

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ

DOI: 10.15593/2224-9400/2021.2.01

УДК 579.6

**А.В. Ахова^{1,2}, В.И. Сагидуллина¹,
Р.А. Хасанова¹, А.Г. Ткаченко²**

¹Пермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов
УрО РАН, Пермь, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИЗИНДЕКАРБОКСИЛАЗ ИЗ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*

*Лизиндекарбоксилазы катализируют конверсию лизина в 1,5-диаминопентан и могут быть использованы в качестве биокатализаторов для направленного синтеза данного диамина, который, в свою очередь, применяется для производства полиамидов. Поскольку лизиндекарбоксилазы являются цитоплазматическими белками, для их выделения необходимо разрушить клеточную оболочку. Применяют различные методы дезинтеграции микробных клеток, в том числе механические, ультразвуковые, химические, энзиматические и биологические. Обработка ультразвуком (соникация) является простым, воспроизводимым способом выделения белков, позволяющим сохранить их ферментативную активность. Целью данной работы является подбор условий ультразвуковой дезинтеграции клеток *Escherichia coli* с использованием ультразвукового процессора CPX 130 («Cole-Parmer Instruments»), обеспечивающих наибольший выход белка с сохранением его каталитической активности. В ходе исследования выявлена прямая зависимость эффективности разрушения бактериальных клеток от амплитуды ультразвука и времени соникации. Установлено, что наибольшее количество белка содержат бесклеточные экстракты, полученные при обработке клеток ультразвуком с амплитудой 40–50 %. При обработке бактериальных клеток ультразвуком с амплитудой более 50 % наблюдалось снижение каталитической активности лизиндекарбоксилазы. Ультразвук оказывал более выраженное негативное влияние на лизиндекарбоксилазную активность, измеренную при pH = 5,5 (что соответствует активности фермента CadA у *E. coli*) по сравнению с таковой при pH = 7,5 (что соответствует активности фермента Ldc у *E. coli*). Для используемого в исследовании оборудования предложены следующие условия ультразвуковой дезинтеграции: амплитуда ультразвука 40 %, частота звука 20 кГц, продолжительность одного цикла обработки – 30 с, с последующим охлаждением в течение не менее 30 с, общее время обработки – 2 мин.*

Ключевые слова: соникация, лизиндекарбоксилаза, кадаверин, выделение ферментов.

**A.V. Akhova^{1,2}, V.I. Sagidullina¹,
R.A. Khasanova¹, A.G. Tkachenko²**

¹Perm National Research Polytechnic University,
Perm, Russian Federation

²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
UB RAS, Perm, Russian Federation

APPLICATION OF ULTRASONIC DISINTEGRATION FOR EXTRACTION OF LYSINE DECARBOXYLASES FROM *ESCHERICHIA COLI* CELLS

*Lysine decarboxylases are used as biocatalysts for conversion of lysine to 1,5-diaminopentane, which in turn is applied for polyamide synthesis. Since lysine decarboxylase is a cytoplasmic protein, it requires cell envelope destruction to extract it. There are various methods of microbial cell disintegration including mechanical, ultrasonic, chemical, enzymatic and biological ones. Ultrasonic treatment (sonication) is a simple and reproducible way to isolate proteins while maintaining their enzymatic activity. The study was aimed at optimizing the ultrasonic disintegration procedure of *Escherichia coli* cells which could provide the highest yield of the protein while maintaining its catalytic activity using the ultrasonic processor CPX130 (Cole-Parmer Instruments). A direct dependence of the efficiency of destruction of bacterial cells both on the amplitude of ultrasound and the time of sonication was shown. The highest amount of protein was found in cell-free extracts obtained by treating cells with ultrasound with the amplitude of 40-50 %. When bacterial cells were treated with ultrasound with an amplitude of more than 50 %, the catalytic activity of lysine decarboxylases decreased. Sonication had a higher negative effect on lysine decarboxylase activity measured at pH 5.5 (which corresponds to the activity of the CadA enzyme in *E. coli*) compared to that at pH 7.5 (which corresponds to the activity of the LdcC enzyme in *E. coli*). For the equipment used in the study, the following sonication conditions were proposed: amplitude 40 %, a sonication cycle equals to 30 s followed by cooling for at least 30 s, total sonication time – 2 min.*

