

Исследование влияния низких температур на сохранение жизнеспособности штаммов *Streptomyces* в процессе хранения

Т. В. Выборнова^{1,*}, Н. Ю. Шарова^{1,2}, А. А. Принцева^{1,2}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок, 191014, Россия, г. Санкт-Петербург, Литейный проспект, 55

² Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, 49

Дата поступления в редакцию: 06.06.2018
Дата принятия в печать: 20.09.2018

*e-mail: vnipakk55@mail.ru



© Т. В. Выборнова, Н. Ю. Шарова, А. А. Принцева, 2018

Аннотация. Наиболее эффективно хранение микроорганизмов различных таксономических групп при низких температурах от $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. В статье исследовано влияние низких температур ($-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) на жизнеспособность коллекционных штаммов актиномицетов *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 – продуцентов ингибиторов гликозидаз в процессе хранения без криопротектора в 15 % растворе глицерина и в 0,9 % растворе натрия хлорида и биосинтетическую способность в процессе ферментации гидролизатов крахмала. Определен титр (КОЕ в 1 см³ исходного инокулята) и ингибиторная активность по отношению к панкреатической α -амилазе. Выявлено, что штаммы *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* в исходных концентрациях клеток 10^7 и 10^8 КОЕ/см³ сохранили высокий уровень жизнеспособности в течение четырех месяцев хранения в 15 % растворе глицерина и в 0,9 % растворе натрия хлорида при температурах $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Наибольшее количество выживших клеток получено при хранении в 15 % растворе глицерина при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Установлено, что штаммы *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus*, хранившиеся в 15 % растворе глицерина при низких температурах, имеют более высокий уровень ингибиторной активности в культуральной жидкости, чем при хранении в 0,9 % растворе натрия хлорида. Показатель ингибиторной активности был выше у культур, хранившихся в 15 % растворе глицерина при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, и находился на уровне 2600 ± 200 ИЕ/см³. Показано, что низкотемпературное хранение *Streptomyces* не оказывает отрицательного воздействия на жизнеспособность и биосинтетическую активность культур.

Ключевые слова. Штаммы *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734, низкотемпературное хранение, жизнеспособность, ингибиторная активность, титр

Для цитирования: Выборнова, Т. В. Исследование влияния низких температур на сохранение жизнеспособности штаммов *Streptomyces* в процессе хранения / Т. В. Выборнова, Н. Ю. Шарова, А. А. Принцева // Техника и технология пищевых производств. – 2018. – Т. 48, № 3. С. 34–40. DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-3-34-40>.

Original article

Available online at <http://fptt.ru/>

Low-Temperature Storage and the Viability Preservation of *Streptomyces*

T.V. Vybornova^{1,*}, N.Yu. Sharova^{1,2}, A.A. Printseva^{1,2}

¹All-Russian Research Institute for Food Additives, 55, Liteiny Ave., St. Petersburg, 191014, Russia

²Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 49, Kronverksky Ave., St. Petersburg, 197101, Russia

Received: June 06, 2018
Accepted: September 20, 2018

*e-mail: vnipakk55@mail.ru



© T.V. Vybornova, N.Yu. Sharova, A.A. Printseva, 2018

Abstract. The most effective way to store microorganisms of different taxonomic groups is at low temperatures from minus $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ to minus $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. The present research features the influence of low temperature (minus $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $18\text{ }^{\circ}\text{C}$) on the viability of collection strains of actinomycetes *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 and *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734, producers of glycosidase inhibitors. The strains were stored without a cryoprotector in a 15% glycerol solution and 0.9% sodium chloride aqueous liquid. The research objective was to check their ability to keep their inhibitor activity against pancreatic amylase during corn starch hydrolysate fermentation. The experiment made it possible to determine the titer (CFU in 1 cm³ of the initial inoculum) and inhibitory activity

against pancreatic α -amylase. It was revealed that *Streptomyces lucensis* and *Streptomyces violaceus* strains in cell initial concentrations of 107 and 108 CFU/cm³ maintained high viability level during four months conservation in 15% glycerol solution and 0.9% sodium chloride aqueous solution at the temperatures of minus 12 °C and minus 18 °C. Most cells survived at the conservation in a 15% glycerol solution at minus 18 °C. The inhibitor activity level in cultural liquid was higher in *Streptomyces lucensis* and *Streptomyces violaceus* strains kept in 15% glycerol solution at low the temperatures than in those kept in a 0.9% sodium chloride solution. The cultures kept in a 15% glycerol solution at minus 18 °C had higher inhibitor activity indicators 2600 ± 200 IU/cm³. The research proved that low-temperature storage of *Streptomyces* produces no negative effect on the viability and biosynthetic activity of the cultures.

