А. Р. Чанышева (к.х.н., доц.), Т. Е. Воробьева (магистрант), Е. А. Шейко (магистрант),
В. В. Зорин (чл.-корр. АН РБ, д.х.н., проф., зав. каф.)

ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ АЦЕТОФЕНОНА ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ *D. CAROTA*

Уфимский государственный нефтяной технический университет,
кафедра биохимии и технологии микробиологических производств
450062, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1; тел. (347)2431935, e-mail: aliyach@mail.ru

A. R. Chanyшева, T. E. Vorobyova, E. A. Sheiko, V. V. Zorin

ENANTIOSELECTIVE REDUCTION OF ACETOPHENONE BY LYOPHILIZED *D. CAROTA* CELLS

Ufa State Petroleum Technological University
1, Kosmonavtov Str., 450062, Ufa, Russia; ph. (347)2431935, e-mail: aliyach@mail.ru

Исследована возможность использования лиофилизированных клеток *D. carota* (в том числе клеток, лиофилизированных с применением различных криопротекторов) для энантиоселективного биовосстановления ацетофенона в (S)-(–)-1-фенилэтанол. Показано, что биовосстановление ацетофенона в течение 96 ч в аэробных условиях при температуре 23–27 °С в водной среде в присутствии лиофилизированных клеток *D. carota*, протекает энантиоселективно и позволяет получать (S)-(–)-1-фенилэтанол с выходом 12% и оптической чистотой 93% *ee*. При биовосстановлении ацетофенона в тех же условиях с участием клеток *D. carota*, лиофилизированных в присутствии криопротектора глюкозы, выход целевого (S)-(–)-1-фенилэтанола возрастает до 22% при оптической чистоте 93% *ee*. Активность клеток *D. carota*, лиофилизированных в присутствии диметилсульфоксида, снижается, и выход (S)-(–)-1-фенилэтанола составляет 5%.

Ключевые слова: ацетофенон; криопротектор; лиофилизированные клетки; (S)-(–)-1-фенилэтанол; энантиоселективное биовосстановление.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки России в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности (№ 4.6451.2017/8.9).

Асимметрическое восстановление прохиральных кетонов с участием клеточных биокатализаторов является перспективным методом получения энантиомерно чистых спиртов — важных компонентов катализаторов органи-

Possibility of lyophilized *D. carota* cells (including cells lyophilized using different cryoprotectants) application for enantioselective bioreduction of acetophenone to (S)-(–)-1-phenylethanol was investigated. Bioreduction of acetophenone for 96 hours under aerobic conditions at 23–27 °C in an aqueous medium in the presence of lyophilized *D. carota* cells proceeds enantioselectively and allows the production of (S)-(–)-1-phenylethanol in 12% yield and optical purity of 93% *ee*. After bioreduction of acetophenone with *D. carota* cells lyophilized in the presence of glucose as cryoprotectant under the same conditions the yield of the desired (S)-(–)-1-phenylethanol increases to 22% with an optical purity of 93% *ee*. Activity of *D. carota* cells lyophilized in the presence of dimethyl sulfoxide is reduced and the yield of (S)-(–)-1-phenylethanol is 5%.

Key words: acetophenone; cryoprotectant; enantioselective bioreduction; lyophilized cells; (S)-(–)-1-phenylethanol.

This work was supported by the Ministry of Education and Science of Russia within the framework of the basic part of the state task in the field of scientific activity (№4.6451.2017/8.9).

ческого синтеза, биоразлагаемых полимеров, ароматизаторов, агрохимикатов, лекарственных препаратов, обладающих высокой биологической активностью^{1–6}.

Ранее нами с целью создания метода получения (S)-(–)-1-фенилэтанола — предшественника ряда низкомолекулярных биорегулято-

Дата поступления 18.04.18

ров⁷ был использован биокатализатор на основе клеток *D. carota* и найдены условия, позволяющие в течение 144 ч получать (*S*)-(-)-1-фенилэтанол с высоким выходом 95% и оптической чистотой 97% *ee*.