Keywords: *sonication, lysine decarboxylase, cadaverine, enzyme extraction.*

Одним из современных направлений биотехнологии является разработка способов получения целевых веществ посредством микробного биосинтеза. В частности, 1,5-диаминопентан, используемый для производства полиамидов, может быть синтезирован бактериями в ходе лизиндекарбоксилазной реакции [1]. Разрабатываемые сегодня биотехнологии синтеза 1,5-диаминопентана основаны на использовании цельноклеточных биокатализаторов, представляющих собой генно-модифицированные микроорганизмы, или выделенных ферментов [2–6]. Ключевым ферментом синтеза 1,5-диаминопентана является лизиндекарбоксилаза, которая может быть представлена двумя изофор-

мами, одна из которых активна при нейтральном рН среды, а другая имеет оптимум рН, близкий к 5,5 [7–9].

Лизиндекарбоксилаза является цитоплазматическим белком, поэтому для ее выделения необходимо разрушить клеточную оболочку. Существуют разные методы дезинтеграции микробных клеток, в том числе баллистические, гидро- и криоэкструзионные, ультразвуковые (УЗ), химические и энзиматические, а также биологические [10, 11]. УЗ-обработка (соникация) является простым, воспроизводимым, относительно дешевым способом выделения белков, позволяющим сохранить их ферментативную активность. Полученный методом УЗ-обработки грубый клеточный экстракт может быть использован для определения лизиндекарбоксилазной активности при первичном скрининге или для последующих этапов фракционирования и очистки с целью выделения очищенных ферментных препаратов.

В данной работе проведен подбор условий УЗ-обработки клеток *Escherichia coli* для получения бесклеточного экстракта с целью определения лизиндекарбоксилазной активности.

Экспериментальная часть. В качестве объекта использован штамм *Escherichia coli* RO91 (MC4100 λ RZ5:*rpoS742::lacZ*[hybr]), любезно предоставленный профессором Р. Хенгге [12]. Клетки, сохраняемые на скошенном агаре LB, вносили в 50 мл бульона LB с добавкой 25 мкг/мл стрептомицина и культивировали при 37 °С и скорости вращения 100 оборотов/мин с использованием термостатируемого шейкера 1092 (GFL, Германия) в течение 18–20 ч.

Полученную культуру центрифугировали (3600 g, 8 мин, 0 °С), осадок ресуспендировали в цитратно-фосфатном буфере (100 мМ, рН 7,5). Процедуру отмывки повторяли дважды. 1 мл полученной суспензии клеток переносили в микропробирки объемом 2 мл и подвергали УЗ-обработке, после чего отбирали аликвоты для определения лизиндекарбоксилазной активности, количества колониеобразующих единиц (КОЕ) и концентрации белка. Для сохранения нативной конформации и ферментативной активности белка подготовку суспензии клеток и обработку ее ультразвуком проводили на ледяной бане.

Для УЗ-обработки суспензии клеток использовали ультразвуковой процессор CPX 130 (Cole-Parmer Instruments, США) с диаметром щупа 6 мм. Данный прибор позволял варьировать амплитуду колебаний и время обработки, в то время как частота являлась предустановленным параметром и равнялась 20 кГц.

Лизиндекарбоксилазную активность определяли в грубом клеточном экстракте после дополнительного центрифугирования озвученной суспензии клеток (16000 g, 20 мин, 0 °С). Реакционная смесь включала 100 мМ цитратно-фосфатный буфер с заданным рН (7,5 или 5,5), 0,04 мМ пиридоксальфосфат, 1 мМ дитиотрейтол, 10 мМ L-лизин и супернатант, содержащий 50–100 мкг белка, в конечном объеме 0,5 мл. Активность оценивали по скорости образования 1,5-диаминопентана, количественный анализ которого проводили методом ТСХ после предварительной дериватизации дансил-хлоридом [13, 14].

Количество белка определяли методом Лоури [15].

Для оценки количества КОЕ готовили несколько последовательных разведений озвученной суспензии клеток в физрастворе и высевали по 10 мкл на агар LB в чашках Петри. Чашки инкубировали при 37 °С 18–20 ч, после чего производили подсчет количества колоний.