Keywords. Strains of *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 and *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734, low-temperature storage, viability, inhibitory activity, titer

For citation: Vybornova T.V., Sharova N.Yu., and Printseva A.A. Low-Temperature Storage and the Viability Preservation of *Streptomyces*. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2018, vol. 48, no. 3, pp. 34–40. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-3-34-40>.

Введение

Для науки и практики большой интерес представляет поддержание жизнеспособности культур, сохранение стабильности их таксономически важных признаков, а также любых других определенных свойств.

В настоящее время разработаны достаточно эффективные методы долгосрочного хранения большого количества микроорганизмов, обеспечивающие у них сохранение жизнеспособности, генетическую и фенотипическую стабильность. Во всех случаях выбор способа консервирования конкретного объекта основывается на сохранении культурой жизнеспособности, морфологических признаков, физиологических характеристик, биохимической активности и генетической стабильности с учетом максимально возможного времени хранения культуры, а также надежности реализации данного метода консервации и требований по обслуживанию в течение длительного времени.

В большинстве коллекций микроорганизмов используют методы лиофилизации, низкотемпературного замораживания и криоконсервации [1]. Высокий эффект консервации этими методами достигается тем, что клетки, лишаясь свободной воды в условиях субнулевых и/или криогенных температур, переходят в состояние анабиоза [2].

В последние годы для хранения микроорганизмов во все возрастающих масштабах используется низкотемпературная консервация, обеспечивающая сохранение высокого титра клеток, в связи с наличием и доступностью низкотемпературных холодильных установок, способных надежно поддерживать низкие температуры в течение длительного времени.

Для защиты клеток от повреждения при замораживании бактерии суспензируют в специальных веществах – криопротекторах, чаще всего в глицерине и диметилсульфоксиде. Также могут быть использованы сахароза, лактоза, глюкоза, маннит, сорбит, поливинилпирролидон, полигликоль и т. д., которые обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны [3, 4, 5].

В литературе есть данные, что жизнеспособность микроорганизмов значительно повышается, если исходная концентрация клеток в суспензии была высокой (10⁹–10¹¹ КОЕ/см³). Уплотненные суспензии клеток имеют более высокий титр выживания,

чем разбавленные, так как лизированные клетки и клеточные вещества могут выполнять криозащитную роль [6].

Известно, что актиномицеты – продуценты антибиотиков часто сохраняют исходный уровень антибиотической активности при консервации спор на высушенных питательных средах или в почве, а также в лиофилизованном состоянии [7]. Известен способ хранения *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433, *Nonomuraea* Sp. – продуцентов антибиотиков при температуре –70 °C [8].

Коллекционные культуры *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ac-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ac-1734 Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок являются продуцентами ингибиторов гликозидаз – биологически активных веществ и потенциальных пищевых микроингредиентов [9].

Целью работы является исследование влияния низких температур (–12 °C и –18 °C) на выживаемость культур *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ac-1743 и *Streptomyces violaceus* и сохранение ими ингибиторной активности в процессе хранения.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлись два штамма актиномицетов *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus*, селекционированных во ВНИИПД и депонированных во Всероссийской Коллекции Промышленных микроорганизмов под коллекционными номерами ВКПМ Ac-1743 и ВКПМ Ac-1734 [10,11].

Штаммы актиномицетов *Streptomyces* хранились при температурах –12 °C и –18 °C. Закладку на хранение проводили методом смыва со скошенной агаровой крахмалсодержащей среды Чапека. Использовали споровые суспензии с исходными концентрациями 10⁷–10⁸ КОЕ/см³.

