замороженном состоянии.

Известно, что при глубоком замораживании биологических объектов могут происходить серьезные, в том числе необратимые, повреждения клеток за счет  
 10 повреждений, вызываемых формированием кристаллов льда как внутри, так и снаружи клеток, сопровождающихся их обезвоживанием и нарушением барьерных свойств клеточных мембран. Повышение концентрации электролитов в процессе замораживания приводит к изменению концентрации водородных ионов и  
 15 нарушению pH. Вследствие обезвоживания содержание солей в клетке достигает гипертонической концентрации, оказывая критически негативное воздействие на структуру белков.

Варьирование режимов «замораживания-оттаивания» клеток (температура замораживания, температура оттаивания, скорости одного и другого процесса) может  
 20 повысить эффективность результатов криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов.

В отношении температуры замораживания все известные сегодня способы криоконсервации фототрофных клеток можно разделить на два основных типа:

- способы криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов,  
 25 предусматривающие хранение клеток при температуре жидкого азота,
- способы, предусматривающие хранение клеток при температуре выше температуры жидкого азота.

Замораживание клеток до температуры жидкого азота сопровождается быстрым  
 30 охлаждением образца, приводящим к резкому снижению его температуры. Такое быстрое охлаждение минимизирует эффект концентрирования электролитов вне клетки, так как льдообразование протекает равномерно, но приводит к образованию большего количества внутриклеточного льда. Медленное охлаждение (до температуры -30÷-80°C) наоборот приводит к большей потере воды из клетки и к  
 35 меньшему накоплению внутриклеточного льда, но при этом эффект концентрирования электролитов вне клетки значительно повышается. И тот, и другой режимы замораживания для эффективной криоконсервации клеток предполагают применение и внесение в суспензию клеток криопротекторов. Криопротекторы -  
 40 защитные агенты, как правило, влияют на эластичность цитоплазматической мембраны, связывают внутриклеточную воду и предотвращают чрезмерное обезвоживание клеток, снижают токсическое воздействие солей электролитов и препятствуют образованию крупных кристаллов льда в клетке или в непосредственной близости от клетки [Zdenek Hubálek (2003) Protectants used in the  
 45 cryopreservation of microorganisms. // Cryobiology, V.46, P.205-229].

Учитывая вышесказанное, наиболее часто применяемыми способами криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов являются те, в которых для максимального сохранения их жизнеспособности используют двухстадийный режим  
 50 замораживания суспензии клеток [Piaseck B.P.i, Dille K.R., Brand J.J. (2009) Cryopreservation of Chlamydomonas reinhardtii: A cause of low viability at high cell density // Cryobiology, V.58, P.103-109; Mortain-Bertrand A., Etchart F., Boucaud M.-Th. (1996) A method for the cryoconservation of Dunaliella salina (CHLOROPHYCEAE): effect of glycerol

and cold adaptation // J. Phycol., V.32, P.346-352; Poncet J.-M., Veron B. (2003) Cryopreservation of the unicellular marine alga, *Nannochloropsis oculata* // Biotechnol. Lett., V.25, P.2017-2022], при котором проводят первоначально медленное охлаждение клеток до  $-30\div-140^{\circ}\text{C}$  в присутствии какого-либо криопротектора, а затем проводят  
 5 значительно более глубокое и быстрое замораживание клеток, перенося их в условия температуры жидкого азота.

Так, известен способ криоконсервации фототрофных клеток *Chlamydomonas reinhardtii* с использованием режима двухстадийного замораживания, согласно

10 которому суспензию клеток, содержащую  $(2,2\div 3,3)\times 10^6$  кл/мл, первоначально замораживают до  $-55^{\circ}\text{C}$  в присутствии метанола (2-10%), помещая далее замороженный материал в пары жидкого азота с температурой  $-170^{\circ}\text{C}$ .

Жизнеспособность клеток при этом составляет 40-52,5% [Piaseck B.P.i, Dille K.R., Brand J.J. (2009) Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A cause of low viability at high cell  
 15 density // Cryobiology, V.58, P.103-109]. В другом варианте того же способа

двухстадийного замораживания используют в качестве криопротектора 10% раствор диметилсульфоксида (ДМСО). При этом первичное охлаждение ведут до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$ , далее при этой температуре клетки выдерживают 1,5 часа и далее

