

УДК 579.695

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-479-484>



Получение полигидроксиалканоата с помощью культуры *Pseudomonas helmanticensis* в нестерильных средах, содержащих глицерин и додецилсульфат натрия

Илья Николаевич Зубков*, Юрий Сергеевич Букин**,
Павел Николаевич Сорокоумов*, Сергей Михайлович Шишлянников*

*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ Пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Зубков Илья Николаевич, zub-i@bk.ru

Аннотация. Получаемые биосинтетическим путем с помощью бактерий *Pseudomonas* поли-3-гидроксиалканоаты (ПГА) являются перспективной заменой традиционных пластиков. Снизить стоимость производства ПГА за счет уменьшения энергозатрат можно при использовании питательных сред, не прошедших паровую стерилизацию. Культивирование бактерий *Pseudomonas*, устойчивых к додецилсульфату натрия (SDS), на содержащих SDS нестерильных средах позволяет получить биомассу, состоящую преимущественно из продуцента ПГА. При этом SDS играет роль антимикробного агента, подавляющего рост посторонних микроорганизмов. В настоящей работе использовалась SDS-устойчивая культура *Pseudomonas helmanticensis* и среды, содержащие глицерин и SDS. Концентрации источников углерода (глицерин) и азота оптимизированы с помощью эксперимента, поставленного по центральному композиционному ротатабельному плану. Варьировались концентрация субстрата С и соотношение С/Н между содержанием в среде глицерина и источника азота. Построение зависимости степени конверсии субстрата в ПГА от С и С/Н проводилось в среде программирования R. Построенная модель адекватно описывает экспериментальные данные при уровне значимости 0,05 (дисперсия адекватности регрессионного уравнения $4,1 \times 10^{-2}$, $R^2=0,98$). Рассчитанная с помощью модели степень конверсии глицерина в ПГА составляет $6,9 \pm 0,4\%$. В оптимизированных условиях (0,61 г/л источника азота, 8,4 г/л глицерина, 96 ч) *P. helmanticensis* конвертирует 7,0% субстрата в ПГА со средней длиной мономерных звеньев. С помощью метагеномного анализа 16S рРНК показано, что доля посторонних бактерий при культивировании *P. helmanticensis* на нестерильной среде, содержащей 0,5 г/л SDS, составляет 2%.

Ключевые слова: *Pseudomonas helmanticensis*, полигидроксиалканоаты, культивирование в нестерильных средах, додецилсульфат натрия, глицерин

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (проект FGUS 2022-0003).

Для цитирования: Зубков И. Н., Букин Ю. С., Сорокоумов П. Н., Шишлянников С. М. Получение полигидроксиалканоата с помощью культуры *Pseudomonas helmanticensis* в нестерильных средах, содержащих глицерин и додецилсульфат натрия // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 479–484. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-479-484>.

BRIEF COMMUNICATION

Preparation of polyhydroxyalkanoates using *Pseudomonas helmanticensis* in non-sterile media containing glycerol and sodium dodecyl sulfate

Ilya N. Zubkov*, Yurii S. Bukin**, Pavel N. Sorokoumov*, Sergey M. Shishlyannikov*

*All-Russian Research Institute for Food Additives, Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems (RAS), Saint Petersburg, Russian Federation

**Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Corresponding author: Ilya N. Zubkov, zub-i@bk.ru

Abstract. Biosynthetically-produced *Pseudomonas* poly-3-hydroxyalkanoates (PHAs) are a promising substitute for conventional plastics. Costs involved with the production of PHAs can be reduced by optimizing power consumption, which can be achieved using nutrient media without preliminary steam sterilization. Cultivation of *Pseudomonas* bacteria resistant to sodium dodecyl sulfate (SDS) on SDS-containing non-sterile media yields a biomass consisting predominantly of a PHA producer. SDS plays the role of an antimicrobial agent that inhibits the growth of foreign microorganisms. In this work, an SDS-resistant culture of *Pseudomonas helmanticensis* and media containing glycerol and SDS were used. The concentrations of carbon (glycerol) and nitrogen sources were optimized using an experiment performed according to a central composite rotatable design. The concentration of substrate C and the C/N ratio between the glycerol and nitrogen content were varied. The dependence of the degree of substrate conversion in PHA on C and C/N was derived in the R programming environment. The constructed model adequately describes the experimental data at a significance level of 0.05 (adequacy variance of the regression equation 4.1×10^{-2} ; $R^2=0.98$). According to the constructed model, the conversion of glycerol to PHA equals $6.9 \pm 0.4\%$. Under optimized conditions (0.61 g/L nitrogen source; 8.4 g/L glycerol; 96 h), *P. helmanticensis* converts 7.0% of the substrate to PHA with an average monomer unit length. Using a 16S rRNA metagenomic assay, the proportion of foreign bacteria in *P. helmanticensis* cultures on non-sterile media containing 0.5 g/L SDS was shown to be 2%.

Keywords: *Pseudomonas helmanticensis*, polyhydroxyalkanoates, cultivation in non-sterile media, sodium dodecyl sulfate, glycerol

Funding. The work was financially supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education (project FGUS 2022-0003).

For citation: Zubkov I. N., Bukin Yu. S., Sorokoumov P. N., Shishlyannikov S. M. Preparation of polyhydroxyalkanoates using *Pseudomonas helmanticensis* in non-sterile media containing glycerol and sodium dodecyl sulfate. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):479-484. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-479-484>.

ВВЕДЕНИЕ

Биополимеры обладают множеством преимуществ по сравнению с традиционными пластиками. Среди множества природных полимеров своими свойствами выделяются полигидроксиалканоаты (ПГА) – биоразлагаемые полиэфиры, продуцируемые бактериями *Pseudomonas* [1]. ПГА являются перспективной заменой синтетических полимеров. Тем не менее высокая стоимость производства ПГА ограничивает их применение. Множество современных работ посвящено вопросу снижения стоимости ПГА за счет использования дешевых сред для культивирования [2–4]. Однако значительную часть издержек составляют энергозатраты на проведение паровой стерилизации сред. Избежать стерилизации иногда можно при использовании сред с высокой концентрацией солей [5, 6]. В некоторых случаях можно применять другую стратегию: использовать среды, содержащие сильный ионный детергент (например, доде-

цилсульфат натрия, SDS) и продуцент, устойчивый к этому детергенту. Добавление SDS в среду для культивирования в количестве десятых долей грамма на литр позволяет подавить рост нежелательных микроорганизмов, большинство из которых подвержены действию детергента [7]. Существуют бактерии *Pseudomonas*, способные к накоплению ПГА в присутствии до 5 г/л SDS [8]. Такие продуценты являются наиболее перспективными с учетом возможности их культивирования на нестерильных SDS-содержащих средах. В качестве источника углерода при получении ПГА часто используют глицерин, образующийся в больших количествах при производстве биотоплива [9]. Большое влияние на продуктивность биосинтеза ПГА оказывает концентрация источника азота: его дефицит активирует накопление клеткой запасных метаболитов. Ограничение по азоту считается общепризнанной стратегией максимизации выхода ПГА [10]. Наилучшим источником азота

для культивирования бактерий *Pseudomonas* являются соли аммония – сульфат или хлорид [11]. Так как на выход полимера наибольшее влияние оказывают концентрации источников углерода и азота, эти два параметра наиболее целесообразно оптимизировать по методу Бокса–Уилсона [12, 13]. В качестве факторов оптимизации используют, как правило, концентрацию субстрата и отношение концентраций источника углерода и азота [14].

Целью настоящей работы была разработка процесса препаративного получения ПГА при периодическом культивировании SDS-устойчивой культуры *P. helmanticensis* на средах, содержащих глицерин и 0,5 г/л SDS, которые не подвергались паровой стерилизации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследований служила культура *P. helmanticensis*, выделенная из образца загрязненной почвы в Ленинградской области [15]. Культура хранится во Всероссийском научно-исследовательском институте пищевых добавок – филиале «ФНЦ Пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН.