В качестве защитного вещества при хранении при низких температурах использовали 15 % раствор глицерина и 0,9 % раствор хлорида натрия (физраствор). Культуры *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* хранили при низких температурах в течение четырех месяцев. В заложенных на хранение культурах определяли титр (КОЕ в 1см³ исходного инокулята) [12].

Процесс восстановления замороженных клеток осуществляли путём быстрого оттаивания при

температуре +37 °С в течение 3 минут и слабым встряхивании. Число жизнеспособных клеток определяли методом посева размороженных культур на чашки Петри с агаровой крахмалосодержащей средой Чапека [12].

Глубинное культивирование *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* проводили на гидролизате кукурузного крахмала периодическим способом в условиях шейкера-инкубатора Multitron (INFORS, Швейцария) в колбах вместимостью 750 см³ со скоростью перемешивания 160 ± 20 оборотов в минуту при температуре +29 ± 1 °С в течение пяти суток [10, 11].

Состав среды для ферментации (г/дм³): гидролизат крахмала с декстрозным эквивалентом ДЕ = 25 ± 5 % – 20; соевая мука – 5,0; натрий хлористый – 3,0; калий фосфорнокислый двузамещенный – 1,0; магний сернокислый семиводный – 0,5; рН 7,0 [13]. Для гидролиза кукурузного крахмала использовали ферментный препарат Амилоsubтиллин Г3х с амилолитической активностью 850 ед/г (ГОСТ 23635-90).

Ингибиторную активность выросших после хранения КОЕ определяли в инактивированных нативных растворах колориметрическим методом по отношению к панкреатической α-амилазе (тест-фермент) [14]. Инактивацию собственной амилазы проводили нагреванием растворов до +98 ± 1 °С. Ингибиторное действие изучали по отношению к панкреатической амилазе («Sigma», США).

Обработку экспериментальных данных проводили с привлечением методов математической статистики и программ Excel XP.

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что при замораживании споровых суспензий штаммов *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 в концентрациях 10⁷–10⁸ КОЕ/см³ клетки исследуемых культур сохранили высокую жизнеспособность после 4 месяцев хранения при температурах –12 °С и –18 °С.

При хранении при температуре –18 °С в 15 % растворе глицерина у обоих штаммов титр клеток сохранился практически на исходном уровне. При

хранении культур при этой же температуре в 0,9 % растворе натрия хлорида число жизнеспособных клеток снижается на 7–10 %. Для *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 титр находился в пределах от 1,48 × 10⁸ до 1,66 × 10⁸ КОЕ/см³, для *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 – от 8,49 × 10⁷ до 8,61 × 10⁷ КОЕ/см³ (табл. 1). Полученные показатели находятся на уровне требований по низкотемпературному хранению бактериальных культур.

Без применения криопротектора штаммы сохраняют свою жизнеспособность в течение 4 месяцев хранения с численностью КОЕ 9,81 × 10⁷ КОЕ/см³ для *Streptomyces lucensis* и 6,35 × 10⁷ КОЕ/см³ для *Streptomyces violaceus*, что составляет 66,3 % и 76,3 % от исходного значения. Количество КОЕ после четырех месяцев хранения также удовлетворяет требованиям для биологических препаратов, содержащих бактерии [5].

Полученные данные свидетельствуют о высокой адаптационной способности сохранению штаммов к понижению температуры и жизнеспособности в стрессовых условиях.

Исследуемые штаммы *Streptomyces* обладают способностью синтезировать ингибиторы свиной панкреатической α-амилазы. Поэтому, помимо исследований по влиянию низких температур на жизнеспособность культур, оценивали их биосинтетическую способность в процессе хранения по показателю «ингибиторная активность».

На протяжении всего периода хранения проводился контроль ингибиторной активности по отношению к панкреатической α-амилазе (тест-фермент).

Результаты настоящего исследования показали, что степень ингибирования панкреатической α-амилазы для исследуемых штаммов независимо от условий хранения (в присутствии криопротектора или в 0,9 % растворе натрия хлорида) находилась в пределах от 10 % до 55 %, что соответствует значению показателя до закладки на хранение.