20 их погружают в жидкий азот [Abreu L., Borges L., Marangoni J., Abreu P.C. (2012) Cryopreservation of some useful microalgae species for biotechnological exploitation // J. Appl. Phycol., DOI 10.1007/s10811-012-9818-0]. Согласно этому варианту способа криоконсервации, клетки фототрофных микроорганизмов *Thalassiosira weissflogii* сохраняют высокую жизнеспособность (не определено точно какую) на  
 25 протяжении 10-30 суток хранения при  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Согласно еще одному варианту аналогичного способа криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов с двухстадийным замораживанием [Guermazi W., Sellami-Kammoun A., Elloumi J., Drira Z, Aleya L., Marangon R., Ayadi H., Maalej S. (2010)  
 30 Microalgal cryo-preservation using dimethylsulfoxide ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) coupled with two freezing protocols: Influence on the fattyacid profile // J. Thermal Biology, V.35, P.175-181], в качестве криопротектора используют 5% раствор ДМСО для замораживания клеток при скорости  $1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до температуры  $-140^{\circ}\text{C}$  с последующим их переносом в жидкий азот. Жизнеспособность клеток после их размораживания при таком способе  
 35 составляет: для клеток *Chlorella vulgaris* 95%, а для *Isochrysis galbana* и *Dunaliella salina* 70%. Увеличение концентрации ДМСО, используемого в качестве криоконсерванта, до 20% приводит к снижению выживаемости клеток *Chlorella vulgaris*, демонстрирующих лучший результат при 5% ДМСО, до 79% [Roshani O., Yap L.V.,  
 40 Jeevan R.R., Mohd Syahril M.Z (2011) A Preliminary Study Towards Cryopreservation of Unicellular Green Algae, *Chlorella vulgaris* // UMTAS - 2011. - Empowering Science, Technol. and Innovation Towards a Better Tomorrow. - LSP91]. Как и для описанного выше варианта способа криоконсервации клеток с их двухстадийным замораживанием, недостатком для данного варианта, несмотря на изменение температуры первичного  
 45 замораживания клеток и снижение концентрации ДМСО, применяемого в качестве криопротектора, основными недостатками этого способа являются:

- недостаточно высокая выживаемость клеток - в результате криообработки клеток (замораживания/оттаивания) практически более половины клеток погибает,
- 50 - необходимо применение сложной аппаратуры для программируемого замораживания суспензии клеток,
- применение цитотоксичных криопротекторов (метанола, ДМСО), требующего от персонала соблюдения особых мер предосторожности при работе с ними,

- необходимость быстрого освобождения клеток от этих криопротекторов сразу же после их размораживания (например, центрифугированием, промыванием и повторным центрифугированием).

Согласно другому способу криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, проводимому с использованием режима двухстадийного замораживания, первоначально проводят холодовую адаптацию клеток путем экспонирования клеток при 4°C в течение 3 суток, затем 1 ч выдерживают в 3,5 М растворе глицерина, применяемого в качестве криопротектора, далее замораживают их до -40°C с последующим переносом в жидкий азот [Mortain-Bertrand A., Etchart F., Boucaud M.-Th. (1996) A method for the cryoconservation of *Dunaliella salina* (CHLOROPHYCEAE): effect of glycerol and cold adaptation // J. Phycol., V.32, P.346-352]. Скорость роста клеток *Dunaliella salina* после применения такого способа криоконсервации составляет 78% от исходной, однако существенными недостатками этого способа является длительность процесса криоконсервации в целом и использование глицерина в качестве криопротектора, который может служить потенциальным легко биodeградируемым субстратом для контаминантов при культивировании размороженной культуры. Кроме того, к недостаткам этого способа следует отнести необходимость использования сложной аппаратуры для контролируемого замораживания, а также отсутствие информации о выживаемости клеток при их длительном хранении при таком способе криоконсервации.

Известен способ криоконсервации фототрофных клеток *Tetraselmis suecica* ССАР 66/4 с использованием режима двухстадийного замораживания, согласно которому биомассу подвергают замораживанию в присутствии 5% глицерина, используемого в качестве криопротектора, при скорости замораживания 5°C/мин до -30°C с 10-минутным периодом установления равновесия при этой температуре перед помещением замороженного материала в жидкий азот [Fenwick C, Day J.G. (1992) Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes // J. Appl. Phycol., V.4, P.105-109]. В этих условиях жизнеспособность размороженных клеток составляет 65% от исходного уровня. К недостаткам данного способа относится необходимость использования сложного оборудования, обеспечивающего программируемое снижение температуры, отсутствие информации о жизнеспособности замороженных таким способом клеток при длительном хранении. Глицерин, используемый в качестве криопротектора, является потенциально легко биodeградируемым субстратом, присутствие которого может приводить к контаминации образца при его размораживании, что также является существенным недостатком этого способа.

Известен способ криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов с использованием режима двухстадийного замораживания, в котором для повышения выживаемости клеток после их размораживания применяют сочетание разных криопротекторов [Koichi Nakanishi, Keiji Deuchi, Kazuyoshi Kuwano (2012) Cryopreservation of four valuable strains of microalgae, including viability and characteristics during 15 years of cryostorage// J. Appl. Phycol., DOI 10.1007/s10811-012-9790-8]. Согласно этому способу клетки фототрофных микроорганизмов в присутствии смеси разных криопротекторов (ДМСО и этиленгликоля или пролина), введенных в смесь в концентрации по 5% каждого, подвергают двухстадийному замораживанию, первоначально охлаждая до -40°C при скорости 1°C/мин, а затем перемещая их в жидкий азот. Жизнеспособность у клеток рода *Chlorella*, *Nannochloropsis* или *Tetraselmis* при их размораживании после такого способа криоконсервации составляет около 50%

от исходной. Этот остаточный уровень жизнеспособности у клеток не изменяется в течение 15 лет их хранения при температуре -196°C. Достоинством данного способа является постоянный остаточный уровень жизнеспособности клеток, достигаемый при их криохранении. Однако снижение жизнеспособности на 50% в сравнении с исходным уровнем является, несомненно, большим недостатком способа. Кроме того, способ основан на методике замораживания с использованием сложной криогенной техники, а также использовании цитотоксичного вещества (ДМСО), от которого требуется быстро избавляться после размораживания клеток, и биodeградируемого пролина, провоцирующего контаминацию клеточного материала.

