

Научная статья
УДК 579.66:577.15
EDN: DADDCO
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-359-369



Каталитические свойства и иммобилизация ферментных препаратов, содержащих липазу галоалкалотолерантных бактерий *Pseudomonas peli* и *Bacillus aequororis*

Ю.Г. Максимова^{***✉}, Е.В. Пьянкова^{**}, А.Д. Елисеева^{**},
В.А. Щетко^{***}, А.Ю. Максимов^{***}

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Пермь, Российская Федерация

**Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Российская Федерация

***Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Аннотация. Данная статья посвящена исследованию каталитических свойств и иммобилизации ферментных препаратов, которые содержат липазу галоалкалотолерантных бактерий *Pseudomonas peli* и *Bacillus aequororis*. Из галоалкалотолерантных бактерий *Pseudomonas peli* 3-Т и *Bacillus aequororis* 5-ДБ выделена липаза и иммобилизована на карбоксиметилцеллюлозе, активированном хитозане и кормовых дрожжах. Определена pH-зависимость активности и термостабильность нативного фермента, сохранение активности при иммобилизации и высушивании иммобилизованного препарата. Установлено, что активность липазы из обоих источников повышается с увеличением щелочности реакционной среды, причем у липазы *P. peli* 3-Т в кислой среде активность отсутствовала, у *B. aequororis* 5-ДБ при pH 6–7 составляла не более 20% от максимальной. Выделенная липаза обладает достаточно высокой термостабильностью. Так, липаза *P. peli* 3-Т при воздействии температуры 60 и 70 °С в течение 1 ч полностью сохраняет исходную активность, а в течение 15 мин воздействие температуры 80 и 90 °С приводит к снижению активности на 73 и 83% соответственно. Из изученных носителей для иммобилизации фермента наиболее перспективны активированный хитозан и кормовые дрожжи. При высушивании иммобилизованного препарата липазы на активированном хитозане сохраняется 3 и 46% активности нативного фермента из *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ соответственно, на кормовых дрожжах – 2 и 64% соответственно.

Ключевые слова: иммобилизованные ферменты, липаза, галотолерантные бактерии, алкалотолерантные бактерии, термостабильность фермента

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507 и частично в рамках темы «Поиск и селекция новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии. Создание иммунохимических диагностических систем», номер государственной регистрации НИОКТР 122010800029-1.

Для цитирования: Максимова Ю.Г., Пьянкова Е.В., Елисеева А.Д., Щетко В.А., Максимов А.Ю. Каталитические свойства и иммобилизация ферментных препаратов, содержащих липазу галоалкалотолерантных бактерий *Pseudomonas peli* и *Bacillus aequororis* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 359–369. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-359-369>. EDN: DADDCO.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Catalytic properties and immobilization of enzyme preparations containing lipase of the haloalkalotolerant bacteria *Pseudomonas peli* and *Bacillus aequororis*

Yuliya G. Maksimova^{***✉}, Ekaterina V. Pyankova^{**}, Anna D. Eliseeva^{**},
Vitaly A. Shchetko^{***}, Alexander Yu. Maksimov^{***}

© Максимова Ю.Г., Пьянкова Е.В., Елисеева А.Д., Щетко В.А., Максимов А.Ю., 2023

*Institute of Ecology and genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Perm, Russian Federation

**Perm State University, Perm, Russian Federation

***Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. In this work, we investigate the catalytic properties and immobilization of enzyme preparations containing lipase of haloalkalotolerant bacteria *Pseudomonas peli* and *Bacillus aequororis*. Lipase was isolated from the *P. peli* 3-T and *B. aequororis* 5-DB followed by its immobilization on either carboxymethylcellulose, activated chitosan or fodder yeast. The pH-dependence of native enzyme activity and thermostability, as well as the residual activity upon immobilization and drying of immobilized product, were determined. The lipase activity from both sources enhances with increasing alkalinity of the reaction medium. Specifically, *P. peli* 3-T lipase exhibited no activity in an acidic medium, and *B. aequororis* 5-DB lipase exhibited around 20% of maximum activity at a pH value of 6–7. The isolated lipase has a rather high thermostability; thus, *P. peli* 3-T lipase fully retains its initial activity upon heating to 60 °C and 70 °C for 1 h. Moreover, 15 min exposure to temperatures of 80 °C and 90 °C leads to an activity decrease of 73% and 83%, respectively. Activated chitosan and fodder yeast are the most promising of the studied excipients for enzyme immobilization. Drying of the immobilized lipase product on the activated chitosan showed retention of 3% and 46% of the native enzyme activity derived from *P. peli* 3-T and *B. aequororis* 5-DB, respectively. In the case of fodder yeast, these values were 2% and 64%, respectively.

Keywords: immobilized enzymes, lipase, halotolerant bacteria, alkalotolerant bacteria, enzyme thermostability

Funding. The work was supported financially by the government of the Perm Territory within the framework of scientific project no. C-26/507 and partly within the framework of the topic “Search and selection of new promising microorganisms for biotechnology purposes. Creation of immunochemical diagnostic systems”, state registration number NIOKTR 122010800029-1.

For citation: Maksimova Yu.G., Pyankova E.V., Eliseeva A.D., Shchetko V.A., Maksimov A.Yu. Catalytic properties and immobilization of enzyme preparations containing lipase of the haloalkalotolerant bacteria *Pseudomonas peli* and *Bacillus aequororis*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(3):359–369. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-359-369>. EDN: DADDCO.

ВВЕДЕНИЕ

Липаза (триацилглицерол-липаза, триацил-глицерол-ацилгидролаза, КФ 3.1.1.3) катализирует разложение триглицеридов до моно-, диглицеридов, глицерина и жирных кислот в водной среде и ряд химических реакций в системах с низкой активностью воды. Липазы являются универсальными биокатализаторами, имеющими широкий спектр применений в промышленности, т.к. они катализируют такие химические реакции, как аминолиз, ацидолиз, этерификацию и переэтерификацию. Высокая активность и стабильность как в водных, так и в органических средах позволяет использовать их в производстве биодизеля, разделении энантиомеров, модификации триацилглицеринов, обогащении жирными кислотами и производстве сложных эфиров. Также липазы включают в составы моющих средств, используют в синтезе сложных эфиров сахаров и биосурфактантов, получении продуктов косметических, целлюлозно-бумажных, кожевенных, текстильных, фармацевтических, агрохимических, пищевых производств [1, 2]. Кроме того, липазы имеют перспективы использования в сельском хозяйстве. Добавление экзогенной липазы в корм животных и птицы интенсифицирует работу их органов внутренней секреции. Было показано, что при введении липазы в корма свиней и птицы концентрация эндогенного трипсина и амилазы повышается на 32,5 и 69,3% соответственно, улучшается и ускоряется пищеварительный процесс, увеличивается интенсивность роста животных [3].