Ингибиторная активность исследуемых штаммов стрептомицетов, хранившихся в 0,9 % растворе натрия хлорида, была ниже в 1,1–1,2 раза, чем при хранении в 15 % растворе глицерина. Данная

Таблица 1 – Жизнеспособность исследуемых культур *Streptomyces* при хранении при –12 °С и –18 °С

Table 1 – The viability of the cultures of *Streptomyces* during storage at minus 12 °С and minus 18 °С

Название штамма	Наличие криопротектора	Число жизнеспособных клеток, КОЕ/см ³				
		До закладки на хранение	–12 °С		–18 °С	
			через 1 месяц	через 4 месяца	через 1 месяц	через 4 месяца
<i>Streptomyces lucensis</i>	нет	1,48 ± 0,25 × 10 ⁸	9,60 ± 0,87 × 10 ⁷	8,48 ± 0,54 × 10 ⁷	9,81 ± 0,82 × 10 ⁷	8,76 ± 0,33 × 10 ⁷
	15 % р-р глицерина	1,64 ± 0,15 × 10 ⁸	1,48 ± 0,17 × 10 ⁸	1,60 ± 0,22 × 10 ⁸	1,60 ± 0,12 × 10 ⁸	1,66 ± 0,14 × 10 ⁸
			0,9 % раствор натрия хлорида			
		1,62 ± 0,18 × 10 ⁸	1,34 ± 0,12 × 10 ⁸	1,38 ± 0,11 × 10 ⁸	1,46 ± 0,16 × 10 ⁸	1,54 ± 0,13 × 10 ⁸
<i>Streptomyces violaceus</i>	нет	8,32 ± 0,72 × 10 ⁷	5,64 ± 0,60 × 10 ⁷	5,12 ± 0,44 × 10 ⁷	6,00 ± 0,55 × 10 ⁷	6,35 ± 0,24 × 10 ⁷
	15 % р-р глицерина	8,60 ± 0,56 × 10 ⁷	8,51 ± 0,81 × 10 ⁷	8,49 ± 0,35 × 10 ⁷	8,57 ± 0,74 × 10 ⁷	8,61 ± 0,38 × 10 ⁷
			0,9 % раствор натрия хлорида			
		8,55 ± 0,77 × 10 ⁷	8,20 ± 0,53 × 10 ⁷	8,16 ± 0,36 × 10 ⁷	8,24 ± 0,65 × 10 ⁷	8,40 ± 0,52 × 10 ⁷

Таблица 2 – Ингибиторная активность в нативных растворах при низкотемпературном хранении (в конце процесса ферментации)

Table 2 – The inhibitory activity in native solutions during the low-temperature storage (at the end of the fermentation process)

Наименование штамма	до закладки на хранение	Ингибиторная активность, ИЕ/см ³			
		–12 °С		–18 °С	
		1 месяц	4 месяца	1 месяц	4 месяца
<i>Streptomyces lucensis</i>	1640 ± 100	Хранение в 15 % растворе глицерина			
		1600 ± 100	1635 ± 100	1700 ± 100	1780 ± 100
		Хранение в 0,9 % растворе натрия хлорида			
<i>Streptomyces violaceus</i>	2465 ± 100	Хранение в 15 % растворе глицерина			
		2400 ± 100	2390 ± 100	2650 ± 200	2600 ± 200
		Хранение в 0,9 % растворе натрия хлорида			
		2120 ± 100	1975 ± 100	2330 ± 200	2360 ± 100

закономерность наблюдалась в ранее проведенных нами исследованиях по изучению свойств *Streptomyces* в процессе хранения [2]. Глицерин уменьшает концентрацию электролитов, изменяет структуру воды вне клеток, действует на поверхность и проницаемость мембран, тем самым предотвращая нарушение биохимических процессов в клетках микроорганизмов во время замораживания [5].

При температуре хранения –18 °С в 15 % растворе глицерина ингибиторная активность штаммов *Streptomyces* сохранялась на более высоком уровне, чем при –12 °С и составляла для штамма *Streptomyces lucensis* 1780 ± 100 ИЕ/см³, для штамма *Streptomyces violaceus* 2600 ± 100 ИЕ/см³ (табл. 2).

