
Научная статья/Research Article

УДК 663.15

DOI: 10.36718/1819-4036-2024-2-260-267

Софья Владимировна Овсянкина^{1✉}, Сергей Витальевич Хижняк²,
Полина Александровна Аболенцева³, Яна Викторовна Смольникова⁴,
Елена Николаевна Олейникова⁵

^{1,2,3,4,5}Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия

¹sofi-kras@mail.ru

²skhizhnyak@yandex.ru

³polina18.ti@gmail.com

⁴ya104@yandex.ru

⁵ovn@kgau.ru

УСТОЙЧИВОСТЬ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ АМИЛАЗЫ *ALTERNARIA TENUISSIMA* И *GEOMYCES PANNORUM* К ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Цель исследования – проверка возможности лиофилизации штаммов *Alternaria tenuissima* и *Geomyces pannorum*, выделенных авторами в качестве потенциальных продуцентов амилазы для пищевой промышленности. Конидии изучаемых штаммов суспендировали в защитных средах и лиофилизировали с помощью лиофилизатора Bio-Rus-4SFD. Использовали три защитные среды: стандартный желатин-сахарозный агар (сахароза 10 %, желатин 1,5, агар 0,01 %), рекомендованный Всероссийской коллекцией микроорганизмов; желатин-сахарозный агар с добавлением 1 % аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта; пептон-сахарозо-глицериновая смесь, разработанная авторами (вода дистиллированная 90 мл, глицерин 10 мл, сахароза 10 г, пептон 3,2 г). Контролем служили конидии, суспендированные в дистиллированной воде без лиопротекторов. Жизнеспособность лиофилизированных конидий оценивали по их способности к прорастанию на агаризованной культуральной среде. Выживаемость конидий *G. pannorum* при лиофилизации во всех вариантах, за исключением контроля, была статистически значимо ($p < 0,001$) выше, чем выживаемость конидий *A. tenuissima*. Жизнеспособность лиофилизированных конидий *A. tenuissima* не зависела от использования защитных сред и составила в контрольном варианте 75,9 %, в варианте с желатин-сахарозным агаром 76,4 %, в варианте с пептон-сахарозо-глицериновой смесью 77,1 %. Жизнеспособность лиофилизированных конидий *G. pannorum* без использования защитных сред составила 82,0 %, в варианте с желатин-сахарозным агаром 95,3 %, в варианте с пептон-сахарозо-глицериновой смесью 88,1 %. Добавление в защитную среду аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта привело к статистически значимому ($p < 0,001$) снижению доли выживших при лиофилизации конидий *A. tenuissima* до 7,2 %, а доли выживших конидий *G. pannorum* до 44,4 %.

Ключевые слова: амилаза, *Alternaria tenuissima*, *Geomyces pannorum*, лиофилизация, защитные среды

Для цитирования: Устойчивость потенциальных продуцентов амилазы *Alternaria tenuissima* и *Geomyces pannorum* к лиофилизации / С.В. Овсянкина [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2024. № 2. С. 260–267. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-2-260-267.

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в рамках темы «Конструирование защитных сред высушивания и разработка режимов лиофилизации пробиотических и почвенных микроорганизмов».

Sofya Vladimirovna Ovsyankina^{1✉}, Sergey Vitalievich Khizhnyak²,
Polina Aleksandrovna Abolentseva³, Yana Viktorovna Smolnikova⁴, Elena Nikolaevna Oleynikova⁵