Известен еще целый ряд модификаций способа криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов с использованием режима двухстадийного замораживания и ДМСО в качестве криопротектора, в которых клетки либо первоначально замораживают при скорости 1°C в мин до -40°C, а потом переносят в жидкий азот, добавляя ДМСО в концентрации 10-20% [Jin-Chywan Gwo., Ju-Yu Chiu, Chin-Cheng Chou, Hsien-Yu Cheng (2005) Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) // *Cryobiology*, V.50, P.338-343], либо клетки первоначально инкубируют 10 мин в присутствии 10% ДМСО, затем их замораживают до -80°C со скоростью 1°C/мин, после чего погружают в жидкий азот [Joo-Yeon Youn, Sung Bum Hur (2009) Cryopreserved Marine Microalgae Grown Using Different Freezing Methods // *Algae*, V.24 (4), P.257-265], либо клетки смешивают с раствором ДМСО до конечной его концентрации 10-15%, выдерживают 15 мин в темноте при комнатной температуре, затем замораживают со скоростью 3°C/мин до -40°C и после экспозиции при этой температуре в течение 10 мин погружают в жидкий азот [L.Rhodes, J.Smith, R.Tervit, R.Robert, J.Adamson, S.Adams, M.Decker (2006) Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae. // *Cryobiology*, V.52, P.152-156]. Однако несмотря на варьирование концентрации и порядка внесения ДМСО как криопротектора в суспензию клеток, времени выдерживания клеток в его присутствии в разных температурных режимах, все указанные способы характеризуются относительно невысоким уровнем жизнеспособности клеток (60-65%) после размораживания из-за токсичности применяемого ДМСО. Все эти способы дороги ввиду необходимости использования энергоемкого и дорогостоящего криогенного оборудования, обеспечивающего поддержание температур жидкого азота и большого расхода жидкого азота, ввиду того, что при хранении образцов в жидком азоте существует необходимость его периодического добавления в емкости для хранения клеток ввиду того, что он, улетучиваясь, постепенно расходуется, требуя таким образом дополнительных экономических затрат на его пополнение.

В этой связи более привлекательными являются способы криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, которые используют замораживание клеток и их хранение при температуре более высокой, чем температура жидкого азота.

Известен способ криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, согласно которому их замораживание проводят при температуре -20 или -60°C, или -80°C в присутствии криопротектора 20% метанола или 5-10% ДМСО и хранят при этих же значениях температуры [Tzovenisa I., Triantaphyllidis G., Naihong X., Chatzinikolaou E., Papadopoulou K., Houri G. Tafas T. (2004) Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain // *Aquaculture*, V.230, P.457-473; Hae-Kyung Park (2006) Long-term Preservation of

Bloom-forming Cyanobacteria by Cryopreservation. // *Algae*, V. 21 (1), P.125-131].

Несомненным преимуществом этого способа криоконсервации клеток является использование температур существенно выше температуры жидкого азота, позволяющих использовать более простое и дешевое оборудование, но огромным недостатком этого способа, как и ранее описанных, сдерживающим его применение, является использование токсичных криопротекторов, обеспечивающих частичное сохранение клетками их жизнеспособности непосредственно после размораживания и сохранение жизнеспособности после 2 лет хранения ниже уровня, характерного для клеток, замороженных без криопротектора.

Проведение иммобилизации клеток фототрофных микроорганизмов путем включения их в нетоксичную полимерную матрицу, состоящую из материала, способного проявлять свойства криопротектора, перед их криоконсервацией служат альтернативой тем способам, в которых используются цитотоксичные криопротекторы. В этой связи способы, предусматривающие такую иммобилизацию перед криоконсервацией, особенно привлекательны для их применения на практике.

Известен способ криоконсервации, в котором первоначально проводят иммобилизацию клеток фототрофных микроорганизмов в Са-альгинатный гель, затем осуществляют их пропитывание раствором 0,7 М сахарозы, используемой в качестве криопротектора, высушивают в потоке стерильного воздуха, замораживают высушенные образцы при  $-80^{\circ}\text{C}$  и переносят их в среду жидкого азота с последующим хранением при температуре жидкого азота [A.Tanniou, V.Turpin, Th.Lebeau (2012) Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia* (simonsen) // *Cryobiology*, V.65, P.45-50]. Такой способ криоконсервации клеток, комбинирующий иммобилизацию клеток перед их криоконсервацией с двухстадийным замораживанием, между которыми еще используют и высушивание иммобилизованных клеток в криопротекторе, обеспечивает 76,9% выживание клеток. Однако культивирование полученных таким образом образцов клеток фототрофных микроорганизмов сопровождается бактериальным заражением вследствие присутствия в них сахарозы. Кроме того, к недостаткам этого способа криоконсервации относится его многостадийность и, соответственно, длительность и затратность (по времени, энергии, труду) самого процесса.