При более резком перепаде температур (с –18 °С на +37 °С) интенсифицируется восстановление биохимических реакций в ответ на стрессовое воздействие. Так, *Streptomyces* 4Alga, выделенный из растительности, произрастающей в Антарктиде, обладает высокой стрессоустойчивостью к пониженным температурам [17]. Культура не только сохраняет жизнеспособность, но и синтезирует амилолитические ферменты с повышенной активностью при температуре культивирования от +5 °С до +20 °С. При температурах +28 °С и +37 °С, близких к оптимуму культивирования стрептомицетов на крахмалсодержащих средах (29 °С), амилолитическая активность была в 1,2–1,5 раза ниже.

После первого пассажа максимальной ингибиторной способностью обладал штамм *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734.

На рисунке 1 представлены значения ингибиторной активности штамма *Streptomyces violaceus*, хранившегося при температурах –12 °С и –18 °С и имеющего наиболее высокий уровень активности ингибитора панкреатической α-амилазы в культуральной жидкости.

Синтез ингибитора начинается на 2 сутки культивирования, достигает максимума на 3–4 сутки, а на 5 сутки происходит значительное уменьшение уровня активности ингибитора. На 1 сутки культивирования активизируется собственная ферментная система актиномицета, происходит

накопление биомассы, сопровождаемое интенсивным потреблением компонентов питательной среды (источников углерода, азота, солей) [13].

Значительное снижение ингибиторной активности на 120 ч культивирования штаммов стрептомицетов обусловлено завершением продуктивного синтеза ингибитора и «старением» культуры. Другим возможным объяснением может быть образование менее активных форм ингибитора. Как было показано в ранее проведенных исследованиях, синтезируемые ингибиторы панкреатической α-амилазы имеют углеводную природу [13]. Поэтому возможен гидролиз углеводных цепей ингибиторов под действием собственных амилаз продуцентов. Подтверждением вышесказанному является подверженность ингибиторов, синтезируемых культурами *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus*, действию глюкоамилазы *Aspergillus niger*. Значения константы Михаэлиса, показывающая сродство в данном случае фермента к синтезируемому ингибитору, как к субстрату, составили соответственно 1,2 ± 0,1 × 10⁻² М и 1,8 ± 0,1 × 10⁻² М [15].

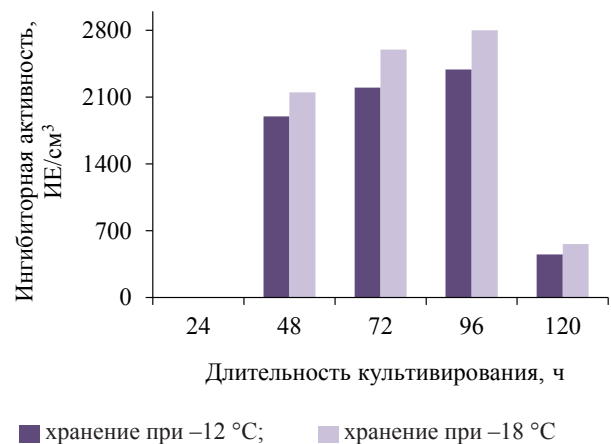


Рисунок 1 – Значения ингибиторной активности *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734, хранившегося при температурах –12 °С и –18 °С в 15 % растворе глицерина, в процессе культивирования

Figure 1 – The values of inhibitory activity of *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734 stored at temperatures of minus 12°C and minus 18°C in a 15% glycerol solution, during cultivation

Как известно, спороформирующие культуры сохраняют высокую жизнеспособность почти при всех методах консервации [16]. Это обусловлено минимальным содержанием в спорах воды. Исследуемые штаммы стрептомицетов являются спорообразующими, что позволяет изначально рассматривать их состояние как естественную форму консервации. Методы непродолжительного хранения культур *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus*, к которым относится хранение клеток в водно-солевом растворе (0,9 % раствор натрия хлорида) при температуре от -10 до -20 °С, позволяют заметно продлить жизнеспособность штаммов и сохранить их биосинтетическую активность. Необходимо определить эти показатели после более длительного периода хранения, так как возможны повреждения клеток в растворах электролитов и генетический обмен между ними, следствием которого является неконтролируемая селекция культуры.

Полученные данные свидетельствуют о том, что низкотемпературное хранение *Streptomyces* не оказывает отрицательного воздействия на жизнеспособность культур и биосинтетическую способность, и позволяют сделать предположение о целесообразности проведения исследований по влиянию более низких температур (-80 °С и -150 °С) на штаммы актиномицетов *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* в процессе хранения.

