

УДК 577.152.313

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФИТАЗЫ *Silvania hatchlandensis* ФГ 3.9.1

© 2025 г. К. Г. Семёнова^{1,2}, Ю. Г. Максимова^{1,3,*}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН — филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

²Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, 614990 Россия

³Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614068 Россия

*e-mail: yul_max@mail.ru

Поступила в редакцию 22.08.2024 г.

После доработки 03.09.2024 г.

Принята к публикации 05.09.2024 г.

Получен препарат фитазы из клеток галоалкалотолерантных бактерий, идентифицированных как *Silvania hatchlandensis*, выделенных из грунта содового шламохранилища. При иммобилизации фермента в гель альгината бария и сшивке с активированным хитозаном сохранялось 97 и 95% активности нативного белка соответственно. Показано, что при использовании иммобилизованного в альгинате и связанного с хитозаном фермента на протяжении 6 последовательных реакционных циклов сохранялось 70% фитазной активности. Иммобилизация приводила к незначительному снижению максимальной скорости реакции и уменьшению константы Михаэлиса. Иммобилизованная фитаза была более термостабильной по сравнению со свободной формой фермента: константа термоинактивации иммобилизованного фермента при 70°C снижалась в 1.1–1.2 раза. Иммобилизованный фермент сохранял активность при pH 3–12, pH оптимум фермента при иммобилизации не изменялся и был равен 5.0. Удельная активность фермента, ковалентно присоединенного к активированному хитозану, выше, чем таковая нативного фермента в среде с низким и высоким pH. Иммобилизованная фитаза галоалкалотолерантного штамма *S. hatchlandensis* может быть использована в кормопроизводстве и других отраслях сельского хозяйства.

Ключевые слова: фитаза, иммобилизованный фермент, каталитические свойства, галоалкалотолерантные бактерии, альгинат натрия, активированный хитозан

DOI: 10.31857/S0555109925010044 **EDN:** CZNNDX

Фитаза (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат-фосфогидролаза, КФ 3.1.3) входит в подкласс фосфатаз, которые расщепляют сложноэфирные связи фосфорной кислоты в молекуле фитиновой кислоты. Все фитазы в зависимости от того, с какого атома углерода инозитола начинается гидролиз фосфатов, подразделяются на четыре типа: 3-фитазы (КФ 3.1.3.8), 4-фитазы (КФ 3.1.3.26), 5-фитазы (КФ 3.1.3.72) и 6-фитазы (КФ 3.1.3.26). Различают кислые, нейтральные и щелочные фитазы в зависимости от pH-оптимума. На основании механизма катализа и структурных особенностей данные ферменты классифицируются на гистидиновые кислые фосфатазы (HAPs), β -пропеллерные фитазы (BPPs), пурпурные кислые фосфатазы (PAPs) и цистеиновые фосфатазы (CPs) [1].

Фитазы широко используются в качестве добавки в корма для рыб, свиней и птиц, так как в их пищеварительном тракте отсутствуют эти ферменты, поэтому большая часть фосфора из растительных продуктов не усваивается. Экзогенный неорганический фосфат, добавляемый в корма для восполнения недостатка этого элемента, выводится из организма животных и попадает в водоемы, что приводит к их эвтрофикации [2, 3]. Включение фитаз в рацион животных позволит увеличить доступность фосфора органических соединений и уменьшить или исключить минеральные добавки к кормам в виде неорганических фосфатов [4, 5]. Кроме того, органический фосфор составляет около 50% от общего содержания этого элемента в почве, и только менее 1% может напрямую усва-

иваться сельскохозяйственными культурами [6]. Фосфор фитатов, которые являются основным источником данного элемента в почвах, становится доступным для питания растений только после его высвобождения под действием фитаз [7]. Экзогенное добавление биопрепаратов в виде микроорганизмов-продуцентов данных ферментов или выделенного фермента в почвы будет способствовать повышению их плодородия и позволит снизить количество вносимых минеральных удобрений. Перспективным направлением применения фитаз является их внесение в побочные продукты животноводства в процессе компостирования. В результате этого получают органические удобрения, в которых питательные вещества становятся доступными для поглощения растениями. Однако применение фитаз в свободной форме в промышленных масштабах ограничено их низкой стабильностью, чувствительностью к денатурации под действием различных условий эксплуатации, изменений pH, температуры и минерализации [8].

Одним из наиболее широко используемых методов повышения активности, стабильности, а также возможности повторного использования ферментов является их иммобилизация. Иммобилизованные ферменты — биокатализаторы, искусственно закрепленные на нерастворимых носителях или включенные в их структуру. Неоспоримым преимуществом данного процесса является упрощение отделения биокатализатора от среды, которая содержит в себе целевые продукты, более долгая эксплуатация ферментов, повышение их устойчивости к действию различных внешних факторов. Эффективность иммобилизации зависит от применяемого метода и используемого носителя [9]. Метод включения ферментов в структуру геля является универсальным и позволяет получать препараты любой формы (сферические частицы, пленки, гранулы). При химической иммобилизации между белком и носителем создаются новые ковалентные связи, фермент прикрепляется многоточечно, что приводит к повышению его стабильности. Однако иммобилизация фермента может привести и к значительной потере активности фермента при взаимодействии между функциональными группами биокатализатора и носителя [10].