Использованные в работе неорганические соли и глицерин имели степень чистоты analytical grade (Merck, Германия).

Выращивание инокулята (20 мл) и основное культивирование (100 мл) проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 мл на шейкере-инкубаторе при температуре 28 °C и скорости перемешивания 250 об/мин. Все среды для культивирования содержали 0,5 г/л SDS, 3 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2 г/л

Результаты экспериментов по оптимизации выхода поли-3-гидроксиалканоата

Results of the optimization experiments

№	C	N	C/N	w	q_{PHA}	№	C	N	C/N	w	q_{PHA}
1	5 (-1)	1,00	5 (-1)	12	4,3	9				25	6,5
2	15 (+1)	3,00	5 (-1)	14	3,7	10				25	6,3
3	5 (-1)	0,33	15 (+1)	35	6,3	11	10 (0)	1,00	10 (0)	26	6,5
4	15 (+1)	1,00	15 (+1)	34	5,9	12				25	6,5
5	2,93 (-√2)	0,29	10 (0)	25	6,0	13				25	6,8
6	17,07 (+√2)	1,71	10 (0)	24	4,8						
7	10 (0)	3,41	2,93 (-√2)	9	3,3						
8	10 (0)	0,59	17,07 (+√2)	37	6,7						

Примечание. Уровни факторов приведены в скобках. C – концентрация глицерина (г/л), N – концентрация источника азота (г/л), w – содержание ПГА в биомассе (%), q_{PHA} – степень конверсии глицерина в ПГА (%).

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и 0,01 г/л MgSO_4 . Содержание источника углерода (глицерин) и азота (смесь NH_4Cl и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в массовой пропорции 1:1) варьировалось согласно центральному композиционному ротатбельному плану эксперимента (табл.). Кислотность сред доводили до нейтрального значения (7,0) с помощью 1N раствора NaOH. По достижении культурой поздней стационарной фазы роста (96 ч после начала культивирования) биомассу отделяли центрифугированием (10 мин при $6800 \times g$) и высушивали. Выделение ПГА из сухой биомассы проводили по известной методике с помощью экстракции хлороформом и последующего осаждения полимера холодным этанолом [16].

Построение зависимости степени конверсии субстрата в ПГА от содержания глицерина (C) и отношения концентраций глицерина и источника азота (C/N) в среде осуществлялось в среде программирования R¹. Использовалась функция lm(). Адекватность модели оценивалась с помощью F-критерия Фишера.

Анализ мономерного состава полученного полимера проводился по методике [17], включающей стадии метанолиза образца (15% H_2SO_4

в метаноле, 4 ч, 100 °C), экстракции аналитов и их анализа методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии на приборе Varian 450-GC (Varian, США), снабженном колонкой WCOT fused silica 50m×0,25mm ID Coating CP-Wax 58 (Varian, США), и масс-спектрометрическим детектором Varian 240-MS (Varian, США). Условия хроматографического разделения аналогичны описанным в работе [17]. Количественное определение мономеров ПГА осуществлялось с помощью внутреннего стандарта (2-гидроксibenзойной кислоты).

Наличие посторонних бактерий при культивировании на нестерильной среде контролировалось с помощью метабаркодингового анализа образца ДНК, выделенного из культуры клеток на стационарной фазе роста. Фрагмент V3–V4 гена 16S rPHK был амплифицирован с помощью универсальных праймеров 343FL и 806R. Библиотеки для секвенирования по технологии Illumina MiSeq были подготовлены с помощью NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs, США). Расшифровка 16S rPHK проводилась на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием

¹R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing [Электронный ресурс]. URL: <https://www.R-project.org/> (17.03.22).

