

УДК/UDC 577.152.54:661.746.5

DOI: 10.21323/2618-9771-2018-1-3-27-32

Оригинальная научная статья

СВОЙСТВА КОНИДИЙ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ *STREPTOMYCES LUCENSIS* И *STREPTOMYCES VIOLACEUS* В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Шарова Н.Ю.^{1,2*}, Выборнова Т.В.¹, Принцева А.А.^{1,2}, Манжиева Б.С.¹¹ Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Санкт-Петербург, Россия² НИУ ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:
штаммы *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734, низкотемпературное хранение, жизнеспособность, ингибиторная активность, пигментообразование

Коллекционные культуры актиномицетов в основном хранят в высушенном состоянии на адсорбентах. Практикуется низкотемпературное хранение актиномицетов при температуре минус 70 °С.

В статье представлены результаты исследований свойств конидий штаммов актиномицетов *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 в процессе хранения при минус 12 °С и минус 18 °С в растворе глицерина и в 0,9 %-ом водном растворе хлорида натрия.

Выявлено, что ингибиторная активность в нативном растворе для исследуемых штаммов, хранившихся в растворе глицерина при минус 12 °С и плюс 4 °С, в результате их последующего культивирования на гидролизате крахмала в течение 120 ч находится на уровне (450 ± 10) ИЕ/см³. Показатель для культур, хранившихся при минус 18 °С, был выше — (560 ± 10) ИЕ/см³. Низкотемпературное хранение конидий в физиологическом растворе менее эффективно. Пигментообразование более активно при культивировании штаммов, хранившихся при минус 18 °С.

Original scientific paper

THE PROPERTIES OF THE CONIDIA OF STRAINS OF THE ACTINOMYCETE *STREPTOMYCES LUCENSIS* AND *STREPTOMYCES VIOLACEUS* DURING STORAGE AT LOW TEMPERATURES

Natalya Yu. Sharova^{1,2*}, Tatyana V. Vybornova¹, Anastasia A. Printseva^{1,2}, Bairta S. Manzhieva¹¹ All-Russian Research Institute for Food Additives — Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS, St. Petersburg, Russia² ITMO University, St. Petersburg, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:
strains of *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 and *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734, low-temperature storage, viability, inhibitory activity, pigment formation

Collection cultures of actinomycetes are mainly stored in a dried state on adsorbents. Practiced low-temperature storage of actinomycetes at minus 70 °С.

The article presents the results of investigations of the properties of the conidia of strains of the actinomycete *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 and *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734 in the process of storage at minus 12 °С and minus 18 °С in glycerin solution and in 0,9 % aqueous sodium chloride solution.

It was found that the inhibitory activity in the native solution for the studied strains stored in the glycerin solution at minus 12 °С and plus 4 °С, as a result of their subsequent cultivation on the starch hydrolyzate for 120 h is at the level of (450 ± 10) IE/cm³. The indicator for crops stored at minus 18 °С was higher (560 ± 10) IE/cm³. Low-temperature storage of conidia in saline solution is less effective. Pigmentation is more active in the cultivation of strains stored at minus 18 °С.

1. Введение

Наиболее эффективно хранение микроорганизмов различных таксономических групп при низких температурах (от минус 12 °С до минус 150 °С) [1]. Длительное хранение клеток, без утраты ценных свойств, проводится путем глубокого замораживания микроорганизмов или их высушивания из замороженного состояния (лиофилизация), либо непосредственно из жидкого состояния (*L*-высушивание). Высокий эффект консервации этими методами достигается тем, что клетки, лишаясь свободной воды в условиях субнулевых и (или) криогенных температур, переходят в состояние анабиоза.

Культуры *Streptomyces* относятся к роду бактерий семейства *Streptomycetaceae* порядка актиномицетов. Согласно международным стандартам, для длительного хранения

бактериальных культур используют криоконсервацию (медленное замораживание при температуре минус 80 °С в присутствии криопротектора).