Сохранение сложной трехмерной молекулярной структуры фитаз имеет важное значение для их стабильности во время высокотемпературной обработки при производстве кормов [11]. Для получения высоко термостабильных фитаз используют несколько подходов: 1) поиск и выделение продуцентов термоустойчивых ферментов из природных источников; 2) создание генно-модифицированных организмов, экспрессирующих фитазы термофилов; 3) молекулярная инженерия фитаз; 4) иммобилизация фермента, использование носителей, создающих “защитную” оболочку [12].

Известны различные подходы к иммобилизации фитаз: закрепление на поверхности, включение в структуру органических и неорганических матриц, использование наноструктур, получение поперечно-сшитых агрегатов фермента, иммобилизация целых клеток [13]. Включение в гель альгината кальция и хитозана является дешевым, быстрым и нетоксичным для фермента методом иммобилизации. Изучение каталитических свойств фитазы рекомбинантной *Klebsiella* sp. ASR1, иммобилизованной в альгинате, показало, что, фермент проявлял максимальную активность при pH 6 и 70°C, тогда как неиммобилизованный — при pH 5 и 37°C [14]. В результате иммобилизации фитазы ризосферного почвенного гриба *Penicillium purpurogenum* GE1 в альгинате установили почти 3-кратное увеличение удельной активности и смещение температурного оптимума фермента с 27 до 45°C [15]. Термостабильность иммобилизованной в альгинате кальция фитазы, которую оценивали по остаточной ферментативной активности после нагревания, увеличилась до 80% по сравнению с таковой нативного фермента [16]. Высокостабильные ферментные препараты были получены при иммобилизации фитазы термофила *Geobacillus* sp. TF16 включением в гель альгината кальция и ковалентной сшивкой с хитозаном, активированным глутаровым альдегидом: фермент проявлял максимальную активность при pH 3.0 и 75°C и pH 5.0 и 95°C соответственно [17]. Была разработана гидрогелевая гранула для поддержания каталитической активности и защиты выделенной фитазы от воздействия температуры и протеаз. В такой гидрогелевой грануле присутствовало ядро, состоящее из комплекса фитаз-хитозан, и оболочка из ковалентно сшитого альгината и κ-каррагинана, которая обеспечивала термостойкость. Иммобилизованная в гидрогелевой грануле фитаза сохраняла $70.67 \pm 5.51\%$ активности по сравнению с нативным ферментом даже после термической обработки [18].

Несмотря на активное изучение иммобилизованных микробных фитаз, разработка наиболее предпочтительных методов и носителей для иммобилизации этого фермента остаются актуальными. Известно множество микроорганизмов-продуцентов фитаз, но очень немногие из них используются в коммерческих целях. Достичь производственного уровня мешает неспособность фермента выдерживать экстремальные температуры, его высокая стоимость, катализ в ограниченном диапазоне pH и недостаточная стабильность биокатализатора [19]. В связи с этим представляет интерес поиск микроорганизмов — новых продуцентов фитаз в экстремальных биотопах в сочетании со скринингом предпочтительных методов иммобилизации фермента, которые позволят получить биокатализатор, долговременно сохраняющий активность при повышенной температуре, минерализации и в широком диапазоне pH.

Цель работы — получение ферментного препарата, содержащего фитазу, из клеток галоалкало-толерантных энтеробактерий *Silvania hatchlandensis* ФГ 3.9.1, выделенных из среды антропогенного происхождения, иммобилизация фермента методами ковалентного присоединения к активированному хитозану и включения в структуру геля альгината бария, а также изучение каталитических свойств нативной и иммобилизованной фитазы.

МЕТОДИКА

Выделение, идентификация фитат-гидролизующих бактерий и определение фитазной активности микробных клеток. Из образцов грунта содового шламохранилища АО “Березниковский содовый завод”, г. Березники (Россия) был выделен изолят грамотрицательных бактерий ФГ 3.9.1. Накопительную культуру получали на питательной среде Phytase Screening Medium (PSM), следующего состава (г/л): CaCl_2 — 2; NH_4NO_3 — 5; KCl — 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.01; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0.01; глюкоза — 20; фитат натрия — 4 и высевали на агаризованную среду того же состава. Колонии, вокруг которых образовывалась зона просветления агаризованной среды, отбирали для определения фитазной активности.

Фитазную активность бактериальных клеток определяли по методу Грайнера [20]. Ферментативную реакцию проводили с 0.1 М фитатом натрия 30 мин при 37°C и pH 4.5. Оптическую плотность, пропорциональную концентрации свободного неорганического фосфора, измеряли на спектрофотометре SmartSpec Plus (“Bio-RAD”, США) при длине волны 355 нм (ОП₃₅₅). Удельную активность фитазы (Е) выражали в мкмоль неорганического фосфата/(мг·мин).