Отказ от стадии высушивания иммобилизованных клеток и использования дополнительного (помимо самой матрицы носителя) криопротектора, а также отказ от двухстадийности процесса замораживания существенно упрощает процесс криоконсервации и делает его более технически и экономически привлекательным. Так известен способ криоконсервации, при котором клетки фототрофных микроорганизмов иммобилизуют методом включения в Са-альгинатный гель, далее замораживают и хранят при температуре  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  [K.K.Choudhary (2010) Post-storage viability and metabolic stability of immobilized cyanobacteria // *Nova Hedwigia*, V.90 (1-2), P.215-226]. Для этого выращивают клетки фототрофных микроорганизмов, в частности, цианобактерий *Rivularia aquatica* или *Gloeotrichia echinulata*, отделяют их от культуральной жидкости центрифугированием и суспендируют в стерильном 6% растворе альгината натрия, чтобы полученную суспензию по каплям внести в 100 мМ раствор  $\text{CaCl}_2$  с целью формирования в нем в течение 1 ч сферических гранул альгината кальция, имеющих диаметр 4 мм и содержащих включенные в него клетки. Далее гранулы отделяют от раствора хлорида кальция, промывают стерильной дистиллированной водой и сушат в потоке стерильного воздуха (скорость потока воздуха 0,45 м/с) в течение 30 мин, а затем помещают на хранение в герметично

закрытой емкости при температуре  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Способ характеризуется несомненной привлекательностью в плане использования существенно более высокой, в сравнении с жидким азотом, температуры, которая может быть обеспечена простым морозильным оборудованием, и кроме того, сам процесс замораживания осуществляется в одну стадию. Последнее обстоятельство важно с точки зрения потенциально возможного масштабирования процесса. Однако, при хранении в течение 1 года образцов, полученных таким способом, остаточный уровень жизнеспособности клеток составляет для разных культур 47-49%. Такой низкий уровень выживания клеток свидетельствует о том, что Са-альгинатный гель не выполняет в нужной мере функцию криопротектора, и это является одним из основных недостатков этого способа, существенно ограничивающим возможность его использования на практике. Кроме того, сам способ состоит из нескольких последовательно выполняемых стадий, каждая из которых требует соблюдения стерильных условий и, следовательно, использования соответствующего стерильного оборудования, а также сред и дополнительных временных затрат на их стерилизацию. В частности, только на подготовку самого раствора альгината натрия для смешивания с ним клеток затрачивается, согласно способу, первоначально 16 ч на стерилизацию под действием УФ полимера в виде порошка, а затем 15 мин на стерилизацию при  $121^\circ\text{C}$  уже приготовленного на его основе 6% раствора. Такие условия и многостадийность реализации способа делают его технологически и экономически малопривлекательным.

Данное техническое решение, как наиболее близкое к заявляемому, а именно по способу криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, реализуемому через иммобилизацию клеток путем их включения в гелевый носитель, сформированный на основе полимера, с их последующим замораживанием и хранением в замороженном состоянии при температуре, существенно более высокой, чем температура жидкого азота, принято за прототип.

Задачей предлагаемого изобретения является разработка способа криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, обеспечивающего высокий уровень сохранения жизнеспособности клеток как после размораживания клеток сразу после их замораживания, так и после длительного хранения в замороженном состоянии.

Поставленная задача решается предлагаемым способом криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, включающим суспензирование биомассы клеток до концентрации 15-30 мас.% в растворе поливинилового спирта с концентрацией 6-9 мас.%, приготовленном на питательной среде, специфичной для выращивания конкретного фототрофного микроорганизма, замораживание и хранение аликвот полученной суспензии объемом  $0,1-0,5\text{ см}^3$  при  $-80 \div -70^\circ\text{C}$ .

В результате совершения такой последовательности действий происходит получение образцов клеток, замороженных в присутствии полимера, способного формировать криогели. В отличие от прототипа, в котором проводится предварительная иммобилизация клеток перед их замораживанием, заявляемое техническое решение предусматривает формирование криогеля поливинилового спирта (ПВС) с одновременной иммобилизацией клеток фототрофных микроорганизмов непосредственно в ходе их замораживания, позволяя совмещать эти процессы (иммобилизацию и замораживание), существенно упрощая реализацию способа криоконсервации.

Формирование криогеля ПВС, как носителя, происходит при замораживании и последующем оттаивании водного раствора полимера [В.И.Лозинский (2002)]

Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения. // Успехи химии, Т.71, с.559-585]. Порообразователем служат кристаллы замораживаемой воды.