Ферментативная активность биокатализатора зависит от ряда факторов: температуры, pH растворителя, условий культивирования, длительности хранения и др. Одной из проблем является поддержание биокатализаторов на основе клеточных культур в активном состоянии в течение длительного времени. Для решения этой задачи разработан ряд методов, одним из которых является лиофилизация^{8–10}.

Лиофилизация является эффективным способом сохранения активности клеточных культур. Однако в ходе лиофилизации клетки могут подвергаться деструкции, что приводит к снижению их жизнеспособности и активности⁸.

Многочисленные исследования были направлены на изучение факторов, влияющих на криоконсервацию клеточных культур^{9–12}. Среди них – клеточная устойчивость, которая в значительной степени зависит от состава криозащитных добавок до лиофилизации. При этом подбор оптимальных криопротекторов играет ключевую роль.

В данной работе была исследована возможность использования лиофилизированных клеток *D. carota* (в том числе клеток, лиофилизированных с применением различных криопротекторов) для энантиоселективного биовосстановления ацетофенона до соответствующего (*S*)-(-)-1-фенилэтанола.

Восстановление ацетофенона в течение 96 ч в аэробных условиях при температуре 23–27 °C в водной среде, содержащей 2.4 г/л субстрата и 25 г/л суспензии клеток *D. carota*, приводит к образованию (*S*)-(-)-1-фенилэтанола с выходом 51% и оптической чистотой 95% *ee* (табл. 1).

Стереоселективное биовосстановление ацетофенона в аналогичных условиях в присутствии лиофилизированных клеток *D. carota*, приводит к (*S*)-(-)-1-фенилэтанолу с выходом 12% и оптической чистотой 93% *ee*.

Низкий выход целевого (*S*)-(-)-1-фенилэтанола, вероятно, обусловлен медленным замораживанием клеток, при котором происходит рост кристаллов льда и разрушение клеток. Ак-

тивность поврежденных клеток при этом снижается и, как следствие, конверсия исходного субстрата в присутствии лиофилизированных таким способом клеток *D. carota* уменьшается¹³.

Известно, что предварительная обработка клеток различными криопротекторами (моно- и полисахаридами, гликолями, органическими кислотами, аминокислотами и их солями и др.)^{14–19} позволяет сохранить активность клеточных культур, смягчить разрушительные эффекты лиофилизации и расширить диапазон оптимальных условий лиофилизации.

Нами была исследована также возможность использования в биовосстановлении ацетофенона клеток *D. carota*, лиофилизированных в присутствии глюкозы и диметилсульфоксида (ДМСО).

Предполагается, что глюкоза, сахароза, трегалоза и другие сахара способствуют дегидратации клетки до замораживания и препятствуют образованию кристаллов льда внутри клетки. Они обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны. Действие углеводов сводится к уменьшению осмотического давления воды и генерированию аморфной стекланной фазы. Эта иммобилизация предотвращает агрегацию или механический стресс, вызванный кристаллизацией воды.

Установлено, что биотрансформация с участием клеток *D. carota*, лиофилизированных в присутствии глюкозы, в течение 96 ч позволяет получить (*S*)-(-)-1-фенилэтанол с выходом 22% и оптической чистотой 93% *ee* (табл. 1).

Защитное действие диметилсульфоксида как криопротектора основано на высокой скорости проникновения через клеточную мембрану и образовании большого количества водородных связей с молекулами жидкой фазы клетки. Это приводит к уменьшению вероятности образования внутриклеточных кристаллов льда, а также к снижению эффекта концентрирования внутриклеточных солей при отрицательных температурах, что уменьшает степень криоповреждения клетки²⁰.

Однако, биовосстановление ацетофенона с участием клеток *D. carota*, лиофилизированных в присутствии диметилсульфоксида в течение 96 часов приводит к образованию (*S*)-(-)-1-фенилэтанола лишь с выходом 5% и оптической чистотой 93% *ee* (табл. 1).

Помимо криозащитных свойств, ДМСО обладает токсическим действием по отношению к биообъектам²¹, что, вероятно, и объясняет существенное снижение выхода целевого (*S*)-(-)-1-фенилэтанола.