Коллекция микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок (ВНИИПД) располагает штаммами *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 — продуцентами ингибиторов гликозидаз, которые являются биологически активными веществами и потенциальными пищевыми микроингредиентами [2]. Ранее проведенные во ВНИИПД исследования показали, что штаммы стабильны и сохраняют ингибиторную активность по отношению к панкреатической α -амилазе при температуре хранения плюс 4 °С.

Целью данной работы является исследование жизнеспособности, ингибиторной активности и пигментообразова-

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Шарова Н.Ю., Выборнова Т.В., Принцева А.А., Манжиева Б.С. Свойства конидий штаммов актиномицетов *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* в процессе хранения при низких температурах. *Пищевые системы*. 2018; 1(3): 27–32. DOI: 10.21323/1111-1111-2018-1-3-27-32

FOR CITATION: Sharova N.Yu., Vybornova T.V., Printseva A.A., 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; 1(3): 27–32. (In Russ.) DOI: 10.21323/1111-1111-2018-1-3-27-32

ния у штаммов *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734, хранившихся при температуре минус 12 °С и минус 18 °С в растворе глицерина и в 0,9 %-ом водном растворе хлорида натрия с последующим культивированием культуры на гидролизатах крахмала.

2. Материалы и методы

Объектом исследования являлись селекционированные в институте штаммы *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 — продуценты ингибитора гликозидаз [3, 4].

Штаммы *Streptomyces* хранились при температурах минус 12 °С и минус 18 °С в течение 30 дней. Закладку проводили в 15 %-ном растворе глицерина и в 0,9 %-ном растворе натрия хлорида (физрастворе) смывом со скошенной агаровой среды.

Ферментацию проводили периодическим способом по технологии концентрированных сред в условиях шейкер-инкубатора Multitron (INFORS, Швейцария) в колбах вместимостью 750 см³ при температуре плюс 32 ± 1 °С в течение 120 ч [3,4].

Состав среды, г/дм³: гидролизат крахмала с декстрозным эквивалентом ДЕ = от 20 % до 30 % — 150; соевая мука — 5,0; натрий хлористый — 3,0; магний сернокислый семиводный — 0,5; вода до 1 дм³; рН 7,0 [5].

Процесс восстановления замороженных клеток осуществляли путем оттаивания при температуре плюс 37 °С в течение 3 мин. В размороженных культурах определен титр (КОЕ в 1см³ исходного инокулята).

Жизнеспособность конидий исследовали в результате высева хранившихся при низких температурах клеток на агаровую крахмальную среду (среду Чапека).

Ингибиторную активность определяли в нативном растворе колориметрическим методом по отношению к панкреатической амилазе (тест-фермент) [5]. Перед определением в нативном растворе инактивировали собственную амилазу методом термообработки при плюс 98 ± 1 °С. Ингибиторное действие изучали по отношению к панкреатической амилазе («Sigma», США). Протениназную активность неинактивированного нативного раствора оценивали согласно [6].

Пигментообразование оценивали по оптической плотности нативных растворов при длинах волн от 350 до 700 нм.

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

3. Результаты и обсуждение

Отличительной особенностью актиномицетов является способность к синтезу пигментов, ароматических соединений, БАВ, в частности ингибиторов ферментов. Исследуемые штаммы являются продуцентами ингибитора гликозидаз, поэтому их биосинтетическую активность оценивали по показателю «ингибиторная активность».

Результаты исследований показали, что клетки штаммов *Streptomyces* в концентрациях 10⁷ — 10⁸ КОЕ/см³ сохранили высокую жизнеспособность при замораживании при температуре минус 12 °С и минус 18 °С после 30 дней хранения. Для *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 титр находился в пределах от 8,3 · 10⁷ до 2,5 · 10⁸ КОЕ/см³, для *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 — от 2,96 · 10⁷ до 7,4 · 10⁷ КОЕ/см³.

После первого пассажа максимальной ингибиторной способностью обладал штамм *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743. Степень ингибирования находилась в пределах от 10 % до 55 %, что соответствует показателю до закладки на хранение.