Экстремофильные и экстремотолерантные бактерии, обитающие в биотопах с условиями, параметры которых значительно отличаются от нормальных

«физиологических», представляют большой интерес как продуценты ферментов с уникальными свойствами. Алкалолентные (щелочестойчивые) и галотолерантные (солеустойчивые) гидролитические бактерии выделяют в окружающую среду ферменты, стабильно функционирующие в условиях высокой щелочности и низкой активности воды [4, 5]. Ранее из щелочных высокоминерализованных сред содового шламохранилища АО «Беззниковский содовый завод» были выделены бактерии, устойчивые к высокой щелочности и обладающие липазной активностью, и было показано, что внеклеточная и ассоциированная с поверхностью липаза таких бактерий проявляет максимальную активность в среде с высоким pH [6, 7].

Для использования в промышленности ферментов, изолированных из клеток, необходима их стабилизация в меняющихся условиях окружающей среды, долговременное сохранение активности, возможность многократного применения. В этих целях дополнительным этапом подготовки ферментного препарата является иммобилизация белков – ограничение подвижности молекул с возможностью беспрепятственной диффузии субстратов и продуктов. Иммобилизованные ферменты более стабильны, чем ферменты в свободной форме, и могут использоваться для осуществления непрерывных биокаталитических реакций [8]. Несмотря на универсальность липаз и других ферментов для промышленного применения, ряд ограничений не позволяет использовать их в промышленных масштабах. Основными недостатками являются физическая (агрегация, осаждение и потеря третичной структуры) или химическая (дезаминирование, фрагментация и

окисление) нестабильность при хранении или в рабочих стадиях реакции, особенно в органическом растворителе, а также высокая стоимость этих биокатализаторов, связанная со сложностью регенерации и долговременного использования [2].

Для иммобилизации ферментов, в частности липаз, используются различные методы: адсорбция на нерастворимом носителе, включение в структуру гелей или инкапсуляция, ковалентная сшивка с носителем, поперечная сшивка белковых агрегатов бифункциональными реагентами [9–11]. При использовании безводных сред, например, в реакции этерификации, происходит агрегация и осаждение фермента из раствора. В этом случае иммобилизация биокатализатора может снизить диффузионные затруднения, препятствуя агрегации. Для иммобилизации липаз использовали все перечисленные выше методы, добиваясь многократного (до 20 циклов) функционирования биокатализатора в процессе получения биодизельного топлива [12]. Было установлено, что удельная активность липазы, иммобилизованной на хитозане, увеличивалась по сравнению с несвязанным ферментом [13]. Липаза на хитозане, активированном полиальдегидкрахмалом, была стабильна при температуре до 70 °C в гидрофобных и гидрофильных органических растворителях и использовалась для кинетического разделения вторичных спиртов [14]. Липаза, ковалентно иммобилизованная на активированной глутаровым альдегидом рисовой шелухе, жоме сахарного тростника и волокне зеленого кокоса, сохранила 94, 90 и 89% исходной активности соответственно [15]. Иммобилизованные на бентоните липазы обладали лучшей температурной и pH-стабильностью по сравнению со свободными [16]. В настоящее время в качестве носителя ферментов, в частности липазы, достаточно широко используют наноматериалы [17]. Гетерогенный биокатализатор в виде липазы, адсорбированной на макропористом углеродном аэрогеле в виде хаотично переплетенных многостенных углеродных нанотрубок, был стабилен в реакциях этерификации, протекающих в органических растворителях, в течение нескольких десятков часов в периодических реакционных циклах [18]. Иммобилизованный препарат в виде липазы, адсорбированной на многостенных углеродных нанотрубках, функционализированных эпокси-группами, использовали для кинетического разделения рац-ибупрофена путем этерификации ибупрофена в изооктане в качестве растворителя [19]. Липаза на композиционном материале, в состав которого входили галлазитовые нанотрубки, катализировала гидролиз сложных эфиров фталевой кислоты с эффективностью до 95% [20]. Липаза на активированных глутаровым альдегидом нановолокнах оксида графена/хитозана/ацетата целлюлозы обладала более высокой активностью, чем свободная, в кислой среде и была использована в синтезе бензилацетата из бензилового спирта и винилацетата [21]. Иммобилизованная на магнитных многослойных углеродных нанотрубках липаза по сравнению с растворимой формой обладала большей термо- и pH-стабильностью, возможностью повторного использования, легкостью отделения от среды [22]. Хорошую термостабильность и возможность повторного использования в 8 циклах с 80%-м сохранением

активности наблюдали у липазы, иммобилизованной на магнитном оксиде графена [23]. Однако, несмотря на то, что иммобилизация липаз для различных химических процессов осуществляется достаточно масштабно, разработка препаратов иммобилизованной липазы в качестве кормовой добавки имеет свои особенности и требует дополнительных исследований. Во-первых, носитель и способ иммобилизации не должны быть причиной токсичности препарата, во-вторых, важным требованием к иммобилизованному препарату является его стабильность при хранении, и, в-третьих, должна быть обеспечена возможность функционирования препарата в пищеварительной системе сельскохозяйственных животных. Для решения данной задачи благодаря таким качествам, как нетоксичность, биосовместимость, способность к биологическому разложению и наличие многочисленных реакционных участков, перспективны биополимеры природного происхождения, такие как альгинат, хитозан, целлюлоза, агароза, гуаровая камедь, агар, каррагинан, желатин, декстран, ксантан, пектины, используемые как носители для иммобилизации ферментов [24–26]. В данной работе сравнивались различные методы иммобилизации липазы с использованием в качестве носителей кормовых дрожжей, карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и хитозана.