Идентификацию изолята ФГ 3.9.1 проводили физиолого-биохимическими, хемотаксономическими, морфологическими методами (окраска по Граму, морфология клеток и колоний, подвижность, тесты на наличие каталазы и оксидазы, рост на сахарах, состав клеточной стенки) и методом секвенирования гена 16S рРНК. ПЦР осуществляли с универсальными праймерами 27F и 1492R (27F 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' и 1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), сконструированными на основе последовательностей, представленных в базе данных GenBank. Синтез праймеров и секвенирование ампликонов проводили в ЗАО “Евроген” (Москва). Полученные нуклеотидные последовательности генов сравнивали с хранящимися в базе данных EzBioCloud ([https:// www.ezbiocloud.net/](https://www.ezbiocloud.net/)). Сходство изолята ФГ 3.9.1 с типовым штаммом *Silvania hatchlandensis* H19S6^T составило 99.87%.

Выделение фитазы и получение ферментного препарата. *Silvania hatchlandensis* ФГ 3.9.1 культивировали в 1 л жидкой питательной среде БТН

(“Биотехновация”, Россия) в колбах объемом 2 л на шейкере в течение 7 сут при температуре 25°C. Биомассу отделяли центрифугированием при 4500 g в течение 15 мин, клетки отмывали от среды калий-фосфатным буфером (pH 7.4 ± 0.2). Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗГ8 0.4/22 (ВНИИТВЧ, Россия) при частоте 22 кГц 7 раз по 20 с, охлаждая суспензию на ледяной бане.

Гомогенат центрифугировали при 4500 g 15 мин с охлаждением до 4°C. Белок выделяли ступенчатым осаждением сульфатом аммония (10–70% от насыщения) для получения отдельных фракций. В каждой из них определяли концентрацию белка по методу Брэдфорд с Кумасси бриллиантовым синим G-250. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Степень очистки фермента определяли как отношение удельной активности фракции к удельной активности исходного препарата.

Иммобилизация фитазы и определение каталитических характеристик иммобилизованного и свободного белка. Раствор хитозана (4% в 2%-ной уксусной кислоте) накапывали через шприц объемом 5 мл в 1 М раствор КОН. Гранулы хитозана после отвердевания отмывали 0.1 М фосфатным буфером (pH 7.4 ± 0.2) до нейтральной реакции промывных вод. Для активации микросферы выдерживали ночь в 0.1%-ном глutarовом альдегиде, после чего отмывали 0.1 М фосфатным буфером (pH 7.4 ± 0.2) от несвязанного сшивающего агента. Активированные гранулы смешивали с раствором фермента, выдерживали в течение 24 ч в статических условиях в холодильнике (6–8°C), затем отмывали 0.1 М калий-фосфатным буфером (pH 7.4 ± 0.2) от несвязавшегося белка. Количество связанного белка определяли по разности его концентрации до и после иммобилизации фермента. Полученный иммобилизованный препарат хранили при температуре 6°C.

Для иммобилизации фермента методом включения в структуру геля раствор фермента смешивали с 4%-ным альгинатом натрия в соотношении 1 : 2. Полученную смесь накапывали при помощи шприца, объемом 5 мл, в холодный 0.1 М раствор BaCl_2 . Полученные гранулы выдерживали в свежем растворе хлорида бария в течение 24 ч при температуре 6°C, после чего отмывали дистиллированной водой и хранили в холодильнике.

Реакцию, катализируемую иммобилизованной фитазой и ферментом в растворе, проводили с 0.001–0.1 М фитатом натрия 30 мин при 37°C, pH 4.5. Активность фермента определяли по методу Грайнера. За единицу активности принимают количество фермента (мг), расщепляющего фитат натрия с образованием 1 мкмоль неорганического фосфата за 1 мин. Константу Михаэлиса (K_M) и максимальную скорость ($V_{\max}$) ферментативной реакции, катализируемой иммобилизованным и нативным ферментом, вычисляли по графику Лайнуивера-Берка, построенному по методу двойных обратных координат.

Для определения операционной стабильности активности полученных биокатализаторов проводили последовательные циклы реакций иммобилизованного фермента с фитатом натрия, после каждой реакции иммобилизованный фермент отмывали от реакционной среды 0.1 М калий-фосфатным буфером ($\text{pH } 7.4 \pm 0.2$) и использовали в следующем цикле.

Зависимость активности иммобилизованной фитазы и фермента в растворе от температуры определяли при гидролизе 0.01 М фитата натрия ($\text{pH } 4.5$) в течение 30 мин при температуре от 30 до 80°C в термостате ТС — 1/80 СПУ (“Лабтех”, Россия).

Для определения термостабильности иммобилизованную и нативную фитазу инкубировали в течение 15, 30, 45 и 60 мин при 50, 60 и 70°C и быстро охлаждали на ледяной бане. Гидролиз 0.01 М фитата натрия проводили при 37°C , $\text{pH } 4.5$. Константы термодинамической активности фермента (K_m) определяли по графику зависимости натурального логарифма активности от времени экспозиции при данной температуре и выражали в обратных минутах (мин^{-1}).

