

Chemistry and Chemical Engineering

Volume 2019 | Number 3

Article 47

August 2019

Development of a method of oriented immobilization of lipases on a solid carrier

Ziyavitdinov Jamolitdin Fazlitdinovich

Institute of Bioorganic Chemistry, Tashkent, Uzbekistan, jamolitdin@mail.ru

Inogamov Utkir Kudratillayevich

Institute of Bioorganic Chemistry, Tashkent, Uzbekistan, otkirjon@mail.ru

Berdiev Nodir Sharifovich

Institute of Bioorganic Chemistry, Tashkent, Uzbekistan, nodir2884@mail.ru

Ishimov Uchkun Jomuradovich

Institute of Bioorganic Chemistry, Tashkent, Uzbekistan, uchqun@mail.ru

Follow this and additional works at: <https://uzjournals.edu.uz/cce>

 Part of the [Biochemical and Biomolecular Engineering Commons](#)

Recommended Citation

Jamolitdin Fazlitdinovich, Ziyavitdinov; Utkir Kudratillayevich, Inogamov; Nodir Sharifovich, Berdiev; and Uchkun Jomuradovich, Ishimov (2019) "Development of a method of oriented immobilization of lipases on a solid carrier," *Chemistry and Chemical Engineering*: Vol. 2019 : No. 3 , Article 47.

Available at: <https://uzjournals.edu.uz/cce/vol2019/iss3/47>

This Article is brought to you for free and open access by 2030 Uzbekistan Research Online. It has been accepted for inclusion in Chemistry and Chemical Engineering by an authorized editor of 2030 Uzbekistan Research Online. For more information, please contact brownman91@mail.ru.

DEVELOPMENT OF A METHOD OF ORIENTED IMMOBILIZATION OF LIPASES ON A SOLID CARRIER

Jamolitdin Fazlitdinovich ZIYAVITDINOV¹ (jamolitdin@mail.ru), Utkir Kudratillayevich INOGAMOV¹ (otkirjon@mail.ru), Nodir Sharifovich BERDIEV¹ (nodir2884@mail.ru), Uchkun Jomuradovich ISHIMOV¹ (uchqun@mail.ru), Shamsiddin Jamolitdinovich FAZLIDDINOV² (jamolitdin@mail.ru)
¹Institute of Bioorganic Chemistry, Tashkent, Uzbekistan
²Tashkent Technological University, Uzbekistan

The methods of oriented immobilization of lipases on a solid carrier - Silochrome C-80 have been developed. The resulting sorbents were tested in the process of obtaining biodiesel from cotton oil. It was shown that immobilized lipase on Silochrome C-80 with NH₂ group has the highest transesterification ability and stability, while in sorbents with the enzyme immobilized with -COOH and -SH groups this value was 87 and 53%, respectively. Biocatalysis using an affinity sorbent of immobilized lipase with the -NH₂ group has a high operational stability, which, after 240 hours of operation, retains more than 50%, and after 480 hours, 17% retains its initial activity.

Keywords: lipase, silica gel, immobilization, vegetable oil, biodiesel.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОРИЕНТИРОВАННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЛИПАЗ НА ТВЕРДЫЙ НОСИТЕЛЬ

Жамолитдин Фазлитдинович ЗИЯВИТДИНОВ¹ (jamolitdin@mail.ru), Уткир Кудратиллаевич ИНОГАМОВ¹ (otkirjon@mail.ru), Нодир Шарифович БЕРДИЕВ¹ (nodir2884@mail.ru), Учкун Жомурадович ИШИМОВ¹ (uchqun@mail.ru), Шамсиддин Жамолитдинович ФАЗЛИДДИНОВ² (jamolitdin@mail.ru)
¹Институт биоорганической химии, Ташкент, Узбекистан
²Ташкентский технический университет, Узбекистан

Разработаны методы ориентированной иммобилизации липаз на твердый носитель – Силохром С-80. Полученные сорбенты апробированы в процессе получения биодизеля из хлопкового масла. При этом показано, что наибольшей транс-этерификационной способностью и стабильностью обладает иммобилизованная липаза на Силохром С-80 с NH₂ группой - 90%, тогда как у сорбентов с ферментом, иммобилизованных -COOH и -SH группами, эта величина составляла 87 и 53%, соответственно. Биокатализ с использованием аффинного сорбента иммобилизованной липазы с -NH₂ группой обладает высокой эксплуатационной стабильностью, который после 240 ч работы сохраняет более 50%, а после 480 ч 17% своей первоначальной активности.