набора MiSeq Standard Kit v.3 (Illumina, США). Ампликоны анализировали с помощью программы Mothur v.1.47.0 по стандартной схеме MiSeq SOP [18]. Отфильтрованные последовательности были выровнены, сгруппированы и таксономически идентифицированы с использованием базы данных SILVA 123.

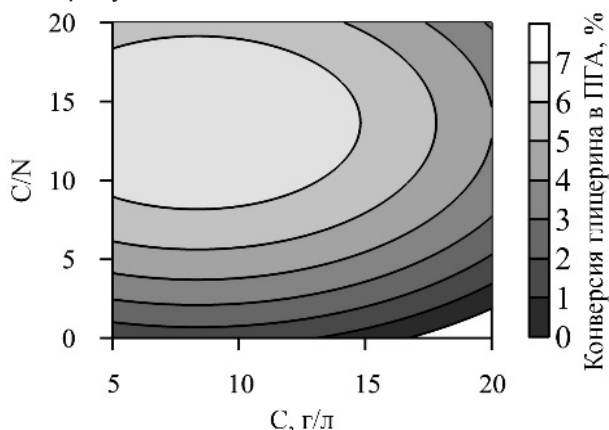
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты экспериментов по оптимизации концентраций источников углерода (C) и азота (N) приведены в таблице. На основе полученных данных построена функция (1), выражающая зависимость степени конверсии глицерина в ПГА (q_{PHA}) от концентраций субстрата (C) и соотношения (C/N).

$$q_{\text{PHA}}(\%) = 0,351C + 0,792C/N - 0,021C^2 - 0,029(C/N)^2, \quad (1)$$

где q_{PHA} – степень конверсии глицерина в ПГА, выраженная в процентах; C – концентрация глицерина (г/л); C/N – отношение концентраций глицерина и источника азота.

Контурная карта полученной функции показана на рисунке.



Контурная карта функции зависимости степени конверсии глицерина в поли-3-гидроксиалканоев от концентраций глицерина (C) и отношения (C/N)

Contour map of the dependence of glycerol conversion to PHA on glycerol concentration (C) and C/N ratio

Дисперсия воспроизводимости результатов эксперимента (рассчитана по культивированиям 9–13) составляет $3,1 \times 10^{-2}$, а дисперсия адекватности построенной регрессионной модели – $4,1 \times 10^{-2}$. Соответствующее значение F-критерия равно 1,3. Табличное значение F-критерия ($F_{\text{табл.}}(0,05; 5; 4) = 6,3$) превышает рассчитанное. Следовательно, при уровне значимости 0,05 построенная модель адекватно описывает экспериментальные данные. Наибольшая степень конверсии глицерина

в ПГА ($6,9 \pm 0,4\%$), согласно модели (1), должна наблюдаться при концентрациях субстрата 8,4 г/л и смеси солей аммония 0,61 г/л. Полуширина доверительного интервала данного значения (0,4%) рассчитана с помощью дисперсии воспроизводимости и критерия Стьюдента при уровне значимости 0,05. При культивировании *P. helmanticensis* в указанных условиях образуется 0,59 г/л ПГА (степень конверсии субстрата в продукт 7,0%).

Полученный в оптимизированных условиях (8,4 г/л глицерина; 0,61 г/л источника азота; 0,5 г/л SDS; время культивирования 96 ч) полимер состоит из остатков гидроксигексановой (7%), гидроксиктановой (46%), гидроксидекановой (25%) и гидроксидодекановой (25%) кислот, т. е. представляет собой образец ПГА со средней длиной мономерных звеньев (mcl-ПГА). Чистота выделенного образца полимера составляет около 99%.

Согласно результатам метагеномного анализа в сообществе, образующемся при культивировании *P. helmanticensis* в нестерильной среде, содержащей 8,4 г/л глицерина, 0,61 г/л источника азота и 0,5 г/л SDS, доля продуцента ПГА составляет 98%. Наличие SDS подавляет рост посторонних бактерий при культивировании *P. helmanticensis* в среде, содержащей глицерин. Это подавление усиливается биоактивными детергентами, которые присутствуют в культурах бактерий *Pseudomonas* [19]. Совместное действие SDS (на стационарной фазе роста) и биодетергентов (в течение всего периода роста), обладающих антимикробной активностью [19], обеспечивает низкую долю посторонних микроорганизмов при культивировании *P. helmanticensis* в нестерильной среде.