Зависимость активности иммобилизованной фитазы и свободного фермента от pH реакционной среды изучали при гидролизе 0.01 М раствора фитата натрия в течение 30 мин при 37°C в буферных растворах, содержащих лимонную кислоту ($\text{pH } 3-6$); трис(гидроксиметил)аминометан ($\text{pH } 7$), борную кислоту ($\text{pH } 8-11$), гидроксид натрия и хлорид калия ($\text{pH } 12$).

Результаты представлены средними значениями по трем независимым опытам, определяли стандартное отклонение и ошибку среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение фитазы из клеток *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1. В результате фракционирования сульфатом аммония супернатанта разрушенных ультразвуком клеток *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1 был получен фер-

ментный препарат, содержащий фитазу, и определена степень очистки фермента (табл. 1).

Наибольшее количество белка (10–11 мг/мл) и наибольшее значение активности фермента (6–7 мкмоль/мин·мг) наблюдалось во фракциях, полученных при 60 и 70%-ном насыщении сульфатом аммония. Известно, что молекулярная масса фитаз переменна и находится в пределах 38–100 кДа, при этом высокая молекулярная масса, связанная с гликозилированием этих ферментов, наблюдается у грибных и дрожжевых фитаз [21]. Для получения ферментного препарата грубой очистки, содержащего фитазу *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1, фракционирование сульфатом аммония может производиться в две ступени: удаление балластных белков при 45%-ном насыщении сульфатом аммония и последующее высаливание фитазы при 70%-ном насыщении солью.

Кинетические параметры ферментативной реакции, катализируемой иммобилизованной и нативной фитазой, операционная стабильность иммобилизованных биокатализаторов. Частично очищенная фитаза была иммобилизована включением в структуру геля альгината бария и ковалентной сшивкой с гранулами хитозана, активированными 0.1%-ным глутаровым альдегидом. Определено, что при иммобилизации сохранялось 97 и 95% активности нативного белка соответственно. На основании графика Лайнуивера-Берка определили V_{max} и K_m нативной и иммобилизованной фитазы. Показано, что K_m фитазы, включенной в гель альгината бария и связанной с активированным хитозаном, снижалась в 1.1 и в 1.7 раза соответственно, что может свидетельствовать о большем родстве иммобилизованного фермента к фитату натрия, используемому в качестве субстрата (табл. 2).

Установлено, что при многоцикловом проведении реакции активность иммобилизованных ферментов постепенно снижалась, однако на протяжении 6 циклов сохранялось 70% активности, зафиксированной в первом цикле (рис. 1).

Таблица 1. Стадии очистки ферментного препарата, содержащего фитазу

Стадия очистки	Удельная активность, мкмоль/(мл · мин)	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность, мкмоль/(мг·мин)	Степень очистки
Супернатант	32.3 ± 1.4	14.49 ± 0.44	2.229 ± 0.076	—
Осаждение сульфатом аммония, концентрация в % от насыщения				
10	7.8 ± 2.8	1.653 ± 0.025	4.60 ± 1.60	2
35	6.8 ± 1.7	1.726 ± 0.012	3.89 ± 0.99	1.8
45	4.01 ± 0.19	4.464 ± 0.046	0.899 ± 0.053	0.4
60	74.09 ± 0.96	10.35 ± 0.23	7.18 ± 0.26	3.2
70	71.6 ± 2.1	11.730 ± 0.069	6.11 ± 0.18	2.8

Таблица 2. Каталитические свойства свободной и иммобилизованной фитазы

Фитаза	K_M , ммоль/л	V_{max} , мкмоль/ (мг·мин)
В растворе	2.2	7.1
Иммобилизованная в альгинате	1.9	5.8
Иммобилизованная на хитозане	1.3	5.5

Зависимость фитазной активности от температуры и термоинактивация свободной и иммобилизованной фитазы. Зависимость активности фермента от температуры является результатом наложения двух факторов: ускорения движения молекул при повышении температуры и денатурации белка, которая происходит при воздействии высоких температур. Максимальная активность фитазы в растворе отмечалась при 40°C (рис. 2).

Показано, что иммобилизованная фитаза обладала большей термостабильностью по сравнению

с нативной формой фермента (рис. 3). Повышение термостабильности связано, по-видимому, с невозможностью диссоциации фермента на субъединицы при иммобилизации белковой молекулы.

Определены константы термоинактивации иммобилизованной фитазы и фермента в растворе (табл. 3). Иммобилизация фермента привела к уменьшению константы инактивации, следовательно, фитаза в растворе при повышении температуры характеризовалась более быстрой потерей активности в единицу времени.