Ключевые слова: липаза, силикагель, иммобилизация, растительное масло, биодизель.

QATTIQ MATRISALARGA LIPAZLARNI YO'NALTIRILGAN HOLDA IMMOBILIZATSİYALASH USULINI ISHLAB CHIQUISH

Jamolitdin Fazlitdinovich ZIYAVITDINOV¹ (jamolitdin@mail.ru), Utkir Kudratillayevich INOGAMOV¹ (otkirjon@mail.ru), Nodir Sharifovich BERDIEV¹ (nodir2884@mail.ru), Uchkun Jomuradovich ISHIMOV¹ (uchqun@mail.ru), Shamsiddin Jamolitdinovich FAZLIDDINOV² (jamolitdin@mail.ru)
¹Bioorganik kimyo instituti, Toshkent, O'zbekiston
²Toshkent texnika universiteti, O'zbekiston

Qattiq matrisalar -Siloxrom C-80 ga lipazalarning yo'naltirilgan holda immobilizatsiyalash usuli ishlab chiqildi. Olingan sorbentlar paxta yog'idan biodizel olish jarayonida sinovdan o'tkazildi. Siloxrom C-80 bilan NH₂ guruhi orqali immobilizatsiyalangan lipazaning transesterifikatsiyalash qobiliyati va barqarorligi yuqori ekanligi - 90%, -COOH va -SH guruhleri bilan immobilizatsiyalangan fermentli sorbentlarda bu qiymat mos ravishda 87 va 53% ni tashkil qilganligi ko'rsatildi. -NH₂ guruhi bilan immobilizatsiyalangan lipazali affin sorbentini biokataliz jarayonida yuqori ekspluatatsion barqarorlikka ega bo'lib, uning boshlangich faolligi 240 soat ish-lashdan so'ng 50% dan yuqori, 480 soatdan so'ng esa 17% saqlanib qolgan.

Kalit so'zlar: lipaza, silikagel, immobilizatsiya, o'simlik moyi, biodizel.

В связи с бурным развитием биотехнологии, в течение последних десятилетий возросла потребность в получении ферментов, которые широко используются в различных химических процессах [1]. Липазы являются третьими по использованию ферментами после протеаз и амилаз [2]. Липаза (гидролаза триацилглицеридов, К.Ф. 3.1.1.3) представляет собой фермент, катализирующий *in vivo* гидролиз триглицеридов до моноглицеридов и жирных кислот [3]. Липазы также способны катализировать, при определенных условиях, обратную реакцию ацилирования жирной кислоты с глицерином, моно- и диглицеридов, а также перэтерификацию триглицеридов.

Несмотря на предпочтение к триглицеридам, липазы гидролизуют большое разнообразие отличных от триглицеридов субстратов, таких как алифатические, ациклические, бициклические и ароматические

эфиры и даже эфиры на основе органометаллических сэндвич соединений [4].

Увеличение объема производства биодизеля в мировой практике доказывает, что биодизель считается альтернативой обычному топливу [5]. Производство биодизеля с использованием щелочного катализатора коммерчески осуществлено из-за его высокой конверсии и низкого времени производства. Для разработки продукта и способа производства биодизеля была предложена ферментативная перэтерификация для получения продукта высокой чистоты с экономичным, экологически чистым процессом в мягких условиях реакции [6]. Стоимость фермента, являющегося основным препятствием, может быть преодолена путем иммобилизации. Иммобилизованный фермент, который успешно используется в различных областях по сравнению с растворимым аналогом, может быть использован в производстве биодизеля с целью

снижения производственных затрат путем повторного использования фермента [7].