Использование для приготовления растворов ПВС известных питательных сред, специфичных для выращивания конкретных культур фототрофных микроорганизмов, способствует более быстрому и эффективному переходу клеток после их размораживания в метаболически активное состояние. Отсутствие в среде формирования носителя каких-либо реагентов, токсичных для клеток микроводорослей, позитивно сказывается на жизнеспособности клеток, далее вводимых в сформированный пористый матрикс криогеля ПВС. При этом криогель ПВС известен тем, что эффективно выполняет роль криопротектора для клеток многих микроорганизмов, изменяя свойства растворов электролитов во время замораживания и при дальнейшем оттаивании [Lozinsky V.I., Plieva F.M. (1998) Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. Basics and Applications. // Enzyme Microb. Tech., V.23 (3-4), p.227-242; M.A.Nowshari, G.Breg (2000) The protective action of polyvinyl alcohol during rapid freezing of mouse embryos. // Theriogenolog, V.53,1. 5, p.1157-1166].

Высокая пористость образующейся матрицы криогеля ПВС обеспечивает незатрудненную диффузию субстратов и продуктов к клеткам, находящимся в полимерной матрице, и от них.

Использование для формирования носителя синтетического полимера, характеризующегося хорошо известной химической структурой мономерных групп, обеспечивает получение носителей с регулярной пористостью, то есть с одинаковым размером и распределением пор по всему объему матрицы. При этом размер пор в криогеле ПВС, применяемом для криоконсервации в нем клеток фототрофных микроорганизмов, различающихся по своему размеру, может быть изменен путем варьирования концентрации раствора полимера, в котором суспендируются клетки фототрофных микроорганизмов перед их замораживанием [Лозинский В.И., Дамшкaлн Л.Г., Шаскольский Б.Л., Бабушкина Т.А., Курочкин И.Н., Курочкин И.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии. // Колоидн. журн. 69 (6) 798-816 (2007)].

Экспериментальный подбор строго определенной концентрации раствора полимера для приготовления на его основе суспензии клеток и формирования криогеля ПВС обеспечивает такую пористость матрицы, при которой происходит незатрудненный массообмен веществ, обеспечивающий клетки всем необходимым для их роста внутри матрицы, а также для выхода нарастающих клеток из крупных пор матрицы в среду при культивировании клеток после криоконсервации. Таким образом, использование способа криоконсервации, в котором формируется матрица криогеля ПВС, обеспечивает не только сохранение жизнеспособности клеток при их криоконсервации (замораживании и хранении), но и способствует тому, что иммобилизованные клетки сразу после их размораживания могут быть внесены в питательные среды в качестве инокулята, необходимого для размножения клеток фототрофных микроорганизмов и накопления в реакторах их биомассы, которая может применяться в качестве источника возобновляемого сырья.

Увеличение концентрации раствора полимера свыше 9 мас.% приводит к формированию прочной матрицы с размером пор, не позволяющим клеткам при переносе их после размораживания в питательные среды служить инокулятом, так как

клетки не могут покинуть матрицу через сформировавшиеся поры. Использование при консервации концентрации раствора полимера менее 6 мас.% приводит к формированию матрицы с крупными порами, через которые могут выходить из носителя в раствор клетки практически всех фототрофных микроорганизмов, играя роль инокулята (посевного материала), но при этом снижается степень выживаемости клеток при замораживании-оттаивании и их криохранении, так как уменьшается криопротекторная эффективность самого ПВС вследствие снижения его концентрации.

Создание 15-30 мас.%-ной концентрации клеток фототрофных микроорганизмов в суспензии, подлежащей замораживанию для их криоконсервации, обеспечивает максимальную жизнеспособность клеток, одновременно позволяя использовать размораживаемые образцы иммобилизованных клеток после их хранения в качестве концентрированного инокулята, обеспечивающего высокие удельные скорости роста клеток в реакторах для накопления биомассы. Увеличение концентрации клеток свыше 30 мас.% не является целесообразным, так как затрудняет суспензирование клеток, увеличивая длительность этого процесса, и не обеспечивает их равномерного распределения в растворе полимера, что ведет к потере жизнеспособности фототрофных микроорганизмов в процессе их криохранения. Концентрация клеток ниже 15 мас.% в составе замораживаемой суспензии приводит к снижению уровня выживания клеток при криохранении и ведет к существенному снижению скорости роста свободных клеток в средах, куда вносятся клетки после криоконсервации в качестве инокулята.

Границы температурного режима криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов ( $-80^{\circ}\text{C}$ ÷ $-70^{\circ}\text{C}$ ) обусловлены высоким уровнем выживания клеток в этом температурном диапазоне.

Снижение температуры ниже  $-80^{\circ}\text{C}$  приводит к тому, что структурирование криогеля ПВС сопровождается получением пор меньшего размера [Лозинский В.И., Дамшкalin Л.Г., Шаскольский Б.Л., Бабушкина Т.А., Курочкин И.Н., Курочкин И.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии. // Колоидн. журн. 69 (6) 798-816 (2007)], что затрудняет выход клеток из состояния криоконсервации, лимитирует массообменные процессы, не способствует использованию клеток после криоконсервации в качестве инокулята из-за невозможности их выхода из матрицы и требует применения нестандартного дорогостоящего оборудования с повышенной термоизоляцией. Повышение температуры выше  $-70^{\circ}\text{C}$  приводит к уменьшению скорости замораживания суспензии клеток и, как следствие, к понижению уровня выживаемости клеток в процессе криохранения, поскольку при используемых концентрациях раствора полимера (6-9 мас.%) формируются более крупные кристаллы воды, оказывающие деструктивное воздействие на клетки.