Выходы и оптическая чистота (S)-(–)-1-фенилэтанола, полученного при восстановлении ацетофенона с участием нелиофилизированных и лиофилизированных клеток *D. carota* в отсутствие и в присутствии различных криопротекторов при температуре 23–27 °С в водной среде

Время реакции, ч	Выход, % / Оптическая чистота ee, % *			
	Клетки <i>D. carota</i>	Леофилизированные клетки <i>D. carota</i>	Леофилизированные клетки <i>D. carota</i> (криопротектор: ДМСО)	Леофилизированные клетки <i>D. carota</i> (криопротектор: глюкоза)
24	20/92	5/91	2/91	13/91
48	38/94	8/92	3.6/90	16/93
72	43/95	10/93	4/93	19/92
96	51/95	12/93	5/94	22/93

* - по данным энантиоселективного ГЖХ анализа

За ходом протекания реакций следили хроматографически, используя заведомо синтезированные образцы рацемического фенилэтанола с применением энантиоселективной колонки Astec CHIRALDEXTM В-РМ (30 м × 0.25 мм × 0.12 мкм), на которой время удерживания (R)-(+)-1-фенилэтанола меньше, чем (S)-(–)-1-фенилэтанола.

Структуру (S)-(–)-1-фенилэтанола подтверждали с помощью методов ЯМР ¹H и ¹³C-спектроскопии, а также хромато-масс-спектрометрии. Конфигурация (S)-(–)-1-фенилэтанола была подтверждена поляриметрически.

Анализ кинетики накопления (S)-(–)-1-фенилэтанола в процессе биовосстановления ацетофенона показывает, что восстановление наиболее эффективно протекает с участием биокатализатора *D. carota*, не подверженного лиофилизации (табл. 1). При стереоселективном биовосстановлении ацетофенона в аналогичных условиях в присутствии лиофилизированных клеток *D. carota* выход (S)-(–)-1-фенилэтанола снижается. Однако при биовосстановлении ацетофенона с участием клеток *D. carota*, лиофилизированных в присутствии криопротектора глюкозы, выход целевого (S)-(–)-1-фенилэтанола значительно возрастает (22% (93% ee), в сравнении с выходом, полученным в присутствии клеток *D. carota*, лиофилизированных без криопротектора. Активность лиофилизированных в присутствии ДМСО клеток *D. carota* падает, очевидно, поскольку ДМСО обладает токсическим действием.

Исследование оптических свойств (S)-(–)-1-фенилэтанола показывает, что лиофилизированные клетки *D. carota* энантиоселективно осуществляют восстановление ацетофенона с образованием целевого продукта с высокой оптической чистотой.

Таким образом, лиофилизированные клетки *D. carota* могут быть использованы в качестве биокатализатора для энантиоселективного восстановления ацетофенона в (S)-(–)-1-фенилэтанол. Однако для создания эффективного

метода получения оптически чистого (S)-(–)-1-фенилэтанола с высоким выходом необходимо проведение дальнейших исследований по оптимизации условий лиофилизации биокатализатора.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C записаны в CDCl₃ на приборе Bruker AM-300 (300.13 МГц (¹H) и 75.47 МГц (¹³C)) и Bruker AM-500 (600.30 МГц (¹H) и 159.96 МГц (¹³C)). Химические сдвиги в спектрах ЯМР ¹H измеряли относительно ТМС, в спектрах ЯМР ¹³C – относительно сигнала растворителя (77.0 м.д.). Хромато-масс-спектральный анализ проводили на приборе GCMS-QP2010S Shimadzu (электронная ионизация при 70 эВ). Хроматографический анализ продуктов проводили на программно-аппаратном комплексе Хроматэк-Кристалл 5000.2 с пламенно-ионизационным детектором, газ-носитель – гелий (1.1 мл/мин), энантиоселективная колонка Astec CHIRALDEXTM В-РМ (30 м × 0.25 мм × 0.12 мкм). Удельное вращение полученных продуктов ([α]²⁰_D продукта) измеряли на автоматическом поляриметре AA-55 Optical Activity Ltd. (λ=589 нм). Стандартная величина удельного вращення (S)-(–)-1-фенилэтанола [α]²⁰_D = –44° [22].