В литературных источниках много информации о методах иммобилизации липаз на твердые носители. E.Yilmaz с соавторами, липазу бактерии *Candidarugosa* иммобилизовали на стеклянные шарики с использованием метода ковалентного связывания или процедурой золь-гелевой инкапсуляции. В результате инкапсулированные липазы на основе стеклянных шариков имели более высокую конверсию и энантиоселективность по сравнению с ковалентно иммобилизованной липазой [8]. Ю. В. Самойлова и др. исследовали свойства биокатализатора, иммобилизованного мезопористой силикагель липазой бактерии *Geobacillus stearothermophilus* G3. Высокая стабильность биокатализатора сохранилось в течение 243 часов использования [9]. Calero J. и др. исследовали процесс получения биотоплива с помощью процесса селективного этанолиза подсолнечного масла путем применения липазы *Rhizomucor miehei*, иммобилизованной на макропористых анионообменных смолах. Количественные превращения триглицеридов с высоким выходом в этиловые эфиры жирных кислот были получены в мягких условиях реакции, которые соответствуют превращению триглицеридов в смеси двух молей этилового эфира жирных кислот и моля моноглицерида, в следствии которого исключается образование глицерина [10]. Гетерогенный биокатализатор на основе липазы из бактерий *Geobacillus stearothermophilus* G3 с активностью 23,6 ед./г был получен путем ковалентной иммобилизации на силикагеле. Биокатализатор обладал высокой эксплуатационной стабильностью: после 480 ч работы (20 циклов) он сохранял более 50% своей первоначальной активности [11].

Исходя из выше изложенного, целью настоящего исследования являлся подбор оптимального способа ориентированной иммобилизации липазы бактерии *P.aeruginosa* A12 на силикагель и определение оптимальных параметров биокатализа.

Нами ранее сообщалось о разработке метода получения бактериальной липазы из *P.aeruginosa* A12, а также физико-химических и каталитических свойствах выделенного фермента [12, 13].

Объекты и методы исследования

10 г силохрома кипятят в течение 2 ч в 60 мл безводного толуола в присутствии 2 мл *g*-аминопропилтриэтоксисилапа. Промывают силохром 0,5 л толуола и сушат 5 ч при 50 °С и затем 5 ч при 120 °С в вакуумной сушилке при 3990 Па (30 мм рт. ст.). Амнированный силохром может длительное время храниться при комнатной температуре.

К 1 г амнированного силохрома добавля-

ют 10 мл 1% раствора глутарового альдегида в холодной дистиллированной воде, инкубируют при медленном перемешивании 4 ч при 4 °С и отмывают носитель от избытка альдегида водой. В процессе активации носитель изменяет цвет с белого на красноватый. Полноту отмывки альдегида контролируют спектрофотометрически при $E = 280$ нм.