Результаты и их обсуждение. Задачей данного исследования являлся подбор условий УЗ-обработки бактериальных клеток, позволяющих получить наибольшее количество белка, сохранив его ферментативную активность, с наименьшими затратами времени и ресурсов.

На первом этапе работы оценивали эффективность разрушения клеток при разных условиях УЗ-обработки, варьируя амплитуду колебаний, продолжительность одного цикла и общее время озвучивания. Представленные в табл. 1 данные демонстрируют обратную зависимость между количеством жизнеспособных клеток и величиной амплитуды колебаний и временем обработки. Наиболее эффективно разрушение клеток происходило при обработке УЗ с амплитудой 60 %, но стоит отметить, что в данных условиях довольно часто наблюдалось вспенивание обрабатываемой суспензии клеток, что, как известно, приводит к потере активности выделяемых ферментов. Кроме того, при длительной обработке УЗ (1 мин) суспензия клеток существенно нагревалась. Следовательно, несмотря на то, что эффективность разрушения клеток напрямую зависела от времени УЗ-обработки, при продолжительном воздействии можно было ожидать потерю ферментативной активности белков. С учетом полученных данных все дальнейшие манипуляции проводили на ледяной бане в следующем режиме: УЗ-обработка (30 с) – охлаждение (не менее 30 с).

Последующие эксперименты показали, что наибольшее количество белка содержат экстракты, полученные после 4–6 30-секундных циклов обработки УЗ с амплитудой 40 % (рисунок).

Таблица 1

Влияние режима УЗ-обработки на количество колониобразующих единиц (КОЕ/мл) в суспензии клеток

Количество циклов	Режим соникации			
	Амплитуда 40 %, T цикла = 30 с	Амплитуда 50 %, T цикла = 30 с	Амплитуда 50 %, T цикла = 60 с	Амплитуда 60 %, T цикла = 30 с
1	$>10^7$	$>10^7$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^3$	$>10^7$
2	$>10^7$	$>10^7$	$(3,3 \pm 5,8) \times 10^1$	$(3,3 \pm 0,6) \times 10^6$
3	$>10^7$	$(3,3 \pm 0,7) \times 10^6$	$(1,7 \pm 0,6) \times 10^3$	$(1,3 \pm 0,3) \times 10^6$
4	$(4,0 \pm 1,1) \times 10^6$	$(5,4 \pm 4,8) \times 10^5$	$(3,3 \pm 1,5) \times 10^2$	$(9,4 \pm 8,9) \times 10^4$
5	$(2,2 \pm 1,4) \times 10^6$	$(9,9 \pm 6,5) \times 10^4$	$(5,0 \pm 7,1) \times 10^1$	$(5,7 \pm 0,8) \times 10^4$
6	$(4,6 \pm 4,7) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,8) \times 10^4$	$(6,7 \pm 5,7) \times 10^1$	$(2,7 \pm 0,4) \times 10^4$
7	$(2,3 \pm 3,1) \times 10^5$	$(4,3 \pm 2,8) \times 10^3$	0	$(5,3 \pm 2,1) \times 10^2$
8	$(1,2 \pm 1,8) \times 10^5$	$(4,4 \pm 6,6) \times 10^3$	0	$(6,3 \pm 4,2) \times 10^2$

Примечание. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Исходное количество КОЕ/мл = $(4,2 \pm 2,8) \times 10^9$.