Подготовка биокатализатора. Биокатализатор на основе клеток *D. carota* был предварительно обработан криопротектором, в качестве которого был использован 1.28 М раствор ДМСО (10% от общей массы клеток) или 30%-ный раствор глюкозы (20% от общей массы клеток).

Условия лиофилизации. Предварительно обработанные криопротектором клетки были подвержены заморозке в морозильной камере Sanyo MDF-193 при –50 °С, и высушены в вакууме (10 Па) в лиофильной сушилке Scientz 10ND при температуре 20 °С, температура в конденсаторе составляла –50 °С. Полный цикл лиофилизации составил 26 ч.

Получение (S)-(-)-1-фенилэтанола.

Ацетофенон (0.1 г) добавляли в суспензию биокатализатора на основе клеток *D. carota* (15 г) в 70 мл воды, после чего реакционную смесь помещали в орбитальный шейкер (150 об/мин) и перемешивали при температуре 23–27 °С. По достижению необходимой конверсии суспензию фильтровали, биомассу промывали три раза водой. Фильтраты экстрагировали диэтиловым эфиром (3×125 мл). Эфирные вытяжки сушили Na₂SO₄, концентрировали и анализировали.

(S)-(-)-1-Фенилэтанол. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д.: 1.40 д (3H, CH₃), 4.71–4.77 м (1H, CH), 7.22–7.42 м (5H, CH_{Ar}). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 25.18 (1C, CH₃), 70.05 (1C, CH), 125.34 (2C, CH_{Ar}), 127.18 (1C, CH_{Ar}), 128.28 (2C, CH_{Ar}), 145.92 (1C, CH_{Ar}). Масс-спектр, m/z (I_{омн.}, %): 122 (30), 107 (85), 79 (100), 78 (23), 77 (57), 51 (23), 50 (11), 44 (17), 43 (39), 39 (10).

Синтез рацемического (R),(S)-1-фенилэтанола осуществляли по известной методике ²³.

Литература

1. Suan C.L., Sarmidi M.R. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R, S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.— 2004.— V.28, №2-3.— Pp.111-119.
2. Patel R., Namee C.G., Banerjee A., Howell J.M., Robison R.S., Szarka L.J. Stereoselective reduction of β-keto esters by *Geotrichum candidum* // *Enzyme and Microbial Technology*.— 1992.— V.14.— Pp.731-738.
3. Medson C., Smallridge A.J., Trehwella M.A. The stereoselective preparation of β-hydroxy esters using a yeast reduction in an organic solvent // *Tetrahedron: Asymmetry*.— 1997.— V.8.— Pp.1049-1054.
4. Чанышева А.Р., Воробьева Е.Н., Зорин В.В. Энантиоселективное биовосстановление ацетофенона в (R)- и (S)-1-фенилэтанола // *Экологическая химия*.— 2017.— Т.26, №6.— С.296-300.
5. Шейко Е.А., Медникова Е.Э., Воробьева Т.Е., Чанышева А.Р. Исследование условий энантиоселективного восстановления ацетофенона в (S)-(-)-1-фенилэтанол // *Баш. хим. ж.*— 2018.— Т.25, №1.— С.55-58.
6. Шакиров А.Н., Петухова Н.И., Дельмухаметов Р.Р., Корнеева С.В., Зорин В.В. Энантиоселективное биовосстановление ацетофенона и его функциональных производных // *Баш. хим. ж.*— 2012.— Т.19, №2.— С.71-73.
7. Чанышева А.Р., Юнусова Г.В., Воробьева Т.Е., Зорин В.В. Энантиоселективный синтез (S)-1-фенилэтанола — предшественника низкомолекулярных биорегуляторов // *Экологическая химия*.— 2017.— Т.26, №6.— С.6-10.
8. Costa E., Usall N., Teixido N., Garcia N., Vinas I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying // *Journal of Applied Microbiology*.— 2000.— V.89.— Pp.793-800.
9. Villa R., Molinari F. Reduction of Carbonylic and Carboxylic Groups by Plant Cell Cultures // *Journal of Natural Products*.— 2008.— V.71.— Pp.693-696.
10. Fonseca F., Marin M., Morris G. J. Stabilization of Frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Glycerol Suspensions: Freezing Kinetics and Storage Temperature Effects // *Applied and Environmental Microbiology*.— 2006.— V.72, №10.— Pp.6474 - 6482.