Выводы

Проведенные исследования показали, что исследуемые штаммы актиномицетов *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* в концентрациях 10^7 – 10^8 КОЕ/см³ сохраняют высокую жизнеспособность и ингибиторную активность при хранении при температурах -12 °С и -18 °С. В качестве защитной среды от повреждения клеток при замораживании для длительного хранения (без пересевов) предпочтительно использование 15 % раствора глицерина. Хранение актиномицетов при температуре -18 °С обеспечивает сохранение ингибиторной активности на более высоком уровне, чем при -12 °С. Данные исследования позволяют разработать условия низкотемпературного хранения культур *Streptomyces* для сохранения коллекционного генофонда микроорганизмов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2018 г. по проекту 163.4.1.

Список литературы

1. Сидякина, Т. М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур / Т. М. Сидякина // Сборник научных трудов «Консервация генетических ресурсов. Методы. Проблемы. Перспективы» / Пушинский научный центр. – Пушкино, 1991. – С. 81–159.
2. Свойства конидий штаммов актиномицетов *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* в процессе хранения при низких температурах / Н. Ю. Шарова, Т. В. Выборнова, А. А. Принцева [и др.] // Пищевые системы. – 2018. – Т. 1, № 3. – С. 27–32. DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2018-1-3-27-32>.
3. Филиппова, С. Н. Многолетнее хранение коллекционных культур актинобактерий / С. Н. Филиппова, Н. А. Сургучева, В. Ф. Гальченко // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 5. – С. 682–690.
4. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов / А. А. Цуцаева, А. Е. Ананьина, Л. М. Балыбердина [и др.] // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 5. – С. 696–700.
5. Чукпарова, А. У. Оценка сохранения жизнеспособности штаммов микроорганизмов при низкотемпературной консервации / А. У. Чукпарова // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов — прошлое, настоящее, будущее» / Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова. – М., 2011. – 131 с.
6. Пат. № 2123044 Российская Федерация, МПК C12N1/04, C12N1/00. Способ длительного хранения естественных симбиотических ассоциаций микроорганизмов человека и животных / Шендеров Б. А., Гахова Э. Н., Манвелова М. А. [и др.]; заявитель и патентообладатель ОАО «Русский йогурт». – № 98103006/13; заявл. 1998-0302; опуб. 10.12.1998.
7. Промышленная микробиология / З. А. Аркадьева, А. М. Безбородов, И. Н. Блохина [и др.]. – М.: Высшая школа, 1989. – 688 с.
8. Хранение культур актинобактерий – представителей родов *Streptomyces* и *Nonomuraea* методом низкотемпературной консервации / О. Н. Синева, Н. Г. Куликова, С. Н. Филиппова [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2014. – Т. 59, № 11–12. – С. 11–15.
9. Sharova, N. Yu. Amylase inhibitors from *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 and *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734 / N. Yu. Sharova // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2015. – Vol. 51, № 1. – P. 58–63. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0003683815010159>
10. Патент № 2346042 Российская Федерация, МПК C12N 1/2.0. Штамм актиномицета *Streptomyces violaceus* – продуцент ингибитора гликозидаз / Шарова Н. Ю., Никифорова Т. А., Позднякова Т. А.; заявитель и патентообладатель ГУ ВНИИПАКК. – № 2006138251/13; заявл. 30.10.2006; опубл. 10.02.2009; Бюл. № 4.
11. Патент № 2355755 Российская Федерация, МПК C 12N 9/24. Штамм актиномицета *Streptomyces lucensis* – продуцент ингибитора гликозидаз / Шарова Н. Ю., Позднякова Т. А., Ходкевич О. А.; заявитель и патентообладатель ГУ ВНИИПАКК. – № 2008101164/13; заявл. 09.01.2008; опубл. 20.05.2009; Бюл. № 14.

12. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. М. : Стандартинформ, 2010.
13. Ходкевич, О. А. Разработка технологии биосинтеза ингибитора α -гликозидаз актиномицетами рода *Streptomyces* и применение комплексной добавки на его основе в хлебопечении: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.07 / Ходкевич Ольга Анатольевна. – СПб, 2009. – 135 с.
14. Акулова, Н. Ю. Ингибиторы α -гликозидаз из *Streptomyces*. Выделение и свойства: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Акулова Наталья Юрьевна. – СПб, 1993. – 22 с.
15. Шарова, Н. Ю. Разработка научных основ новых технологий пищевых добавок и ингредиентов с использованием крахмалсодержащего сырья: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 05.18.07 / Шарова Наталья Юрьевна. – СПб, 2013. – 32 с.
16. Похиленко, В. Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В. Д. Похиленко, А. М. Баранов, К. В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – Т. 12, № 4. – С. 99–121.
17. Screening of polar streptomycetes able to produce cold-active hydrolytic enzymes using common and chromogenic substrates / M. Cotarlet, G. Bahrim, T. Negoita [et al.] // Romanian Biotechnological Letters. – 2008. – Vol. 13, № 5. – P. 69–80.

References

1. Sidiyakina T.M. Konservatsiya mikroorganizmov v kollektsiyakh kul'tur [Preservation of microorganisms in the collections of cultures]. *Sbornik nauchnykh trudov "Konservatsiya geneticheskikh resursov. Metody. Problemy. Perspektivy"* [Collection of scientific Proceedings "Conservation of genetic resources. Methods. Problems. Prospects"]. Pushchino, 1991, pp. 81–159. (In Russ.).
2. Sharova N.Yu., Vybornova T.V., Printseva A.A., and Manzhieva B.S. The properties of the conidia of strains of the actinomycete *Streptomyces lucensis* and *Streptomyces violaceus* during storage at low temperatures. *Food systems*, 2018, vol. 1, no. 3, pp. 27–32. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2018-1-3-27-32>.
3. Filippova S.N., Surgucheva N.A., and Gal'chenko V.F. Long-term storage of collection cultures of actinobacteria. *Microbiology*, 2012, vol. 81, no. 5, pp. 682–690. (In Russ.).
4. Tsutsaeva A.A., Anan'ina A.E., Balyberdina L.M., Stepanyuk L.V., and Pavlenko N.V. Long-term storage of industrial microbial strains. *Microbiology*, 2008, vol. 77, no. 5, pp. 696–700. (In Russ.).
5. Chukparova A.U. Otsenka sokhraneniya zhiznesposobnosti shtammov mikroorganizmov pri nizkotemperaturnoy konservatsii [Evaluation of the viability preservation of microorganism strains during low-temperature conservation]. *Materialy Vserossiyskogo simpoziuma s mezhdunarodnym uchastiem "Biologicheskii aktivnyye veshchestva mikroorganizmov – proshloe, nastoyashchee, budushchee"* [Materials of the All-Russian Symposium with international participation [Biologically active substances of microorganisms – past, present, future]]. Moscow, 2011, p. 131. (In Russ.).
6. Shenderov B.A., Gakhova Eh.N., Manvelova M.A., Piorunskij D.A., and Karnaukhov V.N. *Method of the prolonged storage of natural symbiotic of human and animal microorganism associations*. Patent RF, no. 2123044, 1998.
7. Arkad'eva Z.A., Bezborodov A.M., Blokhina I.N., et al. *Promyshlennaya mikrobiologiya* [Industrial Microbiology]. Moscow: Higher School Publ., 1989. 688 p. (In Russ.).
8. Sineva O.N., Kulikova N.G., Filippova S.N., and Terekhova L.P. Storage of Actinobacteria of the Genera *Streptomyces* and *Nonomuraea* by Low Temperature Preservation. *Antibiotics and Chemotherapy*, 2014, vol. 59, no. 11–12, pp. 11–15. (In Russ.).
9. Sharova N.Yu. Amylase inhibitors from *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 and *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2015, vol. 51, no. 1, pp. 58–63. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0003683815010159>.
10. Sharova N.Yu., Nikiforova T.A., and Pozdnyakova T.A. *Shtamm aktinomitseta Streptomyces violaceus — produtsent ingibitora glikozidaz* [The strain of actinomycete of *Streptomyces violaceus*, an glycosidase inhibitor producer]. Patent RF, no. 2346042, 2009.
11. Sharova N.Yu., Pozdnjakova T.A., and Khodkevich O.A. *Actinomycete strain of Streptomyces lucensis – producer of glycosidase inhibitor*. Patent RF, no. 2355755, 2009.
12. *State Standart 10444.15-94. Food products. Methods for determination of quantity of mesophilic aerobes and facultative anaerobes*. Moscow: Standartinform Publ., 2010.
13. Khodkevich O.A. *Razrabotka tekhnologii biosinteza ingibitora α -glikozidaz aktinomitsetami roda Streptomyces i primeneniye kompleksnoy dobavki na ego osnove v khlebopechenii. Diss. kand. tekhn. nauk* [Development of the biosynthesis technology of α -glycosidase inhibitor by actinomycetes of the genus *Streptomyces* and the use of complex additives in bread making: Cand. Tech. Sci. Dis]. St.Petersburg, 2009. 135 p.
14. Akulova N.Yu. *Ingibitory α -glyukozidaz iz Streptomyces. Vydeleniye i svoystva. Avtoref. dis. kand. biol. nauk* [Inhibitors of α -glucosidase from *Streptomyces*. Allocation and properties: Cand. Biol. Sci. Diss]. St.Petersburg, 1993. 22 p.
15. Sharova N.Yu. *Razrabotka nauchnykh osnov novykh tekhnologiy pishchevykh dobavok i ingredientov s ispol'zovaniem krakhmalsoderzhashchego syr'ya. Avtoref. dis. dokt. biol. nauk* [Development of the scientific foundations for new technologies of food additives and ingredients with starch-containing raw materials: author. Doct. Biol. Sci. Diss]. St.Petersburg, 2013. 32 p.
16. Pokhilenko V.D., Baranov A.M., and Detushev K.V. *Metody dlitel'nogo khraneniya kollektсионnykh kul'tur mikroorganizmov i tendentsii razvitiya* [Methods of long-term storage of collection cultures of microorganisms and the development trends]. *University proceedings. Volga region. Medical sciences*, 2009, vol. 12, no. 4, pp. 99–12. (In Russ.).
17. Cotarlet M., Bahrim G., Negoita T., and Stougaard P. Screening of polar streptomycetes able to produce cold-active hydrolytic enzymes using common and chromogenic substrates. *Romanian Biotechnological Letters*, 2008, vol. 13, no. 5, pp. 69–80.