ВЫВОДЫ

Использование сред, содержащих глицерин и 0,5 г/л SDS, позволяет проводить периодическое культивирование *P. helmanticensis* в нестерильных условиях. Оптимизированы параметры проведения биосинтетического получения ПГА с помощью *P. helmanticensis* в нестерильной SDS-содержащей среде. При уровне значимости 0,05 построенная модель адекватно описывает экспериментальные данные (дисперсия адекватности регрессионного уравнения $4,1 \times 10^{-2}$; $R^2 = 0,98$). Оптимальная концентрация глицерина составляет 8,4 г/л, а источника азота (смесь сульфата и хлорида аммония 1:1) – 0,61 г/л. В этих условиях *P. helmanticensis* накапливает 0,59 г ПГА на литр среды, степень конверсии глицерина в ПГА составляет 7,0% (предсказанная моделью величина – $6,9 \pm 0,4\%$). С помощью метагеномного анализа 16S рРНК было показано, что *P. helmanticensis* преобладает в культурах, полученных в нестерильных условиях.

REFERENCES

1. Junyu Z., Shishatskaya E. I., Volova T. G., da Silva L. F., Chen G.-Q. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;86:144-150. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.035>.

2. Ruiz C., Kenny S. T., Narancic T., Babu R., O' Connor K. Conversion of waste cooking oil into medium chain polyhydroxyalkanoates in a high cell density

fermentation. *Journal of Biotechnology*. 2019;306:9-15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.08.020>.

3. Kumar M., You S., Beiyuan J., Tsang D. C. W., Luo G., Gupta J., et al. Lignin valorization by bacterial genus *Pseudomonas*: state-of-the-art review and prospects. *Bioresource Technology*. 2021;320:124412. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124412>.

4. Mannina G., Presti D., Montiel-Jarillo G., Carreira J., Suarez-Ojeda M. E. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: a review. *Bioresource Technology*. 2020;297:122478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.037>.

5. Marang L., van Loosdrecht M. C. M., Kleerebezem R. Combining the enrichment and accumulation step in non-axenic PHA production: cultivation of *Plasticumulans acidivorans* at high volume exchange ratios. *Journal of Biotechnology*. 2016;231:260-267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.016>.

6. Tan D., Xue Y.-S., Aibaidula G., Chen G.-Q. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresource Technology*. 2011;102(17):8130-8136. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.068>.

7. Johnston M. D., Simons E.-A., Lambert R. J. W. One explanation for the variability of the bacterial suspension test. *Journal of Applied Microbiology*. 2000;88(2):237-242. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00951.x>.

8. Nepomnyashchiy A. P., Shishlyannikov S. M., Shpironok O. G., Alekseeva A. A., Zubkov I. N., Sitnov V. Yu. Soil SDS-degrading bacterium *Pseudomonas helmanticensis* as a potential producer of polyhydroxyalkanoates. In: *Current trends of agricultural industry in global economy: XIX International Scientific and Practical Conference*. Kemerovo, 2021. p. 182-189. <https://doi.org/10.32743/agri.gl.econ.2020.182-189>.

9. Poblete-Castro I., Wittmann C., Nike P. I. Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species. *Microbial Biotechnology*. 2020;13(1):32-53. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13400>.

10. Sabapathy P. C., Devaraj S., Meixner K., Anburajan P., Kathirvel P., Ravikumar Y., et al. Recent developments in polyhydroxyalkanoates (PHAs) production in the past decade – a review. *Bioresource Technology*. 2020;306:123132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>.