References

1. Suan C.L., Sarmidi M.R. [Immobilised lipase-catalysed resolution of (R, S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, vol.28, no.2-3, pp.111-119. doi: 10.1016/j.molcatb.2004.02.004.
2. Patel R., Namee C.G., Banerjee A., Howell J.M., Robison R.S., Szarka L.J. [Stereoselective reduction of β-keto esters by *Geotrichum candidum*]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, vol.14, pp.731-738. doi: 10.1016/0141-0229(92)90113-3.
3. Medson C., Smallridge A.J., Trehwella M.A. [The stereoselective preparation of β-hydroxy esters using a yeast reduction in an organic solvent]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, vol.8, pp.1049-1054. doi: 10.1016/S0957-4166(97)00050-5.
4. Chanysheva A. R., Vorobyova E. N., Zorin V. V. [Enantioselective Bioreduction of Acetophenone into (R)- and (S)-1-Phenylethanols]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2017, vol.26, no.6, pp.296-300. doi: 10.1134/s1070363217130229.
5. Sheiko E.A., Mednikova E.E., Vorobyova T.E., Chanysheva A.R. *Issledovanie uslovii enantioselektivnogo vosstanovleniya atsetofenona v (S)-(-)-1-fenil-etanol* [Investigation of enantioselective bioreduction conditions of acetophenone to (S)-(-)-1-phenylethanol]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2018, vol.25, no.1, pp.55-58.
6. Shakirov A.N., Petukhova N.I., Delmuhametov R.R., Korneeva S.V., Zorin V.V. *Enantioselektivnoe biovosstanovlenie atsetofenona i ego funktsionalnykh proizvodnykh* [Microbiological enantioselective reduction of acetophenone and its functional derivatives]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2012, vol.19, no.2, pp.71-73.
7. Chanysheva A.R., Yunusova G.V., Vorobyova T.E., Zorin V.V. [Enantioselective synthesis of (S)-1-phenylethanol, a precursor to low-molecular-weight bioregulators]. *Russian journal of general chemistry*, 2016, vol.86, no.3, pp.3021-3024. doi: 10.1134/S107036321613017X.
8. Costa E., Usall N., Teixido N., Garcia N., Vinas I. [Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, vol.89, pp.793-800. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01182.x.
9. Villa R., Molinari F. [Reduction of Carbonylic and Carboxylic Groups by Plant Cell Cultures]. *Journal of Natural Products*, 2008, vol.71, pp.693-696. doi: 10.1021/np070386s.