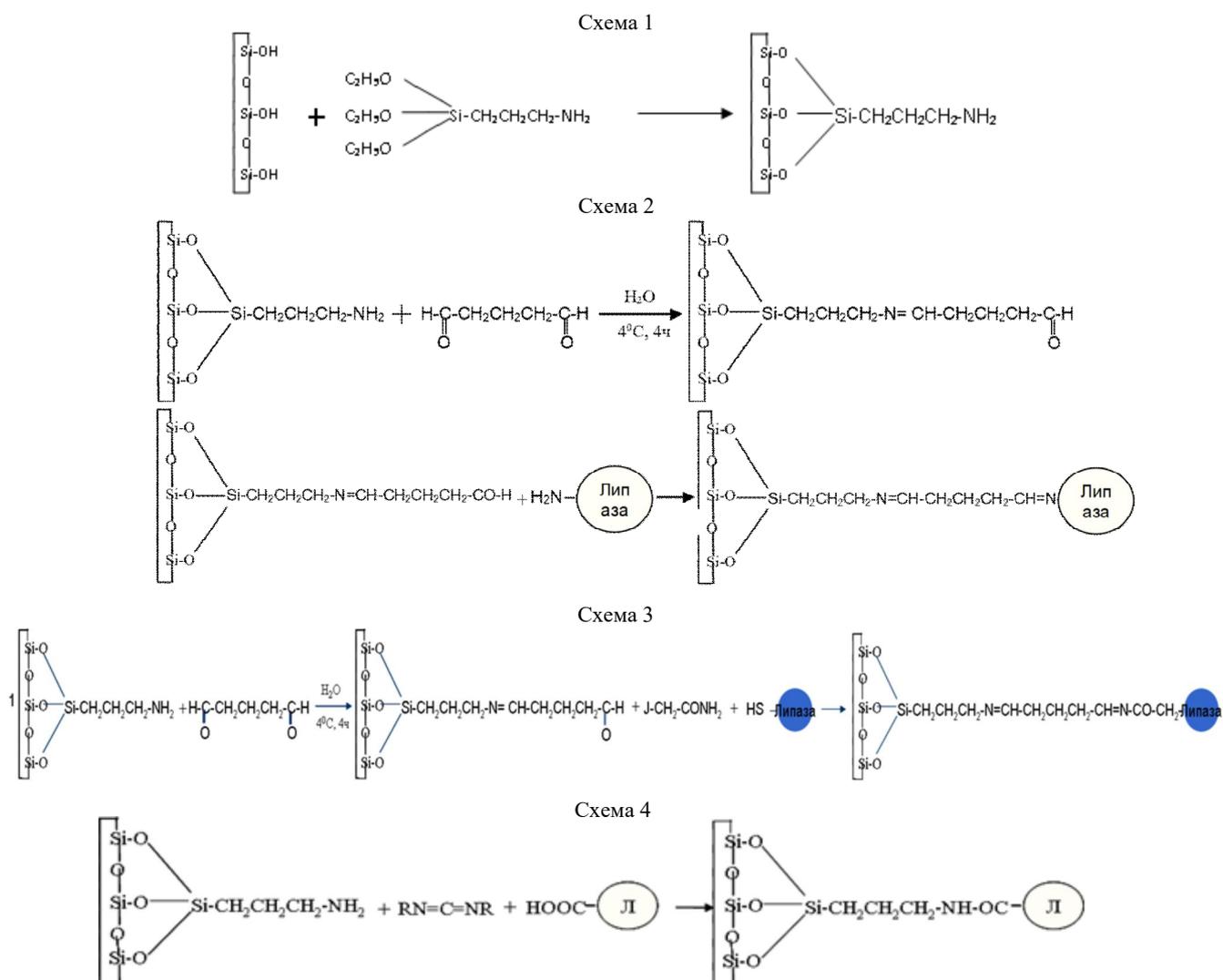
Для иммобилизации фермента с – N концевой аминокислотой, к 1 г активированного силохрома в 10 мл 0,01 М К-фосфорного буфера (рН 7,4), содержащего 0,1 М NaCl и 0,05% тритона X-100, добавляют 22 мг липазы. Инкубируют при комнатной температуре и мягком перемешивании. Через 2-3 ч отмывают носитель 1 М раствором KCl, затем 0,01 М К-фосфатным буфером с 0,1 М NaCl и хранят в том же буфере при + 4 °С.

Для иммобилизации фермента с – SH группировкой, к 1 г активированного с глутаровым альдегидом силохрома в 10 мл 0,01 М К-фосфорного буфера (рН 7,4), содержащего 0,1 М NaCl и 0,05% тритона X-100, добавляют 50 мг иодацетамида. Реакцию проводят при комнатной температуре в течение 18 часов при постоянном перемешивании, в темной склянке. После промывки водой и 0,01 М К-фосфорным буфером (рН 7,4), содержащим 0,1 М NaCl и 0,05% тритона X-100, добавляют 22 мг липазы и реакцию проводят при температуре 4 °С в течение 18 часов. Затем сорбент последовательно отмывают 1 М раствором KCl и дистиллированной водой.

Для иммобилизации фермента с –С концевой аминокислотой, к 1 г активированного силохрома в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,5, добавляют 22 мг липазы и 40 мг N,N-дициклогексилкарбодиимида. Доводят рН среды до 4 с помощью HCl и реакцию проводят в течение 18 часов при температуре 4 °С. Затем сорбент последовательно отмывают 1 М раствором NaCl и дистиллированной водой.

Количество белка определяют по Лоури [14].