Получение клеток фототрофных микроорганизмов каждой культуры перед их криоконсервацией проводят с применением известных биотехнологических приемов в соответствии с их частными характеристиками и использованием сред, специфичных для применения к каждой из культур.

Суспензия клеток фототрофных микроорганизмов в растворе гелеобразователя может быть заморожена для криоконсервации в указанных температурных режимах в любой форме, позволяющей сформировать частицы, имеющие объем в интервале 0,1-0,5 см<sup>3</sup>. Увеличение объема частиц с клетками приводит к замедлению скорости их замораживания и снижению жизнеспособности клеток в центре таких частиц, а

уменьшение объема приводит к тому, что образец замораживается очень быстро и полимер не успевает эффективно выполнить роль криопротектора. Уменьшение объема также приводит к трудностям дозировки вязких суспензий клеток в растворе полимера.

5 Существенным отличием заявляемого технического решения является новое сочетание технологических операций, которое ранее известно не было, а именно: смешивание клеток фототрофных микроорганизмов с раствором ПВС в строго определенных соотношениях, определяемых концентрацией клеток в растворе  
10 полимера и концентрацией раствора полимера, приготовленном на основе питательной среды, специфичной для выращивания конкретного фототрофного микроорганизма, замораживание полученной смеси в определенном диапазоне температур и в объеме установленной величины для хранения при задаваемом температурном режиме. Изменение заявляемых условий реализации заявляемого  
15 технического решения по криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов приводит к снижению уровня выживаемости клеток в результате процесса замораживания-оттаивания или в процессе хранения, уменьшению их метаболической активности.

20 В сравнении с известными аналогами, предполагающими проведение криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов в двухстадийном режиме замораживания с использованием специально привносимых токсичных для клеток криопротекторов, а также в сравнении с прототипом, предполагающим первоначально иммобилизацию клеток в полимерный гель с последующим  
25 замораживанием клеток, существенным отличием заявляемого способа криоконсервации является проведение процесса замораживания в одну стадию с иммобилизацией клеток фототрофных микроорганизмов в криогель полимера, способного выполнять роль криопротектора. Поскольку используемый синтетический  
30 полимер, выполняющий функции криопротектора, не подвержен микробному разложению, то снижается опасность контаминации криоконсервируемого материала посторонними микроорганизмами и не требуется соблюдение столь строгих норм стерильности при подготовке и хранении материала, как в случае прототипа.

35 В сравнении с большинством аналогов, заявляемое техническое решение не требует использования специального низкотемпературного и термоизолированного, как в случае с жидким азотом, оборудования для хранения образцов клеток при их криоконсервации, что позволяет хранить большие объемы замороженного материала. Также не требуется удаление криопротектора после размораживания клеток ввиду  
40 абсолютной нетоксичности используемого полимера (ПВС имеет степень безопасности «GRAS» - generally recognized as safe [European Food Safety Authority (2005) Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to the use of polyvinyl alcohol as a coating agent for food supplements. Question number EFSA-Q-2005-017. // EFSA J., V.294, p.1-  
45 15]).

В отличие от аналогов и прототипа, заявляемое техническое решение позволяет сразу же использовать размороженные образцы клеток в качестве концентрированного посевного материала для выращивания клеток фототрофных  
50 микроорганизмов для целенаправленного накопления их биомассы.

В сравнении с аналогами и прототипом, заявляемое техническое решение позволяет увеличить выживаемость клеток различных фототрофных микроорганизмов в процессе их замораживания-оттаивания с 47-49% (в прототипе) и 78-79% (в аналогах)

до 90-95% и сохранить этот высокий уровень жизнеспособности, контролируемый традиционными микробиологическими и альгологическими методами, в течение срока, составляющего до полутора лет. Таким образом, благодаря заявляемому техническому решению, может быть существенно упрощена по реализации и улучшена по характеристикам (выживаемости клеток) криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов.

Ниже приводятся конкретные примеры реализации заявляемого технического решения.

Пример 1. Криоконсервация клеток Фототрофных микроорганизмов рода *Spirulina*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Spirulina platensis* выращивают в питательной среде Заррука [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс.коллекция микроорганизмов, 2001. - ] в течение 340 ч при освещении  $4000 \pm 500$  Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием ( $4000\text{ g}$ , 20 мин), суспендируют до конечной концентрации 16 мас.% в 6% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию распределяют по лункам 96-луночной пластиковой плашки так, что формирующиеся частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками имеют объем  $0,5\text{ см}^3$ , переносят в морозильную камеру, замораживают при  $-70^\circ\text{C}$  и хранят в ней до размораживания.

Выживаемость клеток *Spirulina platensis* после размораживания составляет 90% и сохраняется на этом уровне в течение 500 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Spirulina platensis*, иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята, обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 8,0 г/л в течение 300 ч.