11. Dumont F., Marechal P., Gervais P. Viability after Freezing at Different Cooling Rates // *Applied and Environmental Microbiology*.— 2004.— V.70, №1.— Pp.268-272.
12. Zhang J., Liu Q., Chen W., Du G., Chen J. Short communication: Protection of lyophilized milk starter *Lactobacillus casei* Zhang by glutathione // *Journal of Dairy Science*.— 2016.— V.99.— Pp.1-7.
13. Kazici H.C., Bayraktar E., Mehmetoglu U. Optimization of the asymmetric synthesis of chiral aromatic alcohol using freeze-dried carrots as whole-cell biocatalysts // *Green Processing and Synthesis*.— 2016.— V.5, №2.— P.131-137.
14. Lamprech E.D., Foster E.M. The survival of starter organisms in concentrated suspensions // *The Journal of Applied Bacteriology*.— 1963.— V.26.— Pp.359-369.
15. Chavarri F.J., De Paz M., Nunez M. Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains // *Biotechnology Letters*.— 1988.— V.10.— Pp.11-16.
16. Teixeira P.C., Castro M.H., Malcata F.X., Kirby R.M. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying // *Journal of Dairy Science*.— 1995.— V.78.— Pp.1025-1031.
17. Andersen A.B., Fog-Petersen M.S., Larsen H., Skibsted L.H. Storage stability of freeze-dried starter cultures *Streptococcus thermophilus* as related to physical state of freezing matrix // *Journal of Food Science and Technology*.— 1999.— V.32.— Pp.540-547.
18. Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria // *LAIT journal*.— 2003.— V.83.— Pp.203-210.
19. Fonseca F., Beal C., Mihoub F., Marin M., Corrieu G. Improvement of cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 with additives displaying different protective effects // *International Dairy Journal*.— 2003.— V.13.— Pp.917-926.
20. Fuller B., Lane N., Benson E. Life in the frozen state. London: CRC Press, 2004.— 672 p.
21. Rowley S.D., Anderson G.L. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on haemopoietic progenitor cells // *Bone Marrow Transplant*.— 1993.— V. 11, №5.— Pp.389-393.
22. Каталог фирмы Sigma-Aldrich, Inc. «(S)-(-)-1-Phenylethanol» Электронный ресурс, режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/685836>.
23. Агрономов А. Е. Лабораторные работы в органическом практикуме.— М.: Химия, 1974.— 376 с.
10. Fonseca F., Marin M., Morris G. J. [Stabilization of Frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Glycerol Suspensions: Freezing Kinetics and Storage Temperature Effects]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, vol. 72, no. 10, pp. 6474 - 6482. doi: 10.1128/AEM.00998-06.
11. Dumont F., Marechal P., Gervais P. [Cell Size and Water Permeability as Determining Factors for Cell Viability after Freezing at Different Cooling Rates]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol.70, no.1, pp.268-272. doi: 10.1128/AEM.70.1.268-272.2004 .
12. Zhang J., Liu Q., Chen W., Du G., Chen J. [Short communication: Protection of lyophilized milk starter *Lactobacillus casei* Zhang by glutathione]. *Journal of Dairy Science*, 2016, vol.99, pp.1-7. doi: 10.3168/jds.2015-9540.
13. Kazici H.C., Bayraktar E., Mehmetoglu U. [Optimization of the asymmetric synthesis of chiral aromatic alcohol using freeze-dried carrots as whole-cell biocatalysts]. *Green Processing and Synthesis*, 2016, vol.5, no.2, pp.131-137. doi: 10.1515/gps-2015-0118.
14. Lamprech E.D., Foster E.M. [The survival of starter organisms in concentrated suspensions]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1963, vol.26, pp.359-369. doi: 10.1111/j.1365-2672.1963.tb04786.x.
15. Chavarri F.J., De Paz M., Nunez M. [Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains]. *Biotechnology Letters*, 1988, vol.10, pp.11-16. doi: 10.1007/BF01030016.
16. Teixeira P.C., Castro M.H., Malcata F.X., Kirby R.M. [Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying]. *Journal of Dairy Science*, 1995, vol.78, pp.1025-1031. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(95)76718-2.
17. Andersen A.B., Fog-Petersen M.S., Larsen H., Skibsted L.H. [Storage stability of freeze-dried starter cultures *Streptococcus thermophilus* as related to physical state of freezing matrix]. *Journal of Food Science and Technology*, 1999, vol.32, pp.540-547. doi: 10.1006/fstl.1999.0594.
18. Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. [Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria]. *LAIT journal*, 2003, vol.83, pp.203-210. doi: 10.1051/laite:2003010.
19. Fonseca F., Beal C., Mihoub F., Marin M., Corrieu G. Improvement of cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 with additives displaying different protective effects]. *International Dairy Journal*, 2003, vol.13, pp.917-926. doi: 10.1016/S0958-6946(03)00119-5.
20. Fuller B., Lane N., Benson E. [Life in the frozen state]. London, CRC Press, 2004, 672 p.
21. Rowley S.D., Anderson G.L. [Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells]. *Bone Marrow Transplant*, 1993, vol.11, no.5, pp.389-393.
22. Catalog of the company Sigma-Aldrich, Inc. «(S)-(-)-1-Phenylethanol» <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/685836>.
23. Агрономов А. Е. *Laboratornye raboty v organicheskom praktikume* [Laboratory work in organic chemistry practice]. Moscow, Khimiya Publ., 1974, 376 p.