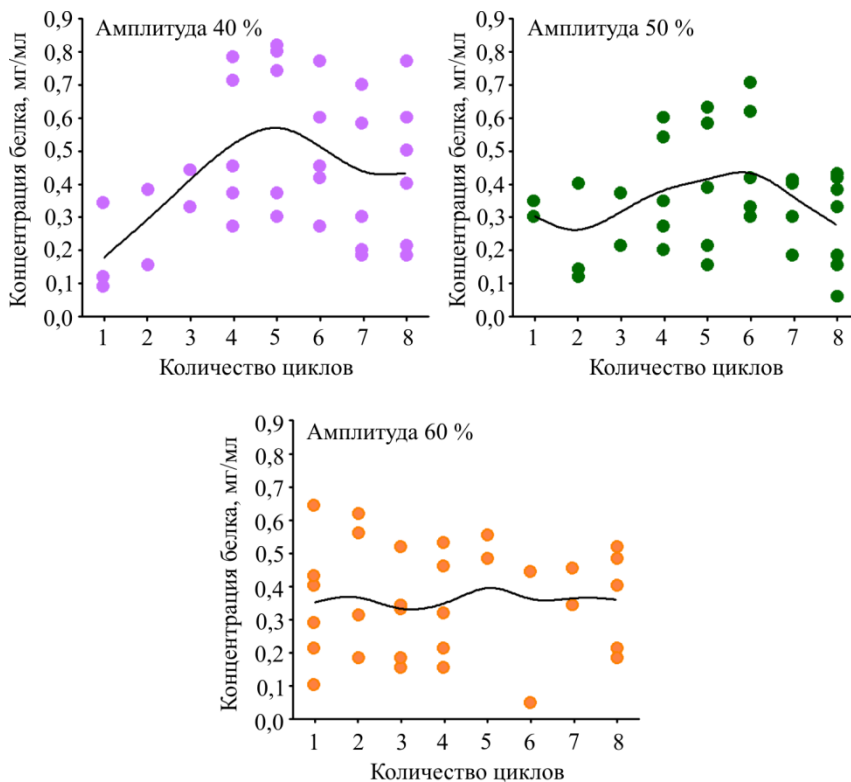


Рис. Количество белка в лизате клеток *E. coli* в зависимости от амплитуды УЗ и количества повторений 30-секундных циклов обработки.

Кривые – линии тренда, вычисленные методом наименьших квадратов

Низкие концентрации белка в экстрактах, полученных после 1–3 циклов такой обработки, связаны с недостаточным разрушением клеток. В то же время снижение количества белка в экстрактах клеток, подвергнутых более чем 6 циклам обработки УЗ с амплитудой 40 % или действию УЗ с более высокой амплитудой, можно объяснить нарушением структуры белков.

На следующем этапе было изучено влияние режима УЗ обработки бактериальной суспензии на активность выделяемых ферментов (табл. 2). Как показал статистический анализ результатов, обработка бактериальных клеток ультразвуком с амплитудой равной 40 % в течение 6 30-секундных циклов существенно не влияет на активность выделяемого фермента, так как статистически значимых отличий средних сравниваемых групп данных не выявлено. При более высоких амплитудах, т.е. при 50 и 60 %, наблюдалось снижение ферментативной активности с увеличением количества циклов соникации.

Таблица 2

Влияние режима УЗ-обработки на лизиндекарбоксилазную активность в грубом клеточном экстракте

Амплитуда, %	Количество циклов (T цикла = 30 с)	Лизиндекарбоксилазная активность, %	
		pH 7,5	pH 5,5
40	1	71 ± 19	80 ± 29
	2	68 ± 24	76 ± 28
	3	53 ± 14	85 ± 13
	4	61 ± 17	99 ± 1
	5	100 ± 0	75 ± 6
	6	71 ± 25	86 ± 14
50	1	98 ± 2	71 ± 5
	2	81 ± 1	71 ± 16
	3	91 ± 7	90 ± 14
	4	92 ± 7	93 ± 10
	5	87 ± 1	64 ± 16
	6	71 ± 20*	49 ± 17*
60	1	97 ± 4	100 ± 0
	2	82 ± 24	65 ± 3*

Примечание. Данные представлены как % от максимальной активности при данных условиях соникации (среднее ± стандартное отклонение). * – статистически значимое отличие от максимальной активности при данных условиях соникации (критерий Дункана, $p < 0,05$).

Следует отметить, что ультразвук оказывал более выраженное негативное влияние на лизиндекарбоксилазную активность, измеренную при pH = 5,5 (что соответствует активности фермента CadA у *E. coli*) по сравнению с таковой при pH = 7,5 (что соответствует активности фермента LdcC у *E. coli*). Это позволяет предположить, что индуцибельная лизиндекарбоксилаза CadA менее устойчива к воздействию УЗ по сравнению с конститутивной формой фермента LdcC.