В сравнительном аспекте, в физрастворе активность исследуемых штаммов стрептомицетов была ниже в 1,1–1,2 раза, чем при хранении в глицерине. Имеется предположение, что во время замораживания и оттаивания некоторые виды бактерий разрушаются не в результате сдавливания кристаллами льда, а вследствие воздействия концентрированных растворов электролитов при температурах, превышающих их эвтектические точки [7]. В результате добавления в среду глицерина концентрация электролитов после достижения равновесного состояния со льдом при любой температуре понижается. Глицерин предотвращает повышение концентрации солей до уровня, вызывающего нарушение биохимических процессов в клетках микроорганизмов во время замораживания.

При температуре хранения минус 18 °С ингибиторная активность штаммов сохранялась на более высоком уровне, чем при минус 12 °С, и превышала показатель при плюс 4 °С (Табл. 1).

По-видимому, при более резком перепаде температур (с минус 18 °С на плюс 37 °С) интенсифицируется восстановление биохимических реакций в ответ на стрессовое воздействие. Аналогичный эффект получен при изучении протеолитической активности штаммов (Табл. 1). В процессе ферментации протеолитическая активность возросла и достигала максимального значения в конце биотехнологического процесса. Возможно, штаммы стрептомицетов синтезируют протеиназы для регулирования количества собственной амилазы, конкурирующей с ингибитором в условиях лимитирования процесса по источнику углерода. При оценке ингибиторной активности в неинактивированном нативном растворе наблюдалось увеличение амилолитической активности, обусловленное совместным воздействием собственной амилазы продуцента и панкреатической амилазы, используемой в качестве тест-фермента. В результате ингибиторная активность обнаруживалась только при многократном разбавлении нативного раствора, в результате которого распадался комплекс ингибитор — амилаза.

Поскольку основным критерием оценки жизнедеятельности и биосинтетической способности микроорганизмов является активность их ферментной системы, было изучено влияние температурного режима на протеиназную активность штаммов стрептомицетов.

Таблица 1

Ферментативная и ингибиторная активности нативных растворов в конце процесса (120 ч)

Наименование показателя	ВКПМ Ас-1743			ВКПМ Ас-1734		
	плюс 4 °С	минус 12 °С	минус 18 °С	плюс 4 °С	минус 12 °С	минус 18 °С
Хранение в растворе глицерина						
Ингибиторная активность, ИЕ/см ³	1300 ± 100	1600 ± 100	1800 ± 100	1800 ± 100	2400 ± 100	2800 ± 200
Протеиназная активность, ед/см ³	0,204 ± 0,011	0,204 ± 0,015	0,024 ± 0,002	0,144 ± 0,015	0,144 ± 0,015	0,084 ± 0,008
Хранение в физрастворе						
Ингибиторная активность, ИЕ/см ³	1300 ± 100	1100 ± 100	1600 ± 100	1800 ± 100	2000 ± 100	2300 ± 200
Протеиназная активность, ед/см ³	0,204 ± 0,022	отсутствует	отсутствует	0,052 ± 0,006	0,052 ± 0,005	отсутствует

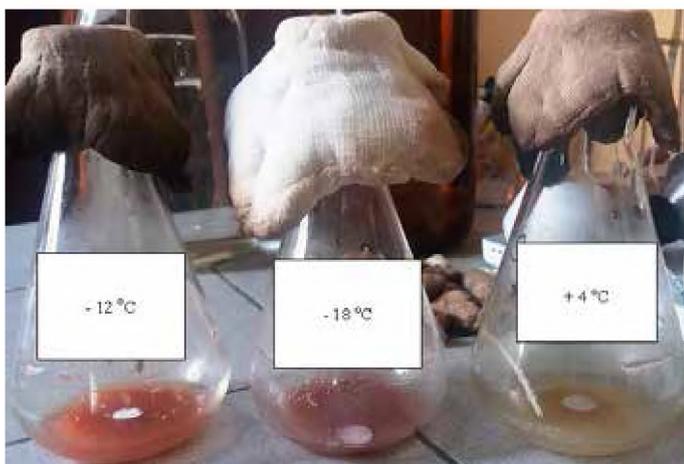


Рис. 1. Штамм *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 культуральная жидкость; 120 ч культивирования конидий, хранившихся при температуре минус 12 °С, минус 18 °С, плюс 4 °С в течение 30 дней