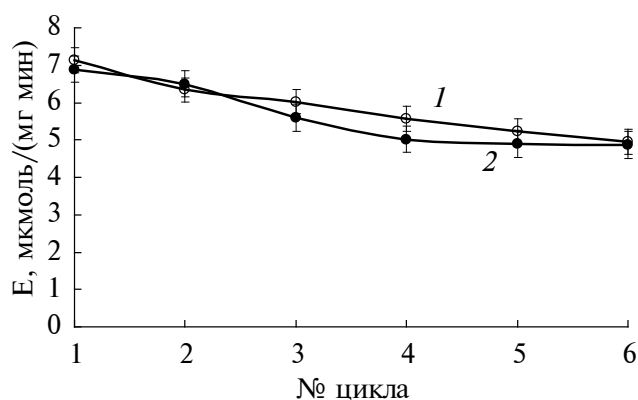
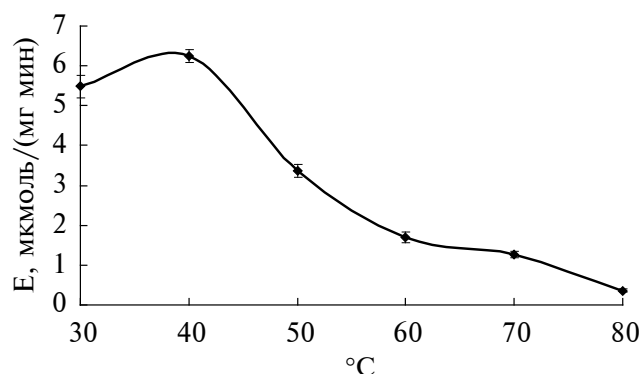
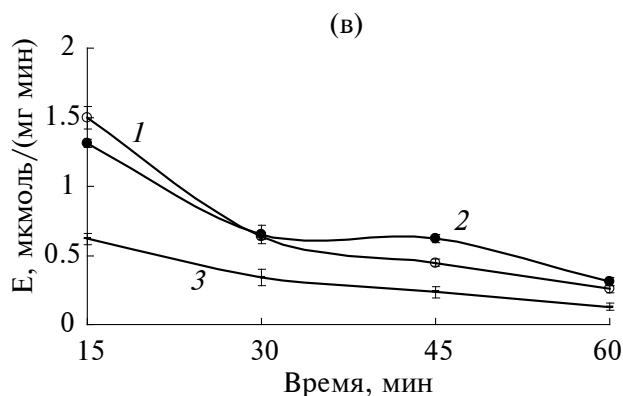
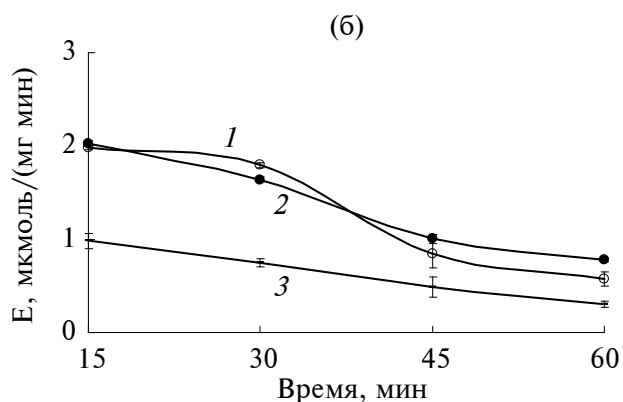
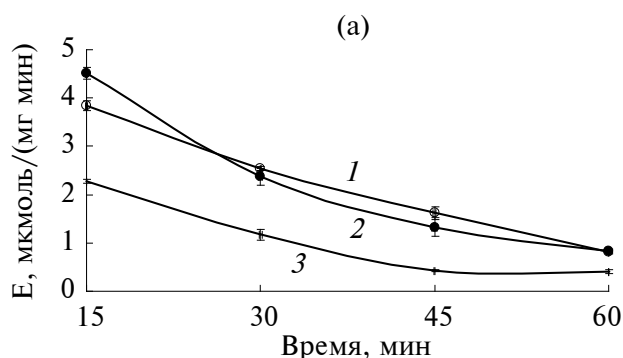
**Рис. 1.** Операционная стабильность фитазы, иммобилизованной включением в структуру геля альгината бария (1) и ковалентным присоединением к активированному хитозану (2).**Рис. 2.** Зависимость активности нативной фитазы (Е) от температуры.**Рис. 3.** Термоинактивация фитазы при 50 (а), 60 (б) и 70°C (в): 1 — фитаза, иммобилизованная включением в гель альгината бария; 2 — фитаза, иммобилизованная на активированном хитозане; 3 — свободная фитаза.