Цель работы – изучить каталитические свойства (активность, термо- и pH-стабильность) ферментного препарата, содержащего липазу *Pseudomonas peli* 3-Т и *Bacillus aequororis* 5-ДБ в свободной форме, и влияние процесса иммобилизации, высушивания и хранения на активность иммобилизованной липазы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Pseudomonas peli 3-Т (ВКМ В-3617D), выделенный с поверхности грунта старой карты содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» [6], культивировали на минеральной среде Пфеннига составом (г/л): K_2PO_4 – 0,3; MgCl_2 – 0,3; CaCl_2 – 0,03; дрожжевой экстракт – 0,5 (pH 8) с 1%-м глицерином в качестве источника углерода, 0,03%-й мочевиной в качестве источника азота и микроэлементами по Липперту – в колбах Эрленмейера при температуре 30 °C на шейкере со скоростью вращения платформы 100 об/мин в течение 5 суток.

Bacillus aequororis 5-ДБ (ВКМ В-3610D), выделенный с поверхности грунта старой карты содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» [6], культивировали на среде составом (г/л): пептон – 10, глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5, K_2HPO_4 – 1, Na_2CO_3 – 10, (pH 11) в условиях, описанных выше.

Биомассу *P. peli* 3-Т и *pps* 5-ДБ центрифугировали 10 мин при 5000 g, отмывали от среды калий-фосфатным буфером (pH=8) однократно, центрифугировали повторно и разрушали ультразвуковым дезинтегратором УЗГ8-0,4/22 (АО «ВНИИ ТВЧ», Россия) при частоте 22 кГц с охлаждением до 0–4 °C, режим обработки – 7 раз по 20 сек и 10 раз по 15 сек соответственно. Суспензию, содержащую разрушенные клетки, центрифугировали 20 мин при 5000 g с охлаждением (4 °C). Лизат клеток *P. peli* 3-Т использовали без дальнейшей очистки, высаливание липазы *B. aequororis* 5-ДБ проводили сульфатом аммония до 35% от насыщающей концентрации и центрифугировали 20 мин при 5000 g с охлаждением. Осадок

ресуспендировали в фосфатном буфере, концентрацию белка устанавливали по методике Бредфорда.

Активность липазы определяли следующим образом: к 4 см³ раствора выделенного из бактериальных клеток белка в фосфатном буфере с рН=8 добавляли 0,05 см³ р-нитрофениллаурата в конечной концентрации 10 мМ и измеряли оптическую плотность окрашенного продукта р-нитрофенола при λ=405 нм на спектрофотометре SmartSpec™ Plus (Bio-Rad, США) при температуре 25 °С в течение 1 ч.

Активность липазы (Е) рассчитывали по формуле (1):

$$E = OP \times 10^6 / 18,3 \times 10^3 \times l \times t, \text{ мкмоль/мин/л}, \quad (1)$$

где ОП – оптическая плотность; 10⁶ – коэффициент пересчета моль в мкмоль; 18,3×10³ – коэффициент молярной экстинкции р-нитрофенола, л/см/моль; l – толщина кюветы, см; t – время инкубации пробы, мин [7].

Активность липазы в расчете на г белка вычисляли по формуле (2):

$$E' = 1000 \times E / C, \text{ мкмоль/мин/г}, \quad (2)$$

где E – активность липазы, мкмоль/мин/л; C – концентрация белка в реакционной смеси, мкг/мл.

Удельную активность липазы (Е_д) выражали в мкмоль/мин и относили к л раствора фермента (Е_д/л) или г фермента (Е_д/г), вступившего в реакцию. При сравнении удельной активности фермента, проявляемой в разных условиях, использовали относительные единицы (%).

Определение оптимума рН и термостабильности. Штаммы, использованные в работе, были выделены из щелочной среды обитания. В связи с этим активность липазы изучали в среде от слабокислой до сильнощелочной. Чтобы определить оптимум рН-проявления активности липазы *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ, белковый раствор вносили в фосфатный буфер с рН от 6 до 11 и проводили реакцию с р-нитрофениллауратом в качестве субстрата. За 100% принимали активность фермента при рН=10. Чтобы оценить термостабильность фермента, раствор белка выдерживали при температурах 60, 70, 80, 90 °С в течение 15, 30, 45 и 60 мин в фосфатном буфере с рН=8, охлаждали до температуры 25 °С и проводили реакцию с р-нитрофениллауратом. За 100% принимали активность липазы, инкубированной при температуре 25 °С в фосфатном буфере с рН=8.

Иммобилизованный ферментный препарат получали тремя способами. Первый способ: белок адсорбировали на кормовых дрожжах (ООО «МИРАГРО», Россия) в течение 1 ч, отделяли дрожжи с иммобилизованным белком фильтрованием через бумажный фильтр и определяли в фильтрате концентрацию белка по Бредфорду. Величину адсорбции белка (А) на носителе устанавливали по формуле (3):

$$A = V (C_{\text{исх}} - C_{\text{ост}}) \times 1000 / M, \text{ мкг/г}, \quad (3)$$

где V – объем раствора белка; C_{исх} – концентрация белка в растворе до адсорбции, мкг/мл; C_{ост} – концентрация белка в растворе после адсорбции, мкг/мл; M – масса носителя, мг.

Второй способ: белок иммобилизовали в гидрогеле КМЦ, сшитой 1%-й лимонной кислотой. Для этого готовили

2%-й раствор КМЦ в воде, перемешивая в течение 1 ч при температуре 70 °С, добавляли 1%-й раствор лимонной кислоты до конечной концентрации 0,05%, перемешивали 30 мин [27]. Полученный раствор разливали в чашки Петри слоем 5 мм и высушивали при температуре 70 °С до образования пленки, измельчали ее в фарфоровой ступке и смешивали с раствором белка в соотношении 2–4 см³ ферментного препарата на 0,5 г порошкообразной КМЦ, после 1 ч адсорбции отмывали от несвязанного белка фосфатным буфером и определяли липазную активность в реакции с р-нитрофенолом.