Исследуемые штаммы являются пигментообразующими. При изучении изменчивости культур стрептомицетов отмечено, что при выращивании на агаровых средах изменяется цвет воздушного мицелия, цвет субстратного мицелия остается практически без изменений. После первого пассажа на агаровую среду пигмент воздушного мицелия имел белый с сероватым оттенком цвет для обоих исследуемых штаммов, а субстратный — светло-желтый для *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743, розовый — для *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734, светло-коричневый для других культур (Рис. 1). В течение семи суток культивирования на агаровой среде интенсивность пигментации у штаммов усилилась, что свидетельствует об активизации биохимических процессов, связанных с адаптацией культур в стрессовых ситуациях. После хранения культур при низких температурах минус 12 °С и минус 18 °С в течение 30 дней наблюдалось более интенсивное пигментообразование (Рис. 1). Возможно, воздействие экстремальных температур приводит к частичной деструкции белков, продукты которой являются субстратом для тирозиназы, катализирующей окисление фенолов (например, тирозина) и катализирующей синтез меланина и других пигментов из их предшественника тиро-

зина [8]. Не исключено, что более интенсивное пигментообразование у культуры *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 обусловлено более высокой активностью тирозиназы по сравнению со штаммом *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743. Как следствие интенсивно пигментированный штамм *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 более устойчив к температурным изменениям. Штамм более устойчив к воздействию кислорода воздуха при глубинной ферментации в интенсивном режиме воздухоснабжения. Эффект более выражен при культивировании клеток после низкотемпературного хранения, что возможно обусловлено накоплением меланина — сильного антиоксиданта. Полученные спектральные кривые поглощения свидетельствует о максимуме поглощения света компонентами нативного раствора в интервале длин волн от 450 до 600 нм. В сравнительном аспекте пигментообразование при культивировании штаммов, хранившихся в физрастворе, независимо от температуры (минус 12 °С или минус 18 °С) было более интенсивное. Возможно, это обусловлено тем, что хлорид натрия усиливает диффузионные процессы через клеточную мембрану, в том числе и экскрецию пигментов.

Таким образом, исследуемые штаммы *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 сохранили высокую жизнеспособность при замораживании при температуре минус 12 °С и минус 18 °С и хранении в течение 30 дней. Более предпочтительным криопротектором, обеспечивающим практически 100 %-ное сохранение ингибиторной активности является глицерин.

4. Заключение

Исследуемые штаммы стрептомицетов сохраняют жизнеспособность и биосинтетическую активность при низких температурах. Для длительного хранения предпочтительна температура минус 18 °С. Защитное действие клеточной структуры штаммов в большей мере обеспечивается глицерином. Активизация ферментной системы стрептомицетов интенсифицируется при более резком перепаде температур. Дальнейшее изучение влияния низких температур на свойства стрептомицетов — продуцентов ингибиторов амилолитических ферментов представляет интерес и в перспективе дает возможность скорректировать условия длительного хранения коллекционных культур.

1. Introduction

Storage of microorganisms of different taxonomic groups at low temperatures (from minus 12 °C to minus 150 °C) is most effective [1]. Long-term storage of cells without loss of valuable properties is carried out by deep freezing of microorganisms or their drying from the frozen state (lyophilization), or directly from the liquid state (L-drying). High conservation effect of these methods is achieved by the fact that the cells, losing free water in sub-zero and (or) cryogenic temperatures, go into a state of suspended animation.

Cultures of *Streptomyces* belong to the genus of bacteria of the family *Streptomycetaceae* of the order of actinomycetes. According to international standards, cryopreservation is used for long — term storage of bacterial cultures (slow freezing at a temperature of minus 80 °C in the presence of a cryoprotector).