Таблица 3. Термоинаktivация свободной и иммобилизованной фитазы

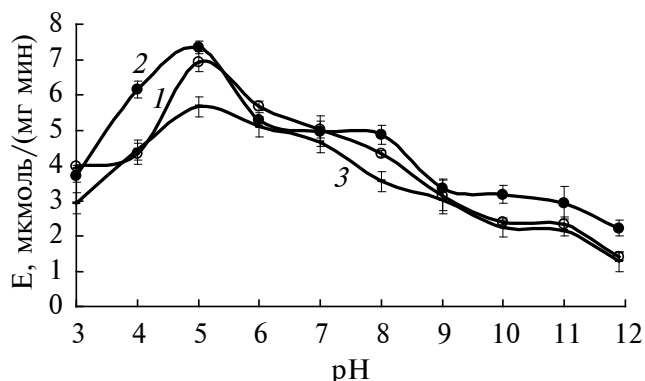
Фитаза	$K_{ин}, \text{мин}^{-1}$		
	50°C	60°C	70°C
В растворе	$2.9 \cdot 10^{-2}$	$3.7 \cdot 10^{-2}$	$4.1 \cdot 10^{-2}$
Иммобилизованная в альгинате	$2.6 \cdot 10^{-2}$	$3.4 \cdot 10^{-2}$	$3.4 \cdot 10^{-2}$
Иммобилизованная на хитозане	$2.2 \cdot 10^{-2}$	$2.9 \cdot 10^{-2}$	$3.7 \cdot 10^{-2}$

Зависимость активности свободной и иммобилизованной фитазы от pH. Показано, что pH-оптимумы нативного и иммобилизованного фермента соответствуют pH 5 (рис. 4). Однако удельная активность фермента, закрепленного на носителях, при pH, отличающемся от оптимума, была выше активности свободного фермента. При этом даже высокощелочная среда полностью не инактивировала фитазу.

ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск продуцентов промышленно значимых гидролаз, в том числе фитаз, перспективен среди экстремофильных и экстремотолерантных микроорганизмов [22]. Бактерии, обладающие фитазной активностью, выделяли с поверхности грунта антропогенно загрязненной территории содового шламохранилища с высокими pH и минерализацией, на которой более 50 лет назад прекращено складирование шлама производства соды (хлорида кальция) и на протяжении нескольких десятилетий восстанавливается растительность. Минерализация поверхности грунта достигала очень высоких значений, а pH приближался к 8 [23]. Штамм, который был выделен и идентифицирован как *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1, проявлял черты экстремотолерантности: рост энтеробактерий наблюдался при 5–50°C, при 5% NaCl и pH 9. Однако выделенный фермент проявлял максимальную активность при pH 5, так как являлся внутриклеточным. При этом устойчивость экстремотолерантного микроорганизма отражалась на каталитических свойствах фермента: так, было показано, что фитаза *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1 обладала достаточно высокой термостабильностью и была способна гидролизовать фитат в широком диапазоне pH.

Перспективность используемых методов иммобилизации фитазы *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1 оценивали по таким критериям, как сохранение ферментативной активности, термостабильность и возможность многократного использования. Метод ковалентной сшивки с хитозаном, активированным бензохиноном, был ранее использован для иммобилизации нитрилгидратазы. Было отмечено

**Рис. 4.** Зависимость активности фитазы, иммобилизованной в геле альгината бария (1), на активированном хитозане (2), и нативной (3) от pH.

сохранение ферментативной активности при иммобилизации, высокая операционная стабильность и увеличение термостабильности фермента [24]. Для разработки биокатализатора, гидролизующего акриламид до акриловой кислоты, клетки актино- и протеобактерий были включены в гель альгината бария, и показано сохранение амидазной активности при многоцикловом использовании [25]. Данные методы с модификациями были использованы для иммобилизации фитаз. Свойства полученных биокатализаторов сравнили с известными ферментными препаратами на основе фитаз, иммобилизованными подобными методами (табл. 4).

Показано, что максимальная скорость ферментативной реакции фитазы *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1 отличалась более низкими значениями по сравнению с фитазой *Aspergillus oryzae* [26] и фитазой термофила *Geobacillus* sp. TF16 [17], но превышала таковую фитазы рисовых бобов [27]. Константа Михаэлиса у фитазы *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1 в несколько раз превосходила этот показатель фитаз, каталитические свойства которых изучены в работах [26, 27]. У нативной, ковалентно сшитой с активированным хитозаном и иммобилизованной в геле альгината кальция фитазы *Geobacillus* sp. TF16 K_M составляла 1.31, 2.38 и 7.5 мМ соответственно, что указывает на снижение сродства фермента к субстрату при иммобилизации [17]. В большинстве изученных случаев K_M иммобилизованной фитазы возрастала [13]. При иммобилизации фитазы *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1, наоборот, было показано снижение K_M и высокая доля сохранения активности фермента (95–97%). При этом pH оптимум активности фитазы *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1 указывает на более эффективный катализ в кислой среде, как и в работах [17, 26, 27].