^{1,2,3,4,5}Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, Russia

¹sofi-kras@mail.ru

²skhizhnyak@yandex.ru

³polina18.ti@gmail.com

⁴ya104@yandex.ru

⁵ovn@kgau.ru

RESISTANCE OF POTENTIAL AMYLASE PRODUCERS *ALTERNARIA TENUISSIMA* AND *GEOMYCES PANNORUM* TO LYOPHILIZATION

The purpose of the study is to test the possibility of lyophilization of *Alternaria tenuissima* and *Geomyces pannorum* strains, identified by the authors as potential amylase producers for the food industry. Conidia of the studied strains were suspended in protective media and lyophilized using a Bio-Rus-4SFD lyophilizer. Three protective media were used: standard gelatin-sucrose agar (sucrose 10 %, gelatin 1.5, agar 0.01 %), recommended by the All-Russian Collection of Microorganisms; gelatin-sucrose agar with the addition of 1 % ascorbic acid as an antioxidant; peptone-sucrose-glycerol mixture developed by the authors (distilled water 90 ml, glycerin 10 ml, sucrose 10 g, peptone 3.2 g). Conidia suspended in distilled water without lyoprotectors served as a control. The viability of lyophilized conidia was assessed by their ability to germinate on an agar culture medium. The survival rate of *G. pannorum* conidia during lyophilization in all variants, with the exception of the control, was statistically significantly ($p < 0.001$) higher than the survival rate of *A. tenuissima* conidia. The viability of lyophilized conidia of *A. tenuissima* did not depend on the use of protective media and amounted to 75.9 % in the control variant, 76.4 % in the variant with gelatin-sucrose agar, and 77.1 % in the variant with peptone-sucrose-glycerol mixture. The viability of lyophilized conidia of *G. pannorum* without the use of protective media was 82.0 %, in the variant with gelatin-sucrose agar 95.3 %, in the variant with peptone-sucrose-glycerol mixture 88.1 %. The addition of ascorbic acid as an antioxidant to the protective medium led to a statistically significant ($p < 0.001$) decrease in the proportion of *A. tenuissima* conidia surviving during lyophilization to 7.2 %, and the proportion of *G. pannorum* conidia surviving to 44.4 %.

Keywords: amylase, *Alternaria tenuissima*, *Geomyces pannorum*, lyophilization, protective media

For citation: Resistance of potential amylase producers *Alternaria tenuissima* and *Geomyces pannorum* to lyophilization / S.V. Ovsyankina [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2024;(2): 260–267 (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-2-260-267.

Acknowledgments: the work has been carried out with the financial support of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation within the framework of the topic "Design of protective drying media and development of lyophilization regimes for probiotic and soil microorganisms".

Введение. Одними из наиболее востребованных ферментов микробного происхождения, применяемых в пищевой и перерабатывающей промышленности, а также в сельском хозяйстве, являются амилазы, на долю которых приходится около 25 % мирового рынка ферментов. Микробные амилазы применяют для конверсии крахмала в олигосахариды и в глюкозу в бродильных и крахмало-паточных производствах, для отбеливания сырья в бумажном и текстильном производствах, в качестве биодобавок к моющим средствам, а также в качестве добавок в крах-

малсодержащие корма в птицеводстве и животноводстве для повышения их усвояемости [1–3].

Несмотря на обилие амилолитических штаммов, применяемых в промышленности, постоянно идет поиск новых, в т. ч. нетрадиционных, продуцентов микробных амилаз. В качестве одного из перспективных продуцентов амилолитических ферментов рассматриваются грибы р. *Alternaria* [4–6]. Другим перспективным продуцентом, позволяющим осуществлять процесс при пониженной температуре, являются выделенные из пещер низкотемпературные амилолитические штаммы *Geomyces pannorum* [7, 8].

Использование штаммов в биотехнологических процессах невозможно без сохранения их исходных вариантов в микробиологических коллекциях. Общеизвестным наиболее надежным способом такого сохранения считается их сублимационное высушивание из замороженного состояния (лиофилизация) [9,10]. Главной проблемой при лиофилизации является возможная гибель микробных клеток в процессе замораживания и высушивания. Для преодоления этой проблемы используют разнообразные эмпирически подбираемые защитные среды, повышающие долю выживших при лиофилизации клеток [11].

Цель исследований – изучение возможности лиофилизации выделенных авторами в ходе предыдущих исследований амилолитических штаммов *Alternaria tenuissima* K22 и *Geomyces pannorum* VKM F-4777D.