Пример 2. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Dunaliella*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Dunaliella salina* выращивают в питательной среде Семененко-Абдулаева [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс.коллекция микроорганизмов, 2001. - ] в течение 450 ч при освещении  $4000 \pm 500$  Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием ( $6000\text{ g}$ , 20 мин), суспендируют до конечной концентрации 25 мас.% в 8% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию выдавливают через дозирующее устройство по каплям объемом  $0,45\text{ см}^3$  на металлическую поверхность, которую переносят в морозильную камеру и замораживают при  $-73^\circ\text{C}$  так, чтобы сформировались частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками, и хранят там эти частицы до размораживания.

Выживаемость клеток *Dunaliella salina* после размораживания составляет 94% и сохраняется на этом уровне в течение 520 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Dunaliella salina*, иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 6,5 г/л в течение 310 ч.

Пример 3. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Chlorella*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Chlorella vulgaris* выращивают в питательной среде Тамия [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс. коллекция микроорганизмов, 2001. -] в течение 160 ч при освещении 4000±500 Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (6000 g, 15 мин), суспендируют до конечной концентрации 20 мас.% в 7% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию выдавливают через дозирующее устройство по каплям объемом 0,2 см<sup>3</sup> на полистирольную поверхность, которую переносят в морозильную камеру и замораживают при -70°C так, чтобы сформировались частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками, и хранят там эти частицы до размораживания.

Выживаемость клеток *Chlorella vulgaris* после размораживания составляет 95% и сохраняется на этом уровне в течение 480 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Chlorella vulgaris*, иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 10,4 г/л в течение 170 ч.

Пример 4. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Nannochloropsis*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Nannochloropsis* sp. выращивают в питательной среде BG-11 [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс. коллекция микроорганизмов, 2001. -] в течение 420 ч при освещении 4000±500 Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (7000 g, 25 мин), суспендируют до конечной концентрации 19 мас.% в 7,5% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию по 0,4 см<sup>3</sup> распределяют по стеклянным микропробиркам, которые запаивают и помещают в морозильную камеру, затем замораживают при -80°C и хранят там до размораживания.

Выживаемость клеток *Nannochloropsis* sp. после размораживания составляет 93% и сохраняется на этом уровне в течение 500 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Nannochloropsis* sp., иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 6,8 г/л в течение 340 ч.

Пример 5. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Galdieria*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Galdieria partita* выращивают в питательной среде Аллен [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс. коллекция микроорганизмов, 2001. -] в течение 510 ч при освещении 4000±500 Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (5500 g, 20 мин), суспендируют до конечной концентрации 23 мас.% в 8% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что

используется для выращивания культуры, полученную суспензию распределяют по лункам 96-луночной пластиковой плашки так, что формирующиеся частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками имеют объем  $0,3 \text{ см}^3$ , переносят в морозильную камеру и замораживают при  $-75^\circ\text{C}$  и хранят там до размораживания.

Выживаемость клеток *Galdieria partita* после размораживания составляет 91% и сохраняется на этом уровне в течение 490 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Galdieria partita*, иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 5,8 г/л в течение 270 ч.

Пример 6. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Nostoc*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Nostoc* sp. выращивают в питательной среде BG-11 [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс.коллекция микроорганизмов, 2001. -] в течение 350 ч при освещении  $4000 \pm 500$  Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (3500 g, 20 мин), суспендируют до конечной концентрации 20 мас.% в 6,5% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию распределяют по лункам 96-луночной пластиковой плашки так, что формирующиеся частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками имеют объем  $0,15 \text{ см}^3$ , переносят в морозильную камеру и замораживают при  $-79^\circ\text{C}$  и хранят там до размораживания.

Выживаемость клеток *Nostoc* sp. после размораживания составляет 91% и сохраняется на этом уровне в течение 300 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Nostoc* sp., иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 7,2 г/л в течение 300 ч.

Пример 7. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Thalassiosira*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Thalassiosira weissflogii* выращивают в питательной среде f/2 [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс. коллекция микроорганизмов, 2001. -] в течение 250 ч при освещении  $4000 \pm 500$  Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (7500 g, 20 мин), суспендируют до конечной концентрации 28 мас.% в 8,7% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию распределяют по лункам 96-луночной пластиковой плашки так, что формирующиеся частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками имеют объем  $0,45 \text{ см}^3$ , переносят в морозильную камеру и замораживают при  $-70^\circ\text{C}$  и хранят там до размораживания.

Выживаемость клеток *Thalassiosira weissflogii* после размораживания составляет 95% и сохраняется на этом уровне в течение 540 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Thalassiosira weissflogii*, иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 4,3 г/л

в течение 200 ч.

Пример 8. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Haematococcus*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Haematococcus pluvialis* выращивают в питательной среде ОНМ [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс.коллекция микроорганизмов, 2001. - ] в течение 800 ч при освещении  $4000 \pm 500$  Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (6700 g, 30 мин), суспендируют до конечной концентрации 26 мас.% в 7% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию распределяют по лункам 96-луночной пластиковой плашки так, что формирующиеся частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками имеют объем 0,4 см, переносят в морозильную камеру и замораживают при  $-74^{\circ}\text{C}$  и хранят там до размораживания.

Выживаемость клеток *Haematococcus pluvialis* после размораживания составляет 92% и сохраняется на этом уровне в течение 510 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Haematococcus pluvialis*, иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 3,8 г/л в течение 600 ч.