Операционная стабильность иммобилизованных в альгинате и на поверхности активированных хитозановых гранул фитаз *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1 была достаточно высока по сравнению с таковой известных иммобилизованных на таких носите-

Таблица 4. Сравнение каталитических свойств фитаз (опубликованные данные) и фитазы *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1, иммобилизованных на активированном хитозане и в альгинатном геле

Способ иммоби- лизации	Источник выде- ления	Фитаза							Сохра- нение актив- ности, %	Ссыл- ка
		Свободная			Иммобилизованная					
		T _{опт} , °C	pH _{опт}	K _м , ммоль/л	T _{опт} , °C	pH _{опт}	K _м , ммоль/л	V _{max} , мкмоль/мин		
Вклю- чение в структу- ру альги- натного геля	<i>S. latchlandensis</i> ФГ 3.9.1	40	5.0	2.2	—	5.0	1.9	5.8	97	Дан- ная статья
	<i>Aspergillus oryzae</i> SBS50	50	5.0	0.2	50	5.0	0.66	39.9	53	[26]
	<i>Geobacillus</i> sp. TF16	85	4.0	1.31	75	3.0	7.5	5011.12	>100	[17, 29]
Сшивка с активи- рованными хито- зановыми микро сфе- рами	<i>S. latchlandensis</i> ФГ 3.9.1	40	5.0	2.2	—	5.0	1.3	5.5	95	Дан- ная статья
	Рисовые бобы (<i>Vigna umbellata</i> Thunb.)	40	4.0	0.2	40	4.0	0.62	3.42	77	[27]
	<i>Geobacillus</i> sp. TF16	85	4.0	1.31	95	5.0	2.38	3401.36	>100	[17, 29]

лях биокатализаторов. Так, к 6 циклу гидролиза фитата сохранялось 70% ферментативной активности от проявляемой в первом цикле и тенденции к резкому снижению активности не наблюдалось. Напротив, иммобилизованная в альгинате и хитозане фитаза *E. coli* и *S. aureus* сохраняла после 5 цикла гидролиза фитата лишь 38 и 43% активности соответственно [28], а фитаза *Aspergillus oryzae* SBS50 в альгинате кальция — более 50% после 5 циклов [26], фитаза рисовых бобов, иммобилизованная на активированном глутаровом альдегидом хитозане — 58% после 4 циклов [27].

Таким образом, в данной работе было показано влияние двух методов иммобилизации фитазы на кинетические параметры реакции гидролиза фитата натрия, операционную стабильность и термостабильность фермента. Иммобилизация методом ковалентной сшивки с активированным хитозаном и включением фермента в структуру альгинатного геля способствовали уменьшению величины K_M , что указывало на увеличение сродства фермента к субстрату. Оба метода иммобилизации незначительно снижали V_{max} с сохранением 95–97% удельной активности нативного фермента, в то же время термоинактивация закрепленного на носителях фермента происходила медленнее ($K_{\text{ин}}$ иммобилизованного фермента

при 70°C снижалась в 1.1–1.2 раза). При воздействии 70°C в течение 1 ч не происходило полного ингибирования ни свободного, ни иммобилизованного фермента. Иммобилизация не приводила к изменению pH-оптимума действия фермента, но позволила увеличить его удельную активность, особенно при pH, отличающихся от оптимума. Кроме того, иммобилизованные ферменты обладали значительной операционной стабильностью, что обеспечивает возможность многократного использования биокатализаторов с сохранением активности.