Задачи: проверка возможности сохранения жизнеспособности штаммов при лиофилизации без использования защитных сред, с использованием стандартных защитных сред; выбор за-

щитной среды, обеспечивающей максимальное сохранение жизнеспособности исследуемых штаммов при лиофилизации.

Объекты и методы. Объектами исследования служили выделенные авторами штаммы *Alternaria tenuissima* K22 и *Geomyces pannorum* VKM F-4777D. Штамм *Alternaria tenuissima* K22 выделен из инфицированного зерна яровой пшеницы, штамм *G. pannorum* VKM F-4777D выделен из грунта карстовой пещеры Караульная-2 и запатентован в качестве низкотемпературного продуцента амилазы [12]. Оба штамма характеризуются высокой амилолитической активностью (рис. 1).

Конидии изучаемых штаммов суспендировали в одной из защитных сред, после чего лиофилизовали в лиофильной сушилке Bio-Rus-4SFD в следующем режиме: замораживание при $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 ч; основная сушка при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 ч при давлении 60 Па; вторичная сушка с шагом от 5 до $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ при давлении 80 Па в течение 5 ч [13, 14].

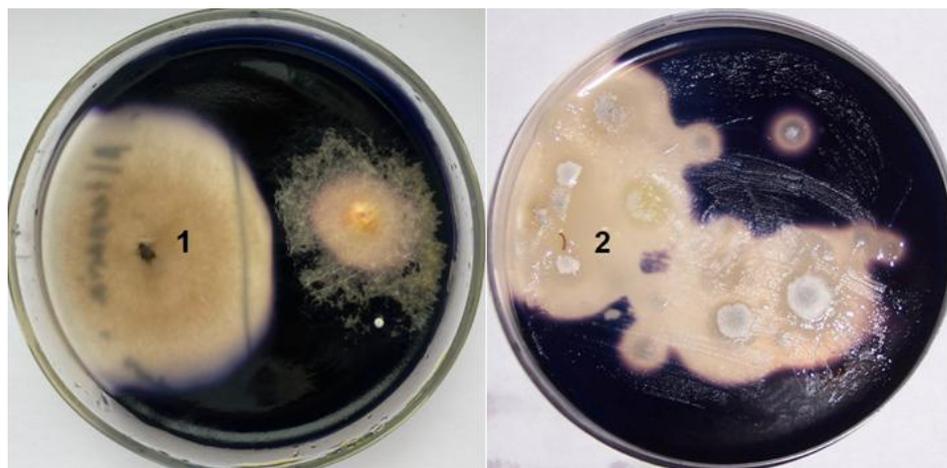


Рис. 1. Амилолитическая активность изучаемых штаммов:
1 – *A. tenuissima* K22; 2 – *G. pannorum* VKM F-4777D

В качестве защитных сред использовали сахарозо-желатиновый агар (среду Файбича) [15, 16] с 1 % аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта [17] и разработанную авторами пептон-сахарозо-глицериновую среду следующего состава: пептон ферментативный сухой – 3,2 г; сахара – 10 г; глицерин – 10 мл; вода дистиллированная – 90 мл. Контролем служили конидии, суспендированные в дистиллированной воде без добавления лиопротекторов.

Жизнеспособность конидий после лиофилизации определяли прямым методом по их способности к прорастанию на агаризованной питательной среде (рис. 2).

Долю выживших конидий определяли как отношение числа конидий, сформировавших проростковые гифы, к общему числу конидий. Среднее число конидий, просмотренных в каждом варианте на предмет наличия проростковых гиф, составило 168 шт. для *A. tenuissima* K22 и 282 шт. для *G. pannorum* VKM F-4777D.