Заключение. По результатам работы для выделения в лабораторных условиях белков из клеток *E. coli* с сохранением их лизиндекарбоксилазной активности с использованием УЗ-дезинтегратора СРХ 130 с диаметром щупа 6 мм предложены следующие условия: амплитуда 40 %, ледяная баня, продолжительность одного цикла обработки – 30 с, с последующим охлаждением в течение не менее 30 с, количество циклов – 4.

Авторы выражают благодарность профессору Р. Хенгге (Берлинский университет им. Гумбольдта, Германия) за предоставленные штаммы E. coli.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ АААА-А19-119112290009-1).

Список литературы

1. Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase / D. Sabo, E.A. Boeker, B. Byers, H. Waron, E.H. Fischer // Biochemistry. – 1974. – Vol. 13. – P. 662–670.
2. From zero to hero – Production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum* / S. Kind, S. Neubauer, J. Becker, M. Yamamoto, M. Völkert, G. Abendroth, O. Zelder, C. Wittmann // Metabolic Engineering. – 2014. – Vol. 25. – P. 113–123.
3. Development of engineered *Escherichia coli* whole-cell biocatalysts for high-level conversion of L-lysine into cadaverine / Y.H. Oh, K.H. Kang, M.J. Kwon, J.W. Choi, J.C. Joo, S.H. Lee [et al.] // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Vol. 42, no. 11. – P. 1481–1491.
4. Advances in cadaverine bacterial production and its applications / W. Ma, K. Chen, Y. Li, N. Hao, X. Wang, P. Ouyang // Engineering. – 2017. – Vol. 3. – P. 308–317.
5. Park S.H., Soetyono F., Kim H.K. Cadaverine production by using cross-linked enzyme aggregate of *Escherichia coli* lysine decarboxylase // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2017. – Vol. 27, no. 2. – P. 289–296.

6. Cadaverine production from L-lysine with chitin-binding protein-mediated lysine decarboxylase immobilization / N. Zhou, A. Zhang, G. Wei, S. Yang, S. Xu, K. Chen, P. Ouyang // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 103.
7. Morris D., Fillingame R. Regulation of amino acid decarboxylation // *Annual Review of Biochemistry*. – 1974. – Vol. 43. – P. 303–321.
8. Meng S.Y., Bennett G.N. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: a system for neutralization of low extracellular pH // *Journal of Bacteriology*. – 1992. – Vol. 174, no. 8. – P. 2659–2669.
9. Kikuchi Y., Kurahashi O., Nagano T. RpoS-dependent expression of the second lysine decarboxylase gene in *Escherichia coli* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 1997. – Vol. 62, no. 6. – P. 1267–1270.
10. Шапхаев Э.Г., Цыренов В.Ж., Чебунина В.И. Дезинтеграция клеток в биотехнологии: учеб. пособие. – Улан-Удэ, 2005. – 97 с.
11. Уилсон К., Уолкер Дж. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2015. – 848 с.
12. Heat shock regulation of sigmaS turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by sigmaS and sigma32 in *Escherichia coli* / A. Muffler, M. Barth, C. Marschall, R. Hengge-Aronis // *Journal of Bacteriology*. – 1997. – Vol. 179, no. 2. – P. 445–452.
13. Чудинов А.А., Чудинова Л.А., Коробов В.П. Метод определения низкомолекулярных олигоаминов в различном биологическом материале // *Вопросы медицинской химии*. – 1984. – № 4. – С. 127–132.
14. Ткаченко А.Г., Шумков М.С., Ахова А.В. Адаптивные функции полиаминов *E. coli* при сублетальных воздействиях антибиотиков // *Микробиология*. – 2009. – Т. 78, № 1. – С. 32–41.
15. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.G. Randall // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.

References

1. Sabo D., Boeker E.A., Byers B., Waron H., Fischer E.H. Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Biochemistry*, 1974, vol. 13, pp. 662–670.
2. Kind S., Neubauer S., Becker J., Yamamoto M., Völkert M., Abendroth G., Zelder O., Wittmann C. From zero to hero – Production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, 2014, vol. 25, pp. 113–123.
3. Oh Y.H., Kang K.H., Kwon M.J., Choi J.W., Joo J.C., Lee S.H., *et al.* Development of engineered *Escherichia coli* whole-cell biocatalysts for high-level conversion of L-lysine into cadaverine. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2015, vol. 42, no. 11, pp. 1481–1491.