Иммобилизованная фитаза, выделенная из *S. hatchlandensis* ФГ 3.9.1, может быть использована в качестве добавки в корма сельскохозяйственных животных. Кроме того, иммобилизованный препарат этого фермента может быть внесен при компостировании органических отходов с целью увеличения концентрации доступного фосфора, что улучшит качество полученного удобрения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено и в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы — 124020500028-4, и частично при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singh B., Boukhris I., Pragma, Kumar V., Yadav A., Farhat-Khemakhem A. et al. // *Pedosphere*. 2020. V. 30. № 3. P. 295–313.
[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60010-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60010-8)
2. Jain J., Sapna, Singh B. // *Process Biochem.* 2016. V. 51. P. 159–169.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.12.004>
3. Balwani I., Chakravarty K., Gaur S. // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2017. V. 12. P. 23–29.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.010>
4. Rizwanuddin S., Kumar V., Naik B., Singh P., Mishra S., Rustagi S., Kumar V. // *J. Agric. Food Res.* 2023. V. 12. 100559.
<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100559>
5. Urgessa O.E., Koyamo R., Dinka H., Tefese K., Gameda M.T. // *Int. J. Microbiol.* 2024. V. 2024. 9400374.
<https://doi.org/10.1155/2024/9400374>
6. Li H.-P., Han Q.-Q., Liu Q.-M., Gan Y.-N., Rensing C., Rivera W.L. et al. // *Microbiol. Res.* 2023. V. 272. 127375.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127375>
7. Zhou Y., Anoopkumar A.N., Tarafdar A., Madhavan A., Binoop M., Lakshmi N.M. et al. // *Environ. Pollut.* 2022. V. 308. 119703.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119703>
8. Li C., Wang Z., Bakshi S., Pignatello J.J., Parikh S.J. // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 787. 147720.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147720>
9. Sharma S., Gupta P., Arya S., Kaur A. // *Process Biochem.* 2022. V. 120. P. 22–34.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.05.022>
10. Karume I. // *Sustainable Chem. Environ.* 2023. V. 4. 100048.
<https://doi.org/10.1016/j.senv.2023.100048>
11. Mrudula Vasudevan U., Jaiswal A.K., Krishna S., Pandey A. // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 278. P. 400–407.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.065>
12. Сердюк Е.Г., Исакова Е.П., Гесслер Н.Н., Трубинова Е.В., Антипов А.Н., Дерябина Ю.И. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55. № 5. С. 498–505.
<https://doi.org/10.1134/S055510991905012X>
13. Filippovich S.Y., Isakova E.P., Gessler N.N., Deryabina Y.I. // *Bioresour. Technol.* 2023. V. 379. 129030.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129030>
14. Hidayatullah M.E., Sajidan S.A., Mkumbe B.S., Greiner R. // *J. Biotechnol. Biosci.* 2020. V. 7. № 1. P. 105–113.
<https://doi.org/10.29122/jbbi.v7i1.2997>
15. Awad G., Esawy M., El-Gammal E., Ahmed H., Elnashar M., Atwa N. // *Egypt. Pharm. J.* 2015. V. 14. № 2. P. 87–93.
<https://doi.org/10.4103/1687-4315.161268>
16. Weng Y., Wan A., Li Y., Liu Y., Chen X., Song H., Zhao C.-X. // *Colloids Surf. A.* 2023. V. 667. 131412.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.131412>
17. Sirin Y., Akatin M.Y., Colak A., Ertunga N.S. // *Int. J. Food Prop.* 2017. V. 20. № 12. P. 2911–2922.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1261151>
18. Yang E., Dong H., Khongkomolsakul W., Dadmohammadi Y., Abbaspourrad A. // *Food Chem. X.* 2024. V. 21. 101082.
<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101082>
19. Handa V., Sharma D., Kaur A., Arya S.K. // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020. V. 25. 101600.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101600>
20. Патент РФ. 2018. № 2654595.
21. Ахметова А.И., Мухаметзянова А.Д., Шарипова М.Р. // *Ученые записки Казанского университета*. 2012. Т. 54. № 2. С. 103–110.
22. Гесслер Н.Н., Сердюк Е.Г., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54. № 4. С. 347–356.
<https://doi.org/10.7868/S0555109918040025>
23. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. // *Вода и экология: проблемы и решения*. 2020. № 1(81). С. 84–94.
<https://doi.org/10.23968/2305-3488.2020.25.1.84-94>
24. Максимова Ю.Г., Рогожникова Т.А., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю., Демаков В.А. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2012. Т. 48. № 5. С. 484–489.
25. Мочалова Е.М., Максимова Ю.Г. // *Вестник ПГУ. Серия биология*. 2020. № 1. P. 26–32.
<https://doi.org/10.17072/1994-9952-2020-1-26-32>
26. Pragma, Sharma K.K., Kumar S., Manisha, Singh D., Kumar V., Singh B. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2023. V. 76. № 2. ovac077.
<https://doi.org/10.1093/lambio/ovac077>
27. Belho K., Ambasht P.K. // *J. Sci. Res.* 2021. V. 65. № 1. P. 111–119.
<https://doi.org/10.37398/JSR.2021.650115>
28. El-Shora H.M., Khalaf S.A., El-Solia M.M. // *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2019. V. 10. № 3. P. 529–541.
<https://doi.org/10.33887/rjpbcs/2019.10.3.62>
29. Dokuzparmak E., Sirin Y., Cakmak U., Ertunga N.S. // *Int. J. Food Prop.* 2017. V. 20. № 5. P. 1104–1116.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1203930>

Catalytic Properties of Immobilized Phytase of *Silvania hatchlandensis* FG 3.9.1

K. G. Semenova^{a, b} and Yu. G. Maksimova^{a, c, *}

^a*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russia Academy of Sciences,
Perm Federal Research Center, Perm, 614081 Russia*

^b*Perm National Research Polytechnic University, Perm, 614990 Russia*

^c*Perm State National Research University, Perm, 614068 Russia*

*e-mail: yul_max@mail.ru

A phytase preparation was obtained from the cells of haloalkalitolerant bacteria identified as *Silvania hatchlandensis* isolated from the soil of a soda sludge storage facility. When the enzyme was immobilized in barium alginate gel and cross-linked with activated chitosan, 97 and 95% of the native protein activity, respectively, was retained. It was shown that 70% of the phytase activity was retained when using the enzyme immobilized in alginate and bound to chitosan over 6 consecutive reaction cycles. Immobilization resulted in an insignificant decrease in the maximum reaction rate and a decrease in the Michaelis constant. Immobilized phytase was more thermally stable compared to the free form of the enzyme: the thermal inactivation constant of the immobilized enzyme at 70°C decreased by 1.1–1.2 times. The immobilized enzyme retained activity at pH 3–12; the pH optimum of the enzyme after immobilization did not change and was equal to 5.0. The specific activity of the enzyme covalently attached to activated chitosan is higher than that of the native enzyme in low and high pH environments. Immobilized phytase of haloalkalitolerant *S. hatchlandensis* can be used in feed production and other areas of agriculture.

Keywords: phytase, immobilized enzyme, catalytic properties, haloalkalitolerant bacteria, sodium alginate, activated chitosan