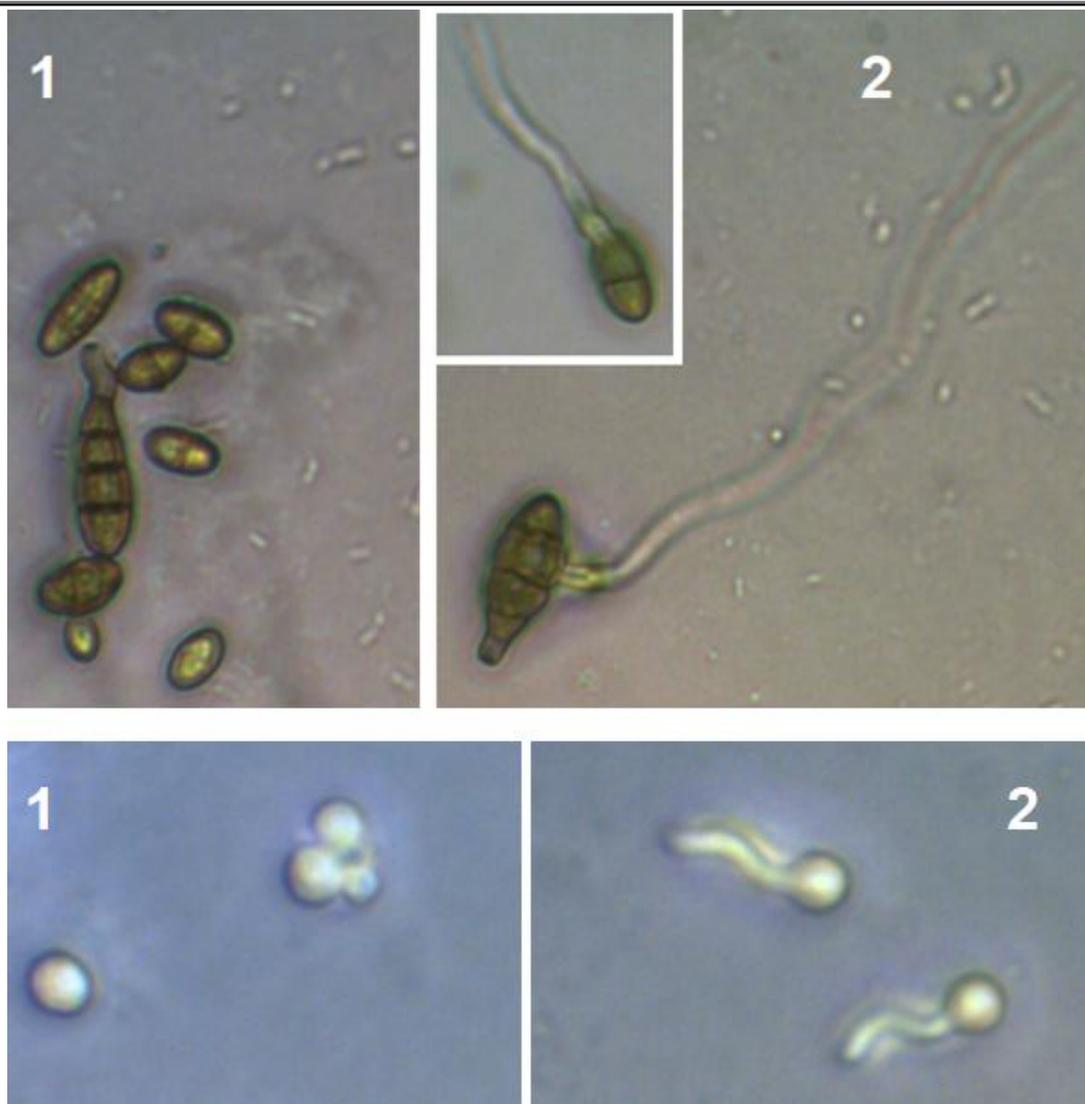


Рис. 2. Примеры непроросших (1) и проросших (2) конидий изучаемых штаммов: верхние фотографии – *A. tenuissima* K22, нижние фотографии – *G. pannorum* VKM F-4777D

Статистическую значимость различий между контрольным вариантом и вариантами с защитными средами по доле проросших конидий проверяли точным тестом Фишера для таблиц 2×2 с использованием Graph Pad Quick Calcs в качестве программного обеспечения.