Третий способ: белок ковалентно связывали с активированным хитозаном. Готовили 2%-й раствор хитозана в 2%-й уксусной кислоте и накапывали в 1 М раствор КОН, оставляли на 4 ч для отверждения, отмывали фосфатным буфером (рН=7,2±0,2) до нейтральной реакции промывных вод. Для активации к гранулам добавляли 0,1%-й раствор глутарового альдегида на 1 ч. Затем добавляли раствор белка к активированным гранулам хитозана и выдерживали 24 ч в статических условиях при температуре 10 °С, после чего отделяли несвязавшийся белок фильтрованием через бумажный фильтр и определяли количество белка в фильтрате по методике Бредфорда. Массу ковалентно-сшитого белка устанавливали по формуле (3).

Сохранение липазной активности иммобилизованных препаратов при хранении изучали следующим образом. Иммобилизованный ферментный препарат высушивали при температуре 30 °С до постоянного веса и хранили при температуре 25 °С в течение двух недель. После этого проводили реакцию с р-нитрофениллауратом, как описано выше.

Статистическая обработка результатов. Результаты получали не менее чем в трех независимых опытах. Статистический анализ результатов проводили с помощью стандартного пакета лицензионной программы MS Excel 2007, определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего (M±m). Отсутствие значимых различий между результатами независимых опытов подтверждали при использовании t-критерия Стьюдента, p>0,05.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ферментный препарат, содержащий липазу *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ, был получен при лизисе бактериальных клеток ультразвуком и преципитации белка в присутствии сульфата аммония. Для *P. peli* 3-Т высаливание не давало преимуществ, в дальнейшем использовали клеточный лизат. При этом активность повышалась с 3,68 Е_д/л у клеточной суспензии до 27,82 Е_д/л у лизированных клеток. У *B. aequororis* 5-ДБ для последующих экспериментов использовали фракцию, полученную высаливанием 35%-м сульфатом аммония, при этом активность повышалась с 4,3 Е_д/л у клеточной суспензии до 11,4 и 94,8 Е_д/л у клеточного лизата и фракции соответственно.

Изучили каталитические свойства полученного ферментного препарата: зависимость липазной активности от рН реакционной среды и термостабильность биокатализатора. Показано, что наибольшая активность фермента проявлялась в щелочной среде (табл. 1, рис. 1). У липазы *P. peli* 3-Т в кислой среде активность отсутствовала, у *B. aequororis* 5-ДБ при рН=6–7 составляла

Таблица 1. Активность липазы, выделенной из *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ, при различных pH, Ед/г

Table 1. Activity of lipase isolated from *P. peli* 3-T and *B. aequororis* 5-DB at different pH, U/g

Источник выделения	pH				
	6	7	8	9	10
<i>P. peli</i> 3-Т	0	15,40	17,33	54,88	144,41
<i>B. aequororis</i> 5-ДБ	0,99	1,59	8,89	8,77	10,60

Примечание. Представлены данные единичного опыта. Тенденция повторяется в трех независимых экспериментах ($p > 0,05$).

не более 20% от максимальной. Диапазон pH, при котором проявляет активность липаза *B. aequororis* 5-ДБ, более широк, и активность фермента при pH=6 близка к таковой при pH=7.

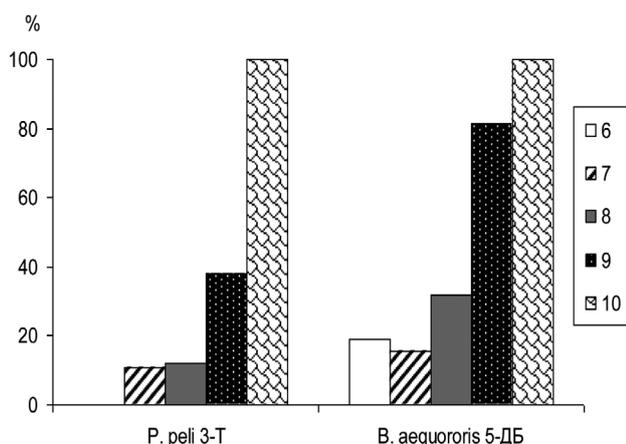


Рис. 1. Зависимость липазной активности от pH
Fig. 1. Relationship between lipase activity and pH

Определена термостабильность ферментного препарата. Установлено, что липаза, выделенная из клеток галоалкалолтолерантных бактерий, обладает достаточно высокой термостабильностью, несмотря на то, что данные микроорганизмы не являются термофилами. Это может быть связано с общей

адаптивной способностью организмов экстремальных сред обитания. Так, липаза *P. peli* 3-Т при воздействии 60 и 70 °C в течение 1 ч полностью сохраняет исходную активность, и только воздействие 80 и 90 °C в течение 15 мин приводит к снижению активности на 73 и 83% соответственно (рис. 2, табл. 2). Липаза *B. aequororis* 5-ДБ при температуре 90 °C и после 60 мин экспозиции при температуре 80 °C теряет свою активность, однако при температуре 60 и 70 °C не ингибирует ее (рис. 3, см. табл. 2).

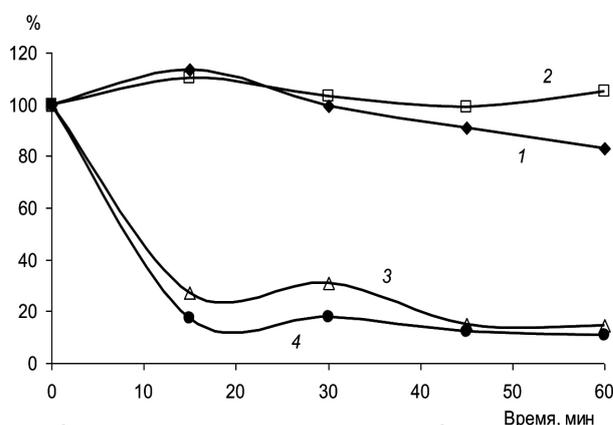


Рис. 2. Термоинактивация липазы *P. peli* 3-Т при воздействии 60 (1), 70 (2), 80 (3) и 90 °C (4)
Fig. 2. Thermal inactivation of *P. peli* 3-T lipase upon exposure to 60 (1), 70 (2), 80 (3) and 90 °C (4)