4. Ma W., Chen K., Li Y., Hao N., Wang X., Ouyang P. Advances in cadaverine bacterial production and its applications. *Engineering*, 2017, vol. 3, pp. 308–317.

5. Park S.H., Soetyono F., Kim H.K. Cadaverine production by using cross-linked enzyme aggregate of *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, vol. 27, no. 2, pp. 289–296.

6. Zhou N., Zhang A., Wei G., Yang S., Xu S., Chen K., Ouyang P. Cadaverine production from L-lysine with chitin-binding protein-mediated lysine decarboxylase immobilization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, vol. 8, pp. 103.

7. Morris D., Fillingame R. Regulation of amino acid decarboxylation. *Annual Review of Biochemistry*, 1974, vol. 43, pp. 303–321.

8. Meng S.Y., Bennett G.N. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *Journal of Bacteriology*, 1992, vol. 174, no. 8, pp. 2659–2669.

9. Kikuchi Y., Kurahashi O., Nagano T. RpoS-dependent expression of the second lysine decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, vol. 62, no. 6, pp. 1267–1270.

10. Shapkhaev E.G., Tsyrenov V.Zh., Chebunina V.I. Dezintegratsiia kletok v biotekhnologii [Cell disintegration in biotechnology]. Ulan-Ude, Vostochno-Sibirskii Gosudarstvennyi Universitet Tekhnologii i Upravleniia, 2005, pp. 97.

11. Wilson K., Walker J. Printsipy i metody biokhimii i molekuliarnoi biologii [Principles and methods of biochemistry and molecular biology]. Moscow, BINOM, Knowledge Laboratory, 2015, pp. 848.

12. Muffler A. Barth M., Marschall C., Hengge-Aronis R. Heat shock regulation of sigmaS turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by sigmaS and sigma32 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1997, vol. 179, no. 2, pp. 445–452.

13. Chudinov A.A., Chudinova L.A., Korobov V.P. Metod opredeleniia nizkomolekuliarnykh oligoaminov v razlichnom biologicheskom material [Method for the determination of low molecular weight oligoamines in various biological materials]. *Voprosy meditsinskoi khimii*, 1984, no 4, pp. 127–132.

14. Tkachenko A.G., Shumkov M.S., Akhova A.V. Adaptivnye funktsii poliaminov *E. coli* pri subletal'nykh vozdeistviiakh antibiotikov [Adaptive functions of *E. coli* polyamines under sublethal effects of antibiotics]. *Microbiology*, 2009, iss. 78, no. 1, pp. 32–41.

15. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.G. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, pp. 265–275.

Получено 15.04.2021

Об авторах

Ахова Анна Викторовна (Пермь, Россия) – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (614015, г. Пермь, ул. Ленина, 11); доцент кафедры «Химия и биотехнология» Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: akhovan@mail.ru).

Сагидуллина Вероника Илнуровна (Пермь, Россия) – студент бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология» Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: veronikabarda@mail.ru).

Хасанова Русана Аликовна (Пермь, Россия) – студент бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология» Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: Rusanochik@yandex.ru).

Ткаченко Александр Георгиевич (Пермь, Россия) – доктор медицинских наук, завлабораторией адаптации микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (614015, г. Пермь, ул. Ленина, 11, e-mail: agtkachenko@iegm.ru).

About the authors

Anna V. Akhova (Perm, Russian Federation) – Ph.D. in Biological Sciences, Researcher of Laboratory of Microbial Adaptation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS (11, Lenin str., Perm, 614015); Associate Professor of the Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990, e-mail: akhovan@mail.ru).

Veronika I. Sagidullina (Perm, Russian Federation) – Bachelor's student of the Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990, e-mail: veronikabarda@mail.ru).

Rusana A. Khasanova (Perm, Russian Federation) – Bachelor's student of the Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990, e-mail: Rusanochik@yandex.ru).

Alexander G. Tkachenko (Perm, Russian Federation) – Doctor of Medical Sciences, Head of Laboratory of Microbial Adaptation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS (11, Lenin str., Perm, 614015, e-mail: agtkachenko@iegm.ru).