Результаты и их обсуждение. Выживаемость конидий *A. tenuissima* K22 в контроле (без использования защитной среды) составила 75,9 %. Использование защитной среды Файбича и пептон-сахарозо-глицериновой среды не привело к статистически значимому изменению доли выживших конидий, которая составила 76,4 % для среды Файбича и 77,1 % для пептон-сахарозо-глицериновой среды. Введение аскорбиновой кислоты в среду Файбича привело к

статистически значимому ($p < 0,001$) снижению доли выживших конидий – до 7,2 % (рис. 3).

Выживаемость конидий *G. pannorum* VKM F-4777D в контроле (без использования защитной среды) составила 82,0 %. Использование защитной среды Файбича привело к статистически значимому ($p < 0,001$) увеличению доли выживших конидий до 95,3 %. Пептон-сахарозо-глицериновая среда также статистически значимо ($p < 0,05$) увеличила долю выживших конидий до 88,1 %. Как и в случае с *A. tenuissima* K22, введение аскорбиновой кислоты в среду Файбича привело к статистически значимому ($p < 0,001$) снижению доли выживших конидий *G. pannorum* VKM F-4777D (до 44,4 %) (рис. 4).



Рис. 3. Прорастание лиофилизированных конидий *A. tenuissima* K22 в разных вариантах эксперимента



Рис. 4. Прорастание лиофилизированных конидий *G. raphanum* VKM F-4777D в разных вариантах эксперимента

В целом по эксперименту выживаемость конидий *G. pannorum* при лиофилизации во всех вариантах, за исключением контроля, была ста-

тистически значимо ($p < 0,001$) выше, чем выживаемость конидий *A. tenuissima* (табл.).

Различия между проращением конидий *A. tenuissima* K22 и *G. pannorum* ВКМ F-4777D в разных вариантах эксперимента

Вариант защитной среды	Различие		Статистическая значимость различий	
	раз	процентных пунктов	p двустороннее	p одностороннее
Контроль без лиопротекторов	1,08	6,1	0,1320	0,0691
Среда Файбича	1,25	18,9	< 0,0001	< 0,0001
Среда Файбича с аскорбиновой кислотой	6,16	37,2	< 0,0001	< 0,0001
Пептон-сахарозо-глицериновая среда	1,14	11,0	0,0005	0,0003

Таким образом, *A. tenuissima* K22 и *G. Pannorum* ВКМ F-4777D при лиофилизации продемонстрировали хорошую выживаемость конидий, которая даже без использования защитных сред сохраняется на уровне, вполне достаточном для практического использования лиофилизированных культур при хранении этих штаммов.

Заключение

1. Оба изученных штамма демонстрируют высокую (75,9 % у *A. tenuissima* K22 и 82,0 % у *G. pannorum* ВКМ F-4777D) жизнеспособность конидий после лиофилизации без использования защитных сред.
2. Защитные среды не оказывают статистически значимого влияния на выживаемость конидий *A. tenuissima* K22 и статистически значимо повышают выживаемость конидий *G. pannorum* ВКМ F-4777D (в 1,16 раза при использовании среды Файбича и в 1,07 раза при использовании пептон-сахарозо-глицериновой среды).
3. Введение в среду Файбича аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта ведет к значительному снижению доли выживших при лиофилизации конидий (в 10,61 раза у *A. tenuissima* K22 и в 2,15 раза у *G. pannorum* ВКМ F-4777D).
4. На основе полученных результатов можно рекомендовать проводить лиофилизацию конидий *A. tenuissima* K22 без использования защитных сред, а лиофилизацию конидий *G. pannorum* ВКМ F-4777D – с использова-

нием защитной среды Файбича либо без использования защитных сред.