Таблица 2. Активность липазы *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ при воздействии повышенной температуры, Ед/г

Table 2. Activity of *P. peli* 3-T and *B. aequororis* 5-DB lipases exposed to elevated temperature, U/g

Время, мин	Температура, °C			
	60	70	80	90
<i>P. peli</i> 3-Т				
15	65,63±1,73	63,78±2,96	58,58±5,55	36,77±2,38
30	57,59±3,88	59,83±2,11	66,30±2,48	37,72±3,83
45	52,61±4,65	57,33±1,48	31,71±0,23	26,02±1,79
60	48,18±2,44	60,76±2,92	30,56±0,45	23,41±1,15
<i>B. aequororis</i> 5-ДБ				
15	17,46±2,06	25,37±0,00	27,44±0,00	0
30	19,52±0,65	33,94±0,00	19,40±0,00	0
45	16,37±6,39	35,56±0,00	23,30±0,00	0
60	21,47±0,22	21,19±0,00	0	0

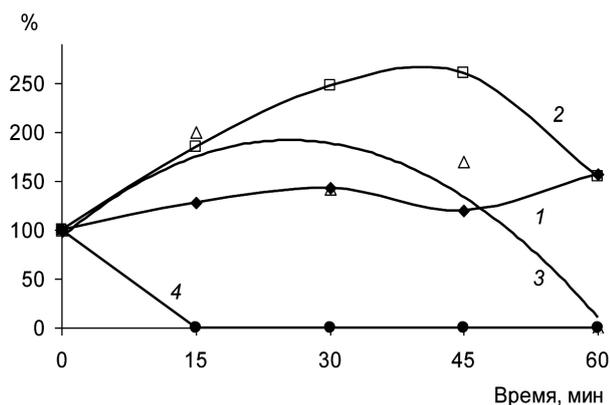


Рис. 3. Термоинактивация липазы *B. aequororis* 5-ДБ при воздействии 60 (1), 70 (2), 80 (3) и 90 °C (4)

Fig. 3. Thermal inactivation of *B. aequororis* 5-DB lipase upon exposure to 60 (1), 70 (2), 80 (3) and 90 °C (4)

Определена величина адсорбции белка на КМЦ и кормовых дрожжах, а также величина связывания на активированном хитозане за счет ковалентной сшивки с бифункциональным реагентом – глутаровым альдегидом. Установлено, что носителем, связывающим наибольшее количество фермента, является активированный хитозан (табл. 3). На КМЦ связывается значительно меньшее количество белка, выделенного из *P. peli* 3-Т, чем на активированном хитозане. Адсорбция белка из *B. aequororis* 5-ДБ на КМЦ отсутствовала. На кормовых дрожжах определить массу адсорбированного белка не представлялось возможным, т.к. белок, входящий в состав носителя, мешал измерению.

Определена активность липазы сразу после иммобилизации и у иммобилизованных биокатализаторов после высушивания и хранения в течение двух недель. Данные по сохранению активности липазы после иммобилизации, высушивания и хранения ферментных препаратов обобщены в табл. 4. Липазная активность после иммобилизации белка, выделенного из *P. peli* 3-Т, снижалась и составляла 2–3% от исходной. Отмечено, что активность препарата иммобилизованной липазы *P. peli* 3-Т после высушивания зависела от носителя, на котором осуществляли иммобилизацию: так, липаза на КМЦ значительно теряла свою активность, но высушивание не влияло на активность липазы на хитозане и дрожжах. Активность липазы из *B. aequororis* 5-ДБ

после связывания с хитозаном сохранялась в пределах 10–11% от таковой нативного фермента, а после высушивания биокатализатора значительно возрастала. Возможно, при регидратации гранул фермент выходил в раствор, что приводило к снижению диффузионных затруднений при массообмене субстрата и продукта и, в свою очередь, к увеличению скорости ферментативной реакции.

Иммобилизованный на носителе и высушенный фермент является наиболее удобной формой для дальнейшего хранения и использования. Однако сам процесс иммобилизации может затрагивать активный центр фермента, приводя к снижению и даже ингибированию его активности, что требует скрининга носителей и методов иммобилизации для получения активного и стабильного биокатализатора. В нашем исследовании показано, что иммобилизация белкового препарата, содержащего липазу, на активированном хитозане более предпочтительна, чем на КМЦ. Связи, возникающие при адсорбции белка на носителе, гораздо более слабые, чем при ковалентной сшивке с активированным хитозаном, поэтому последний способ более эффективен, чем адсорбция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липаза, выделенная из клеток галоалкалотолерантных бактерий *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ, проявляла максимальную активность в сильнощелочной среде, при этом фермент из грамположительных бацилл был активен в более широком диапазоне pH, включая слабокислую среду (pH=6).

Выделенная из *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ липаза обладала высокой термостабильностью. Липаза *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ при воздействии 60 и 70 °C в течение 1 ч сохраняла 100% исходной активности; воздействие 80 и 90 °C в течение 15 мин приводило к снижению активности липазы *P. peli* 3-Т на 73 и 83% соответственно, воздействие 90 °C в течение 15 мин и воздействие 80 °C в течение 60 мин ингибировало активность липазы *B. aequororis* 5-ДБ.

Иммобилизация липазы методом адсорбции на кормовых дрожжах, геле КМЦ и ковалентной сшивкой с активированным хитозаном приводила к снижению исходной активности нативного фермента, при иммобилизации липазы *B. aequororis* 5-ДБ на дрожжах и активированном хитозане сохранялась 10–11% исходной активности. Величина адсорбции белка на активированном хитозане значительно пре-

Таблица 3. Связывание на носителях ферментного препарата, содержащего липазу *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ

Table 3. Binding on carriers of an enzyme preparation containing *P. peli* 3-T and *B. aequororis* 5-DB lipase

Носители	Источник выделения			
	<i>P. peli</i> 3-Т		<i>B. aequororis</i> 5-ДБ	
	Масса адс. белка, мкг	А, мкг/г	Масса адс. белка, мкг	А, мкг/г
Карбоксиметилцеллюлоза	10,43±3,34	24,49±8,47	0	0
Активированный хитозан	66,35±7,93	532,09±63,62	164,19±14,91	1313,52±119,28
Дрожжи	н/о*	н/о	н/о	н/о

Примечание. * – не определено. Исходная концентрация белка, выделенного из *P. peli* 3-Т, – 67,56±16,14 мкг/мл, из *B. aequororis* 5-ДБ – 84,32±9,04 мкг/мл.