Выборнова Татьяна Владимировна

научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок, 191014, Россия, г. Санкт-Петербург, Литейный проспект, 55, тел.: +7 (911) 221-57-15, e-mail: vniipakk@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-8862-2212>

Шарова Наталья Юрьевна

д-р техн. наук, профессор РАН, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок, 191014, Россия, г. Санкт-Петербург, Литейный проспект, 55. Профессор факультета пищевых биотехнологий и инженерии, Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, 49, тел.: +7 (921) 340-73-12, e-mail: natalya_sharoval@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-4208-9299>

Принцева Анастасия Андреевна

младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок, 191014, Россия, г. Санкт-Петербург, Литейный проспект, 55. Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, 49, тел.: +7 (962) 703-61-67, e-mail: djkr_yfcnz@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-9455-8202>


Tatyana V. Vybornova

Research scientist of the All-Russian Research Institute for Food Additives, 55, Liteiny Ave., St. Petersburg, 191014, Russia, phone: +7 (911) 221-57-15, e-mail: vniipakk@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-8862-2212>

Natalya Yu. Sharova

Dr.Sci.(Eng.), Professor of the RAS, All-Russian Research Institute for Food Additives, 55, Liteiny Ave., St. Petersburg, 191014, Russia. Professor of the Faculty of Food Biotechnologies and Engineering, Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 49, Kronverksky Ave., St. Petersburg, 197101, Russia, phone: +7 (921) 340-73-12, e-mail: natalya_sharoval@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-4208-9299>

Anastasia A. Printseva

Junior research scientist of the All-Russian Research Institute for Food Additives, 55, Liteiny Ave., St. Petersburg, 191014. Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 49, Kronverksky Ave., St. Petersburg, 197101, Russia, phone: +7 (962) 703-61-67, e-mail: djkr_yfcnz@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-9455-8202>