Collection of microorganisms all-Russian scientific research Institute of food additives (VNIIPD) has strains of *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 and *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 — producers of the inhibitor field of glycosidase inhibition, which are biologically active substances and potential food microingredients [2]. Previously held in VNIIPD studies have

shown that the strains are stable and retain inhibitory activity against pancreatic α -amylase at a storage temperature of plus 4 °C.

The aim of this work is to study the viability, inhibitory activity and pigment formation in strains of *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 and *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734, stored at a temperature of minus 12 °C and minus 18 °C in a glycerol solution and 0,9 % aqueous solution of sodium chloride, followed by the cultivation of cultures on starch hydrolysates.

2. Materials and Methods

The object of the study was the selection at the Institute strains of *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 and *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 — producers of the inhibitor field of glycosidase inhibition [3, 4].

Strains of *Streptomyces* were stored at temperatures of minus 12 °C and minus 18 °C for 30 days. The tab was carried out in a 15 % glycerin solution and in a 0,9 % sodium chloride solution (saline solution) by washing off the beveled agar medium.

Fermentation was carried out periodically using the technology of concentrated media under the conditions of the

shaker incubator Multitron (INFORS, Switzerland) in flasks with a capacity of 750 cm³ at a temperature of plus 32±1 °C for 120 h [3, 4].

The composition of the medium, g/dm³: starch hydrolysate with dextrose equivalent DE = from 20 % to 30 % – 150; soy flour – 5,0; sodium chloride – 3,0; magnesium sulfate – 0,5; water to 1 dm³; pH 7,0 [5].

The process of restoration of frozen cells was carried out by thawing at a temperature of plus 37 °C for 3 minutes in thawed cultures, a titer (CFU in 1 cm³ of the original inoculate) was determined.

Viability of conidia was investigated as a result of seeding of cells stored at low temperatures on agar starch medium (Chapek medium).

Inhibitory activity was determined in native solution by colorimetric method with respect to pancreatic amylase (test enzyme) [5]. Before determining the native solution was inactivated own amylase by the method of heat treatment at plus 98±1 °C. Inhibitory effect was studied in relation to pancreatic amylase («Sigma», USA). Proteinase activity of the noninactivated native solution was evaluated according to [6].

Pigment formation was assessed by the optical density of native solutions at wavelengths from 350 to 700 nm.

Processing of experimental data was carried out with involvement of mathematical statistics methods and Excel XP.

3. Results and discussion

A distinctive feature of actinomycetes is the ability to synthesize pigments, aromatic compounds, BAS, in particular enzyme inhibitors. The investigated strains are the producers of the inhibitor field of glycosidase inhibition, so their biosynthetic activity was evaluated by the measure of the «inhibitory activity».

The results showed that the cells of *Streptomyces* strains in concentrations of 107–108 CFU/cm³ retained high viability during freezing at a temperature of minus 12 °C and minus 18 °C after 30 days of storage. For *Streptomyces lucensis* VKPM Ac–1743 titer was in the range from 8.3·10⁷ to 2.5·10⁸ CFU/cm³, for *Streptomyces violaceus* VKPM Ac–1734 – from 2.96·10⁷ to 7.4·10⁷ CFU/cm³.

After the first passage, the strain *Streptomyces lucensis* Ac–1743 had the maximum inhibitory capacity. The degree of inhibition was in the range from 10 % to 55 %, which corresponds to the index prior to storage.

In the comparative aspect, in the saline activity of the studied strains of streptomycetes was 1,1–1,2 times lower than when stored in glycerin. There is an assumption that during freezing and thawing some types of bacteria are destroyed not as a result of compression by ice crystals, but as a result of the action of concentrated electrolyte solutions at temperatures exceeding their eutectic points [7]. As a result of the addition of glycerin to the medium, the concentration of electrolytes after reaching the equilibrium state with ice at any temperature decreases. Glycerin prevents the increase of salt concentration to the level

that causes disturbance of biochemical processes in the cells of microorganisms during freezing.