Активность сорбентов после иммобилизации определяют рН-статистическим методом. В колбочки вместимостью 50 мл вносят по 0,2 мл трибутирина, 2,5 мл дистиллированной воды, содержимое встряхивают до получения однородной эмульсии. Затем добавляют по 5 мл раствора ацетата кальция и 5 мл буферного раствора; в опытные колбы вносят 0,05 мг сорбента, тщательно перемешивают и ставят в термостат для выдерживания при 37 °С в течение 1 ч. После этого во все колбы добавляют по 5,0 мл инактивирующей смеси. После перемешивания к содержимому колб приливают 0,5 мл раствора фенолфталеина и производят титрование 0,1N NaOH до появления устойчивой ярко-розовой окраски. Активность вычисляют исходя из расхода раствора 0,1N NaOH, пошедшего на титро-



вание. Активность липазы выражают в пересчете на 1 мг сорбента.

Трансэтерифицирующую способность сорбентов определяют batch методом. В 100 мл стакан помещают 50 мл смеси хлопкового масла и абсолютного этанола в соотношении 1/3 (моль/моль) и 0,05 мг синтезированного сорбента. Ферментативную реакцию проводят при комнатной температуре в течение 24 часа. По окончании времени трансэтерифицирующую способность сорбентов оценивают методом газовой хроматографии, путем определения содержания моно-, ди- и триглицеридов, а также этиловых эфиров жирных кислот.

Газовая хроматография. Хроматограф "Hewlett Packard". Колонка HP – 5 MS (30 x 0.25 мм), неподвижная жидкая фаза (5% фенилметил силикон), толщина 1 мм. Газ – гелий 2 мл/мин. Температура: испарителя 300 °С; термостат колонок в режиме программирования: 2 мин – от 100 °С до 250 °С; 5 мин 250 °С; интерфейс – 300 °С.

Результаты и обсуждение

Для синтеза аффинного сорбента, исходя

из размеров пор и частиц, а также по совместимости с растительным маслом, использовали Силохром С-80, производимый в Российской Федерации.

На первом этапе силикагель активировали с помощью γ -аминопропилтриэтоксисилана по схеме 1.

Далее для иммобилизации липазы с $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ и $-\text{COOH}$ группами, матрицу дополнительно обрабатывали глутаровым альдегидом, ио-дацетамидом и карбодиимидом как показано на схемах 2, 3, и 4.

Для каждого синтезированного сорбента определено количество иммобилизованного фермента, по методу Лоури определено количество белка в растворах до и после реакции иммобилизации. С использованием синтезированных сорбентов была проведена реакция трансэтерификации и определена активность и стабильность синтезированных сорбентов. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, при иммобилизации фермента с $-\text{NH}_2$ группами, с сорбентом связалось 7,8 мг/г липазы, при этом активность составляла 80 ед/мг, а трансэтерифицирующая

Таблица 1

Количественные показатели синтезированного сорбента Силахром 80 – Липаза из бактерии *P.aeruginosa*

Модифицирующие реагенты	Группа Аффинного лиганда	Количество			Активность после иммобилизации, ед/мг	Трансэтерифицирующая способность через 24 часа, %
		сорбента	добавленной	присоединенной		
		г	мл	липазы, мг/мл	липазы, мг/г	
Глутаровый альдегид	-NH ₂	1	12	22	7,8	80
Дициклогексил карбодиимид	-COOH	1	12	22	4,6	88
Глутаровый альдегид иодацетоамид	-SH	1	12	22	2,6	50

способность синтезированного сорбента после использования в течение 24 часов составила 62,8%. Хотя в случае иммобилизации фермента с -COOH группами количество иммобилизованной липазы меньше, чем в первом варианте (4,6 мг/г), но наблюдается увеличение активности (88 ед/мг). По трансэтерифицирующей способности он уступает сорбенту, синтезированному по первому варианту почти в 1,3 раза, и составляет 48,5%. Указанные значения при иммобилизации фермента с -SH группами намного меньше, чем у двух остальных вариантов.