Список источников

1. De Souza P.M. Application of microbial α -amylase in industry – A review // Brazilian Journal of Microbiology. 2010. № 4. P. 850–861.
2. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets / C.F. Vargas-Rodriguez [et al.] // J. Dairy Sci. 2014. № 97 (7). P. 4464–4470.
3. Cowieson A.J., Vieira S.L., Stefanello C. Exogenous microbial amylase in the diets of poultry: what do we know? // J. Appl. Poult. Res. 2019. № 28 (3). P. 556–565.
4. Shafique S., Bajwa R., Shafique S. Alpha-amylase production by toxigenic fungi // Natural Product Research. 2010. № 24 (15). P. 1449–1456.
5. Abd A.A., Mostafa F. Production and Characterization of Fungal α -Amylase from Marine Alternata Utilizing Lignocellulosic Wastes and Its Application // Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci. 2015. № 6. P. 813–825.
6. Production of Glucoamylase from Novel Strain of *Alternaria Alternata* under Solid State Fermentation / D.E Nayab [et al.] // BioMed Research International. 2022. P. 9. DOI: 10.1155/2022/2943790
7. Хижняк С.В., Пампуха В.Т. Микробные сообщества карстовых пещер как потенциальный источник продуцентов низкотемпературных амилаз // Вестник Омского государственного

- аграрного университета. 2016. № 1 (21). С. 104–110.
8. Влияние температуры на скорость роста амилотических штаммов *Geomyces pannorum* / С.В. Хижняк [et al.] // Вестник КрасГАУ. 2018. № 1 (136). С. 214–221.
 9. Adams J. The principles of freeze-drying // Methods Mol. Biol. 2007. Vol. 368. P. 15–38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_2.
 10. Stacey J.N., Day J. Long-term ex-situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers // Methods Mol. Biol. 2007. Vol. 368. P. 1–14. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_1.
 11. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 3. С. 5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.
 12. Психротолерантный штамм мицелиального гриба *Geomyces pannorum* ВКМ F-4777D – продуцент α-амилазы / С.В. Хижняк [и др.] // Патент на изобретение 2736223 С1. 12.11.2020.
 13. Impact of the fermentation parameters pH and temperature on stress resilience of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 / A. Hernandez [et al.] // AMB Expr. 2019. Vol. 9. № 66. DOI: 10.1186/s13568-019-0789-2.
 14. Optimization of protective agents for the freeze-drying of *Paenibacillus polymyxa* Kp10 as a potential biofungicide / H.S. Nasran [et al.] // Molecules. 2020. Vol. 25, № 11. DOI: 10.3390/molecules25112618.
 15. Файбич М.М. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1968. № 2. С. 59–66.
 16. Стандартная операционная процедура по лиофилизации культур ВКМ с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки / сост. С.М. Озерская, Е.О. Пучков, Н.Е. Иванушкина. Пущино, 2011.
 17. Охалкина В.Ю. Методы поддержания микробных культур. Ч. 2. Лиофилизация // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 4. С. 21–32.
- ### References
1. De Souza P.M. Application of microbial α-amylase in industry – A review // Brazilian Journal of Microbiology. 2010. № 4. P. 850–861.
 2. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets / C.F. Vargas-Rodriguez [et al.] // J. Dairy Sci. 2014. № 97 (7). P. 4464–4470.
 3. Cowieson A.J., Vieira S.L., Stefanello C. Exogenous microbial amylase in the diets of poultry: what do we know? // J. Appl. Poult. Res. 2019. № 28 (3). P. 556–565.
 4. Shafique S., Bajwa R., Shafique S. Alpha-amylase production by toxigenic fungi // Natural Product Research. 2010. № 24 (15). P. 1449–1456.
 5. Abd A.A., Mostafa F. Production and Characterization of Fungal α-Amylase from Marine Alternata Utilizing Lignocellulosic Wastes and Its Application // Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci. 2015. № 6. P. 813–825.
 6. Production of Glucoamylase from Novel Strain of *Alternaria Alternata* under Solid State Fermentation / D.E. Nayab [et al.] // BioMed Research International. 2022. P. 9. DOI: 10.1155/2022/2943790
 7. Hizhnyak S.V., Pampuha V.T. Mikrobnye soobshchestva karstovykh pescher kak potencial'nyj istochnik producentov nizkotemperaturnykh amilaz // Vestnik Omskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2016. № 1 (21). С. 104–110.
 8. Vliyanie temperatury na skorost' rosta amiloliticheskikh shtamov *Geomyces pannorum* / S.V. Hizhnyak [et al.] // Vestnik KrasGAU. 2018. № 1 (136). С. 214–221.
 9. Adams J. The principles of freeze-drying // Methods Mol. Biol. 2007. Vol. 368. P. 15–38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_2.
 10. Stacey J.N., Day J. Long-term ex-situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers // Methods Mol. Biol. 2007. Vol. 368. P. 1–14. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_1.
 11. Gracheva I.V., Osin A.V. Mehanizmy povrezhdenij bakterij pri liofilizacii i protektivnoe dejstvie zaschitnyh sred // Problemy osobo opasnykh infekcij. 2016. № 3. С. 5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.