At a storage temperature of minus 18 °C inhibitory activity of strains remained at a higher level than at minus 12 °C, and exceeded at plus 4 °C (Table 1).

Apparently, with a sharper temperature drop (from minus 18 °C to plus 37 °C), the recovery of biochemical reactions in response to stress is intensified. A similar effect was obtained in the study of proteolytic activity of strains (Table. 1). In the process of fermentation, proteolytic activity increased and reached its maximum value at the end of the biotechnological process. Perhaps the strains of streptomycetes synthesize proteinases to regulate the amount of its own amylase, competing with the inhibitor in terms of limiting the process by carbon source. When assessing the inhibitory activity in the non-inactivated native solution, an increase in amylolytic activity was observed due to the combined effect of the producer's own amylase and pancreatic amylase used as a test enzyme. As a result, inhibitory activity was detected only with repeated dilution of the native solution, which resulted in the disintegration of the inhibitor – amylase complex.

Since the main criterion for assessing the life and biosynthetic ability of microorganisms is the activity of their enzyme system, the effect of temperature on the proteinase activity of streptomycetes strains was studied.

The studied strains are pigment-forming. When studying the variability of streptomycetes cultures, it was noted that the color of the air mycelium changes when grown on agar media, the color of the substrate mycelium remains virtually unchanged. After the first passage on the agar medium, the pigment of the air mycelium had a white with a grayish tint color for both studied strains, and the substrate – light yellow for *Streptomyces lucensis* Ac–1743, pink-for *Streptomyces violaceus* Ac–1734, light brown for other cultures (Figure 1). Within seven days of cultivation on agar medium, the intensity of pigmentation in strains increased, which indicates the activation of biochemical processes associated with the adaptation of cultures in stressful situations. After storage of crops at low temperatures minus 12 °C and minus 18 °C for 30 days, more intense pigment formation was observed (Figure 1). Perhaps, the influence of extreme temperatures leads to partial destruction of proteins, the products of which are a substrate for tyrosinase, catalyzing oxidation of phenols (for example, tyrosine) and catalyzing the synthesis of melanin and other pigments from their precursor tyrosine [8]. It is possible that the more intense pigment formation in the culture of *Streptomyces violaceus* Ac–1734 is due to the higher activity of tyrosinase compared to the strain of *Streptomyces lucensis* Ac–1743. As a result, the intensively pigmented strain of *Streptomyces violaceus* Ac–1734 is more resistant to temperature changes. The strain is more resistant to air oxygen during deep fermentation in the intensive mode of air supply. The effect is more pronounced in the cultivation of cells after low-temperature storage, which may be due to the accumulation of melanin – a strong antioxidant. The obtained spectral

Table 1

Enzymatic and inhibitory activity of native solutions at the end of the process (120 h)

Name indicator's	VKPM Ac–1743			VKPM Ac–1734		
	plus 4 °C	minus 12 °C	minus 18 °C	plus 4 °C	minus 12 °C	minus 18 °C
Storage in glycerin solution						
Inhibitory activity, IE/cm ³	1300±100	1600±100	1800±100	1800±100	2400±100	2800±200
Proteinase activity, u/cm ³	0,204±0,011	0,204±0,015	0,024±0,002	0,144±0,015	0,144±0,015	0,084±0,008
Storage in saline						
Inhibitory activity, IE/cm ³	1300±100	1100±100	1600±100	1800±100	2000±100	2300±200
Proteinase activity, u/cm ³	0,204±0,022	absent	absent	0,052±0,006	0,052±0,005	absent