11. Saranya V., Shenbagarathai R. Effect of nitrogen and calcium sources on growth and production of PHA of *Pseudomonas* sp. LDC-5 and its mutant. *Current Research Journal of Biological Sciences*. 2010;2(3):164-167.

12. Ojha N., Das N. A statistical approach to

optimize the production of polyhydroxyalkanoates from *Wickerhamomyces anomalus* VIT-NN01 using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;107:2157-2170. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.089>.

13. Zain N. F. M., Paramasivam M., Tan J. S., Lim V., Lee C. K. Response surface methodology optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Burkholderia cepacia* BPT1213 using waste glycerol from palm oil based biodiesel production. *Bio-technology Progress*. 2021;37(1):e3077. <https://doi.org/10.1002/btpr.3077>.

14. Pokoj T., Klimiuk E., Ciesielski S. Interactive effect of crude glycerin concentration and C:N ratio on polyhydroxyalkanoates accumulation by mixed microbial cultures modelled with response surface methodology. *Water Research*. 2019;156:434-444. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.033>.

15. Zubkov I. N., Nepomnyashchiy A. P., Kondratyev V. D., Sorokoumov P. N., Sivak K. V., Ramsay E. S., et al. Adaptation of *Pseudomonas helmanticensis* to fat hydrolysates and SDS: fatty acid response and aggregate formation. *Journal of Microbiology*. 2021;59(11):1104-1111. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1214-5>.

16. Rebocho A. T., Pereira J. R., Freitas F., Neves L. A., Alves V. D., Sevrin C., et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* grown in apple pulp waste. *Applied Food Biotechnology*. 2019;6(1):71-82. <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v6i1.21793>.

17. Kondratyev V. D., Goryacheva D. I., Nepomnyashchiy A. P., Zubkov I. N., Shishlyannikov S. M., Sorokoumov P. N. Quantitative analysis of medium-chain polyhydroxyalkanoates in bacterial cells via gas chromatography-mass spectrometry: classical method revision and optimization. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 2022;27(1):32-42. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2021.1992581>.

18. Kozich J. J., Westcott S. L., Baxter N. T., Highlander S. K., Schloss P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(17):5112-5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>.

19. Schlusshuber M., Godard J., Sebban M., Bernay B., Garon D., Seguin V., et al. Characterization of milkisin, a novel lipopeptide with antimicrobial properties produced by *Pseudomonas* sp. UCMA 17988 isolated from bovine raw milk. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:1030. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01030>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

И. Н. Зубков,
младший научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский
институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ
Пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ilya N. Zubkov,
Junior Researcher,
All-Russian Research Institute for Food Additives,
Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center
for Food Systems RAS,

191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Российская Федерация,
zub-i@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6533-8139>

Ю. С. Букин,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Лимнологический институт СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3,
Российская Федерация,
bukinyura@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4534-3846>

П. Н. Сорокоумов,
научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский
институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ
Пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН,
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Российская Федерация,
sorokoumov_pavel@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8767-3720>

С. М. Шишлянников,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский
институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ
Пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН,
191014, Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Российская Федерация,
sershilin@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6377-7445>

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 05.05.2022.
Одобрена после рецензирования 06.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.

55, Liteinyi Ave., St. Petersburg, 191014,
Russian Federation,
zub-i@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6533-8139>

Yurii S. Bukin,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Limnological Institute SB RAS,
3, Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
bukinyura@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4534-3846>

Pavel N. Sorokoumov,
Researcher,
All-Russian Research Institute for Food Additives,
Branch of V. M. Gorbato Federal Research Center
for Food Systems (RAS),
55, Liteinyi Ave., St. Petersburg, 191014,
Russian Federation,
sorokoumov_pavel@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8767-3720>

Sergey M. Shishlyannikov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
All-Russian Research Institute for Food Additives,
Branch of V. M. Gorbato Federal Research Center
for Food Systems (RAS),
55, Liteinyi Ave., St. Petersburg, 191014,
Russian Federation,
sershilin@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6377-7445>

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 05.05.2022.
Approved after reviewing 06.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.