12. Psihrotolerantnyj shtamm micelial'nogo griba *Geomyces pannorum* VKM F-4777D – producent α -amilazy / S.V. Hizhnyak [i dr.] // Patent na izobrenenie 2736223 C1. 12.11.2020.
13. Impact of the fermentation parameters pH and temperature on stress resilience of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 / A. Hernandez [et al.] // AMB Expr. 2019. Vol. 9. № 66. DOI: 10.1186/s13568-019-0789-2.
14. Optimization of protective agents for the freeze-drying of *Paenibacillus polymyxa* Kp10 as a potential biofungicide / H.S. Nasran [et al.] // Molecules. 2020. Vol. 25, № 11. DOI: 10.3390/molecules25112618.
15. Fajbich M.M. Stabilizaciya vakcinnyh preparatov v processe vysushivaniya i hraneniya // Zhurnal mikrobiologii, `epidemiologii i immunologii. 1968. № 2. S. 59–66.
16. Standartnaya operacionnaya procedura po liofilizacii kul'tur VKM s ispol'zovaniem raznyh rezhimov pervichnoj i vtorichnoj sushki / sost. S.M. Ozerskaya, E.O. Puchkov, N.E. Ivanushkina. Puschino, 2011.
17. Ohapkina V.Yu. Metody podderzhaniya mikrobnnyh kul'tur. Ch. 2. Liofilizaciya // Teoreticheskaya i prikladnaya `ekologiya. 2009. № 4. S 21–32.

Статья принята к публикации 28.08.2023 / The article accepted for publication 28.03.2023.

Информация об авторах:

Софья Владимировна Овсянкина¹, заведующая межкафедральной научно-инновационной лабораторией сельскохозяйственной и экологической биотехнологии, кандидат биологических наук

Сергей Витальевич Хижняк², профессор кафедры экологии и природопользования, доктор биологических наук, профессор

Полина Александровна Аболентцева³, научный сотрудник лаборатории селекции и оригинального семеноводства

Яна Викторовна Смольникова⁴, заведующая научно-исследовательской лабораторией проблем и переработки масличных культур, кандидат технических наук

Елена Николаевна Олейникова⁵, главный специалист управления науки и инновациями

Information about the authors:

Sofya Vladimirovna Ovsyankina¹, Head of the Interdepartmental Research and Innovation Laboratory of Agricultural and Environmental Biotechnology, Candidate of Biological Sciences

Sergey Vitalievich Khizhnyak², Professor at the Department of Ecology and Environmental Management, Doctor of Biological Sciences, Professor

Polina Aleksandrovna Abolentseva³, Researcher, Laboratory of Breeding and Original Seed Production

Yana Viktorovna Smolnikova⁴, Head of the Research Laboratory of Problems and Processing of Oilseeds, Candidate of Technical Sciences

Elena Nikolaevna Oleynikova⁵, Chief Specialist of Science and Innovation Management