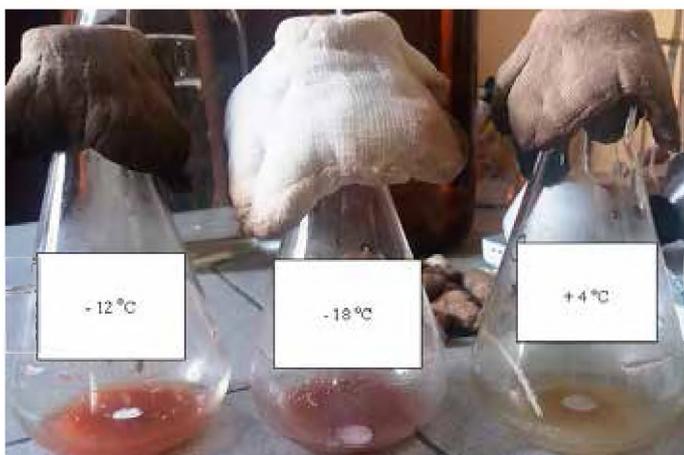


Figure 1. Strains of *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 culture fluid; 120 h cultivation of clonidia, stored for 30 days at temperature minus 12 °C, minus 18 °C, plus 4 °C

absorption curves indicate the maximum absorption of light by the components of the native solution in the wavelength range from 450 to 600 nm. In the comparative aspect, pigment forma-

tion during the cultivation of strains stored in saline solution, regardless of temperature (minus 12 °C or minus 18 °C) was more intense. Perhaps this is due to the fact that sodium chloride enhances diffusion processes through the cell membrane, including the excretion of pigments.

Thus, the studied strains of *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 and *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734 retained high viability when frozen at minus 12 °C and minus 18 °C and stored for 30 days. Glycerin is a more preferable cryoprotector providing almost 100 % preservation of inhibitory activity.

4. Conclusion

The studied strains of streptomycetes retain viability and biosynthetic activity at low temperatures. For long-term storage, the preferred temperature is minus 18 °C. The protective effect of the cell structure of the strains is largely provided by glycerin. Activation of the enzyme system of *Streptomyces intensifitsiruetsa* when more drastic temperature difference. Further study of the effect of low temperatures on the properties of streptomycetes — producers of inhibitors of amylolytic enzymes is of interest and in the future makes it possible to adjust the conditions of long-term storage of collection cultures.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Похиленко, В.Д., Баранов, А.М., Детушев К.В. (2009). Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. Обзор литературы. *Медицинские науки*, 4(12), 101–121.
2. Sharova, N. Yu. (2015). Amylase inhibitors from *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 and *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 58(1), 58–63.
3. Патент № 2346042. Штамм актиномицета *Streptomyces violaceus* — продуцент ингибитора гликозидаз / Шарова Н.Ю., Никифорова Т.А., Позднякова Т.А. Оpubл. 10.02.2009, Бюл. № 4.
4. Патент № 2355755. Штамм актиномицета *Streptomyces lucensis* — продуцент ингибитора гликозидаз / Шарова Н.Ю., Позднякова Т.А., Ходкевич О.А. Оpubл. 20.05.2009, Бюл. № 14.
5. Рухляева, А.П., Полягина Г.В. (1981). Методы определения гидролитических ферментов. М, Легкая промышленность. — 288 с.
6. Шарова, Н.Ю. (2013). Разработка научных основ новых технологий пищевых добавок и ингредиентов с использованием крахмалсодержащего сырья. Диссертация доктора техн. наук. Санкт-Петербург, НИУ ИТМО. — 533 с.
7. Синева, О.Н., Куликова Н.Г., Филиппова С.Н., Терехова Л.П. (2014). Хранение культур актинобактерий — представителей родов *Streptomyces* и *Nonomuraea* методом низкотемпературной консервации. *Антибиотики и химиотерапия*, 59, 11–12.
8. Мамаева, Н.Ю. (2001). Исследование процесса пигментации микромицетами бумаги и полимерных композитов на ее основе. Диссертация кандидата биол. наук. Санкт-Петербург, Санкт-Петербургский технологический институт. — 163 с.