Таблица 4. Липазная активность иммобилизованных препаратов

Table 4. Lipase activity of immobilized preparations

Способ иммобилизации, носитель	Удельная липазная активность					
	После иммобилизации			После высушивания иммобилизованного препарата		
	Ед/л	Ед/г	Сохранение, %	Ед/л	Ед/г	Сохранение, %
Источник выделения – <i>P. peli</i> 3-Т						
Иммобилизация в структуре геля карбоксиметилцеллюлозы	0,347± 0,069	92,37± 34,57	2,7	0,038± 0,010	10,45±3,11	0,3
Ковалентная сшивка, гранулы хитозана, активированного 0,1%-м глутаровым альдегидом	0,410± 0,000	31,38±0,00	3,2	0,420± 0,148	21,41±6,63	3,3
Адсорбция, кормовые дрожжи	0,350± 0,088	н/о	2,7	0,252± 0,044	н/о	2,0
Источник выделения – <i>B. aequororis</i> 5-ДБ						
Иммобилизация в структуре геля карбоксиметилцеллюлозы	–	–	0	–	–	0
Ковалентная сшивка, гранулы хитозана, активированного 0,1%-м глутаровым альдегидом	0,448± 0,000	5,79±0,00	11,3	1,832± 0,000	39,16±4,01	46,0
Адсорбция, кормовые дрожжи	0,413± 0,000	н/о	10,4	2,556± 0,000	н/о	64,2

Примечание. Исходная активность белкового препарата липазы *P. peli* 3-Т – 12,85±4,34 Ед/л (178,04±24,80 Ед/г), *B. aequororis* 5-ДБ – 3,98 Ед/л (36,43 Ед/г).

вышла таковую на КМЦ и составляла 532,09±63,62 и 1313,52±119,28 мкг/г носителя для липазы из *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ соответственно.

Высушивание белкового препарата, содержащего липазу *B. aequororis* 5-ДБ, иммобилизованного на кормовых дрожжах и активированном хитозане, приводило к повышению активности по сравнению с влажным

иммобилизованным препаратом после хранения в течение двух недель в 4,5–6 раз.

В качестве биокатализатора может быть предложена липаза из *B. aequororis* 5-ДБ, иммобилизованная на активированном 0,1%-м глутаровым альдегидом хитозане с последующим высушиванием препарата и неиммобилизованная липаза из *P. peli* 3-Т.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Безбородов А.М., Загустина Н.А. Липазы в реакциях катализа в органическом синтезе (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. N 4. С. 347–373. <https://doi.org/10.7868/S0555109914040187>. EDN: QJJFEO.
- Costa-Silva T.A., Carvalho A.K.F., Souza C.R.F., De Castro H.F., Bachmann L., Said S., et al. Enhancement lipase activity via immobilization onto chitosan beads used as seed particles during fluidized bed drying: application in butyl butyrate production // Applied Catalysis A: General. 2021. Vol. 622. P. 118217. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118217>.
- Щербинин С. Экзогенная липаза снижает стоимость корма // Корма и кормопроизводство. 2018. N 4. С. 55–57.
- Fujinami S., Fujisawa M. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes – past, present and future // Environmental Technology. 2010. Vol. 31, no. 8-9. P. 845–856. <https://doi.org/10.1080/09593331003762807>.
- Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms // Environmental Technology. 2010. Vol. 31, no. 8-9. P. 825–834. <https://doi.org/10.1080/09593330903370026>.
- Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Выделение и идентификация алкалолаторантных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища // Микробиология. 2021. Т. 90. N 2. С. 155–165. <https://doi.org/10.31857/S0026365621020130>. EDN: KLWPKV.
- Максимова Ю.Г., Шилова А.В., Егорова В.В., Щетко В.А., Максимов А.Ю. Физиолого-биохимическая характеристика и биотехнологический потенциал гидролитических галоалкалолаторантных бактерий содового шламохранилища // Известия РАН. Серия биологическая. 2023. N 2. С. 149–159. <https://doi.org/10.31857/S1026347022700068>. EDN: HANYNK.
- Xie J., Zhang Y., Simpson B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications // Current Opinion in Food Science. 2022. Vol. 43. P. 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.09.004>.
- Fernandez-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation

// Enzyme and Microbial Technology. 2009. Vol. 45, no. 6-7. P. 405–418.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.009>.

10. Remonato D., Miotti R.H., Monti R., Bassan J.C., de Paula A.V. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: a review // Process Biochemistry. 2022. Vol. 114. P. 1–20.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>.

11. Sampaio C.S., Angelotti J.A.F., Fernandez-La-fuente R., Hirata D.B. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: problems and prospects – a review // International Journal of Biological Macromolecules. 2022. Vol. 215. P. 434–449.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.139>.

12. Quayson E., Amoah J., Hama S., Kondo A., Ogi-no C. Immobilized lipases for biodiesel production: current and future greening opportunities // Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2020. Vol. 134. P. 110355.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110355>.

13. Manan F.M.A., Attan N., Zakaria Z., Mahat N.A., Wahab R.A. Insight into the *Rhizomucor miehei* lipase supported on chitosan-chitin nanowhiskers assisted esterification of eugenol to eugenyl benzoate // Journal of Biotechnology. 2018. Vol. 280. P. 19–30.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.015>.

14. Alves dos Santos L., Alnoch R.C., Soares G.A., Mitchell D.A., Krieger N. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on chitosan crosslinked with poly-aldehyde starch for kinetic resolution of sec-alcohols // Process Biochemistry. 2022. Vol. 122. P. 238–247.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.014>.

15. Costa-Silva T.A., Carvalho A.K.F., Souza C.R.F., Freitas L., De Castro H.F., Oliveira W.P. Highly effective *Candida rugosa* lipase immobilization on renewable carriers: Integrated drying and immobilization process to improve enzyme performance // Chemical Engineering Research and Design. 2022. Vol. 183. P. 41–55.