Пример 9. Криоконсервация клеток Фототрофных микроорганизмов рода *Cosmarium*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Cosmarium* sp. выращивают в питательной среде BG-11 [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс. коллекция микроорганизмов, 2001. - ] в течение 300 ч при освещении  $4000 \pm 500$  Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (6000 g, 25 мин), суспендируют до конечной концентрации 16 мас.% в 8% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию распределяют по лункам 96-луночной пластиковой плашки так, что формирующиеся частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками имеют объем  $0,5 \text{ см}^3$ , переносят в морозильную камеру и замораживают при  $-77^{\circ}\text{C}$  и хранят там до размораживания.

Выживаемость клеток *Cosmarium* sp. после размораживания составляет 94% и сохраняется на этом уровне в течение 530 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Cosmarium* sp., иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 6,2 г/л в течение 280 ч.

Пример 10. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Chlamydomonas*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Chlamydomonas* sp. выращивают в питательной среде BG-11 [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс.коллекция микроорганизмов, 2001. - ] в течение 350 ч при освещении  $4000 \pm 500$  Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от

культуральной жидкости центрифугированием (6000 g, 25 мин), суспендируют до конечной концентрации 24 мас.% в 6,5% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию распределяют по лункам 96-луночной пластиковой плашки так, что формирующиеся частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками имеют объем 0,3 см<sup>3</sup>, переносят в морозильную камеру и замораживают при -78°C и хранят там до размораживания.

Выживаемость клеток *Chlamydomonas* sp. после размораживания составляет 90% и сохраняется на этом уровне в течение 420 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Chlamydomonas* sp., иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 8,0 г/л в течение 250 ч.

Пример 11. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Chlorococcum*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Chlorococcum* sp. выращивают в питательной среде BG-11 [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс. коллекция микроорганизмов, 2001. - ] в течение 180 ч при освещении 4000±500 Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (6000 g, 25 мин), суспендируют до конечной концентрации 21 мас.% в 7% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию распределяют по лункам 96-луночной пластиковой плашки так, что формирующиеся частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками имеют объем 0,2 см, переносят в морозильную камеру и замораживают при -79°C и хранят там до размораживания.

Выживаемость клеток *Chlorococcum* sp. после размораживания составляет 92% и сохраняется на этом уровне в течение 410 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Chlorococcum* sp., иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 12,0 г/л в течение 240 ч.

Пример 12. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Stigeoclonium* sp.

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Stigeoclonium* sp. выращивают в модифицированной питательной среде BG-11 [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс. коллекция микроорганизмов, 2001. - ] в течение 280 ч при освещении 4000±500 Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (5800 g, 20 мин), суспендируют до конечной концентрации 28 мас.% в 8% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию распределяют по лункам 96-луночной пластиковой плашки так, что формирующиеся частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками имеют объем 0,3 см<sup>3</sup>, переносят в морозильную камеру и замораживают при -76°C и хранят там до размораживания.

Выживаемость клеток *Stigeoclonium* sp. после размораживания составляет 94% и

сохраняется на этом уровне в течение 520 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Stigeoclonium* sp., иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 6,8 г/л в течение 240 ч.

Пример 13. Криоконсервация клеток фототрофных микроорганизмов рода *Gloeotrichia*

Биомассу клеток фототрофных микроорганизмов *Gloeotrichia echinulata* выращивают в питательной среде ZG - 11 [Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. - Электрон, текстовые данные. (227 КБ) - М.: Всеросс.коллекция микроорганизмов, 2001. - ] в течение 320 ч при освещении  $4000 \pm 500$  Лк под лампами Osram Fluora 77 (30 Вт), отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (6000 g, 20 мин), суспендируют до конечной концентрации 18 мас.% в 8,5% растворе поливинилового спирта, приготовленном на основе питательной среды аналогичного состава той, что используется для выращивания культуры, полученную суспензию распределяют по пластиковым эппендорфам, имеющим объем  $1,5 \text{ мл}^3$ , так, что формирующиеся частицы криогеля ПВС с включенными в него клетками имеют объем  $0,5 \text{ см}^3$ , переносят в морозильную камеру и замораживают при  $-80^\circ\text{C}$  и хранят там до размораживания.

Выживаемость клеток *Gloeotrichia echinulata* после размораживания составляет 93% и сохраняется на этом уровне в течение 540 суток. Перенос в питательную среду указанного выше состава для культивирования размороженных клеток *Gloeotrichia echinulata*, иммобилизованных в криогель ПВС, с целью их использования в качестве инокулята обеспечивает накопление свободных клеток в среде в концентрации 8,2 г/л в течение 480 ч.

#### Формула изобретения

Способ криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, включающий суспензирование биомассы клеток до концентрации 15-30 мас.% в растворе поливинилового спирта с концентрацией 6-9 мас.%, приготовленном на питательной среде, специфичной для выращивания конкретного фототрофного микроорганизма, замораживание и хранение аликвот полученной суспензии объемом  $0,1-0,5 \text{ см}^3$  при  $-80 \div -70^\circ\text{C}$ .