REFERENCES

1. Pokhilenko, V., Baranov, A., Detushev K. V. (2009). Methods of long-term storage of collection cultures of microorganisms and trends. Literature review. *Medical Sciences*, 4(12), 101 – 121. (in Russian)
2. Sharova, N. Yu. (2015). Amylase inhibitors from *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 and *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 58(1), 58–63.
3. Patent No. 2346042. The actinomycetes strain *Streptomyces violaceus* — producer inhibitor field of glycosidase inhibition / Sharova N. Yu., Nikiforova T. A., Pozdnyakova T. A. Publ. 10.02.2009, bul. No. 4. (in Russian)
4. Patent No. 2355755. The actinomycetes strain *Streptomyces lucensis* — producer inhibitor field of glycosidase inhibition / Sharova N. Yu., Pozdnyakova T. A., Chodkiewicz O. A. Publ. 20.05.2009, Byul. No. 14. (in Russian)
5. Rukhledev, A. P., Polyhaline G. V. (1981). Methods for determination of hydrolytic enzymes. M, Light industry. — 288 p. (in Russian)
6. Sharova, N. Yu. (2013). Development of scientific bases of new technologies of food additives and ingredients using starch-containing raw materials. Thesis of Dr. eng. sciences'. St. Petersburg, NRU ITMO. — 533 p. (in Russian)
7. Sineva, O. N., Kulikova N. G., Filippova S. N., Terekhova L. P. (2014). Storage of cultures of actinobacteria-representatives of the genera *Streptomyces* and *Nonomuraea* by low-temperature preservation. *Antibiotics and chemotherapy*, 59, 11–12. (in Russian)
8. Mamaeva, N. Yu. (2001). Investigation of the process of pigmentation with micromycetes of paper and polymer composites based on it. Thesis of candidate of Biol. sciences'. St. Petersburg, St. Petersburg Institute of technology. — 163 p. (in Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
<p align="center">Принадлежность к организации</p> <p>Шарова Наталья Юрьевна — доктор технических наук, профессор РАН, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, НИУ ИТМО 191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55 Тел.: +7-921-340-73-12 E-mail: natalya_sharova1@mail.ru *автор для контактов</p>	<p align="center">Affiliation</p> <p>Natalya Yu. Sharova — doctor of technical sciences, professor of the Russian Academy of Sciences, All-Russian Research Institute for Food Additives — Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, ITMO University 191014, St. Petersburg, Liteyny prospect, 55 Тел.: +7-921-340-73-12 E-mail: natalya_sharova1@mail.ru *corresponding author</p>
<p>Выборнова Татьяна Владимировна — научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55 Тел.: +7-911-221-57-15 E-mail: vniipakk@mail.ru</p>	<p>Tatyana V. Vybornova — research scientist, All-Russian Research Institute for Food Additives — Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 191014, St. Petersburg, Liteyny prospect, 55 Tel.: +7-911-221-57-15 E-mail: vniipakk@mail.ru</p>
<p>Принцева Анастасия Андреевна — младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, НИУ ИТМО 191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55 Тел.: +7-962-703-61-67 E-mail: djkr_yfcnz@mail.ru</p>	<p>Anastasia A. Printseva — junior research scientist, All-Russian Research Institute for Food Additives — Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, ITMO University 191014, St. Petersburg, Liteyny prospect, 55 Tel.: +7-962-703-61-67 E-mail: djkr_yfcnz@mail.ru</p>
<p>Манжиева Байрга Саналовна — младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55 Тел.: +7-950-042-15-44 E-mail: bmanzhieva@gmail.com</p>	<p>Bairta S. Manzhieva — junior research scientist, All-Russian Research Institute for Food Additives — Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 191014, St. Petersburg, Liteyny prospect, 55 Tel.: +7-950-042-15-44 E-mail: bmanzhieva@gmail.com</p>
<p align="center">Критерии авторства</p> <p>Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат</p>	<p align="center">Contribution</p> <p>Authors are equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism</p>
<p align="center">Конфликт интересов</p> <p>Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов</p>	<p align="center">Conflict of interest</p> <p>The authors declare no conflict of interest</p>
<p align="center">Поступила 05.09.2018</p>	<p align="center">Received 05.09.2018</p>