<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.04.026>.

16. Pourkhanali K., Khayati G., Mizani F., Raouf F. Characterization of free and immobilized lipase from *Penicillium* sp. onto three modified bentonites: a comparative study // Journal of Biotechnology. 2022. Vol. 344. P. 57–69.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.12.013>.

17. Tan Z., Bilal M., Li X., Ju F., Teng Y., Iqbal H.M.N. Nanomaterial-immobilized lipases for sustainable recovery of biodiesel – a review // Fuel. 2022. Vol. 316. P. 123429.

<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123429>.

18. Kovalenko G., Perminova L., Beklemishev A. Heterogeneous biocatalytic esterification by recombinant *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on macroporous carbon aerogel // Catalysis Today. 2021. Vol. 379. P. 36–41.

<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.018>.

19. Moguei M.R.S., Habibi Z., Shahedi M., Yousefi M., Alimoradi A., Mobini S., et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase through isocyanide-based multi component reaction on multi-walled carbon nanotube: application for kinetic resolution of rac-ibuprofen // Biotechnology Reports. 2022. Vol. 35. P. e00759.

<https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00759>.

20. Sun Y., Guo M., Hu S., Fang X., Jin Z., Wu R. Nanosurface-immobilized lipase and its degradation of phthalate wastewater // Molecular Catalysis. 2022. Vol. 529. P. 112522.

<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112522>.

21. Badoei-dalfard A., Tahami A., Karami Z. Lipase immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide/chitosan/cellulose acetate electrospun nanofibrous membranes and its application on the synthesis of benzyl acetate // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2022. Vol. 209. P. 112151.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112151>.

22. Ghide M.K., Li K., Wang J., Abdulmalek S.A., Yan Y. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on magnetic multiwalled carbon nanotubes towards the synthesis of structured lipids rich in sn-2 palmitic acid and sn-1,3 oleic acid (OPO) for infant formula use // Food Chemistry. 2022. Vol. 390. P. 133171.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133171>.

23. Yu D., Li Z., Zhou X., Wang W., Wang L., Liu T., et al. Study on the modification of magnetic graphene oxide and the effect of immobilized lipase // International Journal of Biological Macromolecules. 2022. Vol. 216. P. 498–509.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.203>.

24. Bilal M., Iqbal H.M.N. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization // International Journal of Biological Macromolecules. 2019. Vol. 130. P. 462–482.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152>.

25. Sharma A., Thatai K.S., Kuthiala T., Singh G., Arya S.K. Employment of polysaccharides in enzyme immobilization // Reactive and Functional Polymers. 2021. Vol. 167. P. 105005.

<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105005>.

26. Vassiliadi E., Aridas A., Schmitt V., Xenakis A., Zoumpanioti M. (Hydroxypropyl)methyl cellulose-chitosan film as a matrix for lipase immobilization: operational and morphological study // Molecular Catalysis. 2022. Vol. 522. P. 112252.

<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112252>.

27. Холназаров Б.А., Тураев Х.Х., Назаров Ю.Э. Синтез гидрогелей на основе биоматериалов крахмала и натрий-карбоксиметилцеллюлозы // Universum: химия и биология. 2020. N 10. С. 57–60.

REFERENCES

1. Bezborodov A.M., Zagustina N.A. Lipases in catalytic reactions of organic chemistry. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014;50(4):347–373. (In Russian).

<https://doi.org/10.7868/S0555109914040187>. EDN: QJJFEO.

2. Costa-Silva T.A., Carvalho A.K.F., Souza C.R.F., De Castro H.F., Bachmann L., Said S., et al. Enhancement lipase activity via immobilization onto chitosan beads used as seed particles during fluidized bed drying: ap-

plication in butyl butyrate production. *Applied Catalysis A: General*. 2021;622:118217.

<https://doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118217>.

3. Shcherbinin S. Exogenous lipase reduces feed cost. *Korma i kormoproizvodstvo*. 2018;(4):55–57. (In Russian).

4. Fujinami S., Fujisawa M. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes – past, present and future. *Environmental Technology*. 2010;31(8-9):845–856.

<https://doi.org/10.1080/09593331003762807>.

5. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*. 2010;31(8-9):825-834. <https://doi.org/10.1080/09593330903370026>.
6. Shilova A.V., Maksimov A.Y., Maksimova Y.G. Isolation and identification of alkalitolerant bacteria with hydrolytic activity from a soda sludge storage. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2021;90(2):155-165. (In Russian). <https://doi.org/10.31857/S0026365621020130>. EDN: KLWPKV.
7. Maksimova Yu.G., Shilova A.V., Egorova V.V., Shchetko V.A., Maksimov A.Yu. Physiological and biochemical characteristics, and biotechnological potential of hydrolytic haloalkalitolerant bacteria of soda sludge storage. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya = Proceedings of the Russian Academy of Sciences. Biological Series*. 2023;(2):149-159. (In Russian). <https://doi.org/10.31857/S1026347022700068>. EDN: HANYNK.
8. Xie J., Zhang Y., Simpson B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. *Current Opinion in Food Science*. 2022;43:27-35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.09.004>.
9. Fernandez-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009;45(6-7):405-418. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.009>.
10. Remonato D., Miotti R.H., Monti R., Bassan J.C., de Paula A.V. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: a review. *Process Biochemistry*. 2022;114:1-20. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>.
11. Sampaio C.S., Angelotti J.A.F., Fernandez-Lafuente R., Hirata D.B. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: problems and prospects – a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;215:434-449. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.139>.
12. Quayson E., Amoah J., Hama S., Kondo A., Ogi-no C. Immobilized lipases for biodiesel production: current and future greening opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020;134:110355. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110355>.
13. Manan F.M.A., Attan N., Zakaria Z., Mahat N.A., Wahab R.A. Insight into the *Rhizomucor miehei* lipase supported on chitosan-chitin nanowhiskers assisted esterification of eugenol to eugenyl benzoate. *Journal of Biotechnology*. 2018;280:19-30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.015>.
14. Alves dos Santos L., Alnoch R.C., Soares G.A., Mitchell D.A., Krieger N. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on chitosan crosslinked with polyaldehyde starch for kinetic resolution of sec-alcohols. *Process Biochemistry*. 2022;122:238-247. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.014>.
15. Costa-Silva T.A., Carvalho A.K.F., Souza C.R.F., Freitas L., De Castro H.F., Oliveira W.P. Highly effective *Candida rugosa* lipase immobilization on renewable carriers: Integrated drying and immobilization process to improve enzyme performance. *Chemical Engineering Research and Design*. 2022;183:41-55. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.04.026>.
16. Pourkhanali K., Khayati G., Mizani F., Raouf F. Characterization of free and immobilized lipase from *Penicillium* sp. onto three modified bentonites: a comparative study. *Journal of Biotechnology*. 2022;344:57-69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.12.013>.
17. Tan Z., Bilal M., Li X., Ju F., Teng Y., Iqbal H.M.N. Nanomaterial-immobilized lipases for sustainable recovery of biodiesel – a review. *Fuel*. 2022;316:123429. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123429>.
18. Kovalenko G., Perminova L., Beklemishev A. Heterogeneous biocatalytic esterification by recombinant *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on macroporous carbon aerogel. *Catalysis Today*. 2021;379:36-41. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.018>.
19. Moguei M.R.S., Habibi Z., Shahedi M., Yousefi M., Alimoradi A., Mobini S., et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase through isocyanide-based multi component reaction on multi-walled carbon nanotube: application for kinetic resolution of rac-ibuprofen. *Biotechnology Reports*. 2022;35:e00759. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00759>.
20. Sun Y., Guo M., Hu S., Fang X., Jin Z., Wu R. Nanosurface-immobilized lipase and its degradation of phthalate wastewater. *Molecular Catalysis*. 2022;529:112522. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112522>.
21. Badoei-dalfard A., Tahami A., Karami Z. Lipase immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide/chitosan/cellulose acetate electrospun nanofibrous membranes and its application on the synthesis of benzyl acetate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022;209:112151. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112151>.
22. Ghide M.K., Li K., Wang J., Abdulmalek S.A., Yan Y. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on magnetic multiwalled carbon nanotubes towards the synthesis of structured lipids rich in sn-2 palmitic acid and sn-1,3 oleic acid (OPO) for infant formula use. *Food Chemistry*. 2022;390:133171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133171>.
23. Yu D., Li Z., Zhou X., Wang W., Wang L., Liu T., et al. Study on the modification of magnetic graphene oxide and the effect of immobilized lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;216:498-509. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.203>.
24. Bilal M., Iqbal H.M.N. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;130:462-482. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152>.
25. Sharma A., Thatai K.S., Kuthiala T., Singh G., Arya S.K. Employment of polysaccharides in enzyme immobilization. *Reactive and Functional Polymers*. 2021;167:105005. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105005>.
26. Vassiliadi E., Aridas A., Schmitt V., Xenakis A., Zoumpanti M. (Hydroxypropyl)methyl cellulose-chitosan film as a matrix for lipase immobilization: operational and morphological study. *Molecular Catalysis*. 2022;522:112252. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112252>.
27. Kholnazarov B.A., Turaev H.H., Nazarov Yu.E. Synthesis of hydrogels based on starch biomaterials and sodium-carboxymethylcellulose. *Universum: khimiya i biologiya*. 2020;(10):57-60. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Максимова Юлия Геннадьевна,
д.б.н., заведующая лабораторией,
Институт экологии и генетики микроорганизмов
УрО РАН – филиал Пермского федерального
исследовательского центра УрО РАН,
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13,
Российская Федерация;
профессор,
Пермский государственный национальный
исследовательский университет,
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
✉yul_max@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1870-1369>

Пьянкова Екатерина Валерьевна,
студент,
Пермский государственный национальный иссле-
довательский университет,
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация;
инженер,
Институт экологии и генетики микроорганизмов
УрО РАН – филиал Пермского федерального иссле-
довательского центра УрО РАН,
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13,
Российская Федерация,
19katya991@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0670-3829>

Елисеева Анна Дмитриевна,
студент,
Пермский государственный национальный
исследовательский университет,
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
liamrik@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6990-1902>

Щетко Виталий Анатольевич,
к.б.н., начальник отдела «Научно-производственный
центр биотехнологий»,
Институт микробиологии НАН Беларуси,
220141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 2,
Республика Беларусь,
vental@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6322-5755>

Максимов Александр Юрьевич,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Институт экологии и генетики микроорганизмов
УрО РАН – филиал Пермского федерального
исследовательского центра УрО РАН,
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13,
Российская Федерация;
доцент,
Пермский государственный национальный
исследовательский университет,
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
almaks1@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2591-3351>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuliya G. Maksimova,
Dr. Sci. (Biology), Head of the Laboratory,
Institute of Ecology and genetics of Microorganisms,
Perm Federal Research Center,
13, Golev St., Perm, 614081,
Russian Federation;
Professor,
Perm State University,
15, Bukirev St., Perm, 614068,
Russian Federation,
✉yul_max@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1870-1369>

Ekaterina V. Pyankova,
Student,
Perm State University,
15, Bukirev St., Perm, 614068,
Russian Federation;
Engineer,
Institute of Ecology and genetics of Microorganisms,
Perm Federal Research Center,
13, Golev St., Perm, 614081,
Russian Federation,
19katya991@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0670-3829>

Anna D. Eliseeva,
Student,
Perm State University,
15, Bukirev St., Perm, 614068,
Russian Federation,
liamrik@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6990-1902>

Vitaly A. Shchetko,
Cand. Sci. (Biology), Head of the Department
«Research and Production Center
for Biotechnology»,
Institute of Microbiology, National Academy
of Sciences of Belarus,
2, Ak. Kuprevich St., Minsk, 220141,
Republic of Belarus,
vental@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6322-5755>

Alexander Yu. Maksimov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Institute of Ecology and genetics of Microorganisms,
Perm Federal Research Center,
13, Golev St., Perm, 614081,
Russian Federation;
Associate Professor,
Perm State University,
15, Bukirev St., Perm, 614068,
Russian Federation,
almaks1@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2591-3351>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 23.01.2023.
Одобрена после рецензирования 18.07.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 23.01.2023.
Approved after reviewing 18.07.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.