Изучение условий ферментативной реакции производства биодизеля проводили в циркулирующем реакторе и исследовали влияние температуры и количества спирта на полноту протекания реакции. В качестве биокатализатора использовали синтезированные сорбенты. Влияние температуры изучали в интервале от 25 до 40 °C в течение 24 часов. При этом реакционная смесь состояла из масла и этанола в соотношениях 1/4 (моль/моль). Также было изучено влияние концентрации этилового и метилового спирта в интервале 1-4 моль. Эффективность реакции трансэтерификации контролировали методами ТХ и ГХ определением количества моно-,

ди- и триглицеридов, а также алкилэфиров жирных кислот. Полученные результаты приведены на рисунке 1.

Как видно из гистограмм, во всех случаях повышение температуры реакционной среды до 35 °C проводит к увеличению образования биодизеля, а далее процесс конверсии уменьшается. Максимальная конверсия с использованием синтезированных сорбентов наблюдалась при температуре 35 °C. При этом 90% конверсии происходило на сорбенте с иммобилизованной липазой с -NH₂ группой, тогда как на аффинных сорбентах, иммобилизованных с -COOH и -SH группами, эта величина составляла 87 и 53%, соответственно. При температуре 40 °C в сравнении с 35 °C, активность сорбентов уменьшалась на 25% и 30%.

Таким образом, экспериментально определенной оптимальной температурой ферментативного катализа в реакторе с синтезированными сорбентами является 35 °C.

Для определения оптимального соотношения алкилирующего агента и масла, эксперименты проведены в не циркулирующем реакторе, при 35 °C в течение 24 часов в различных соотношениях масла к метиловому и этиловому

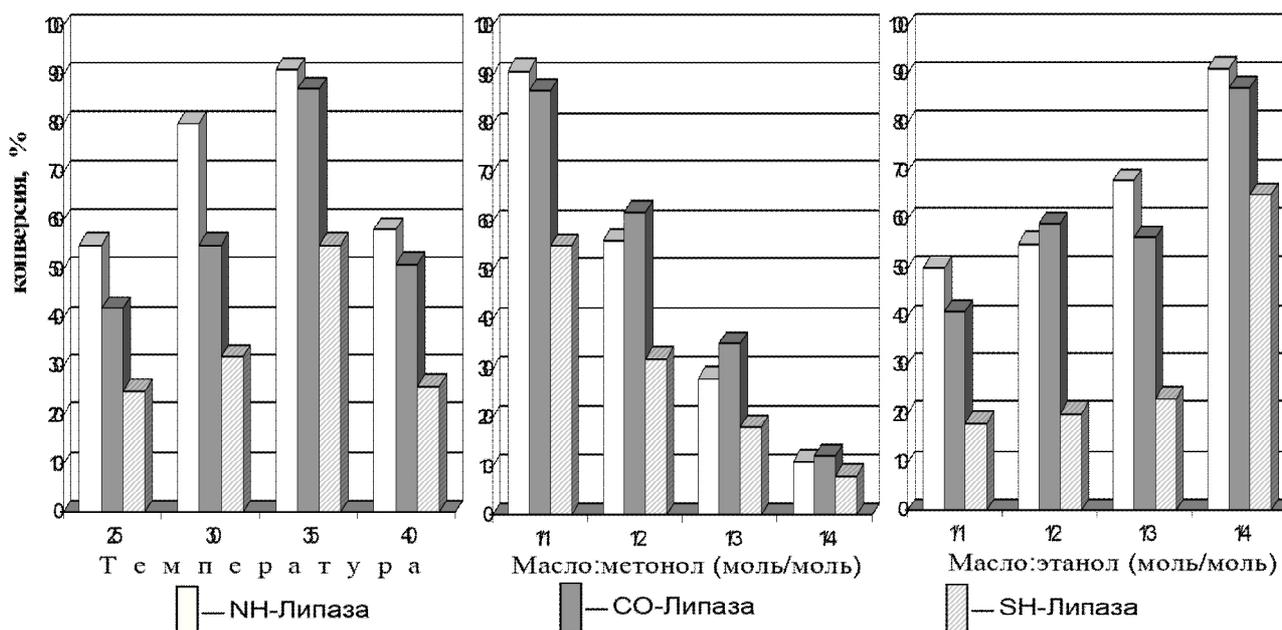


Рисунок 1. Подбор оптимальных условий ферментативной трансэтерификации.

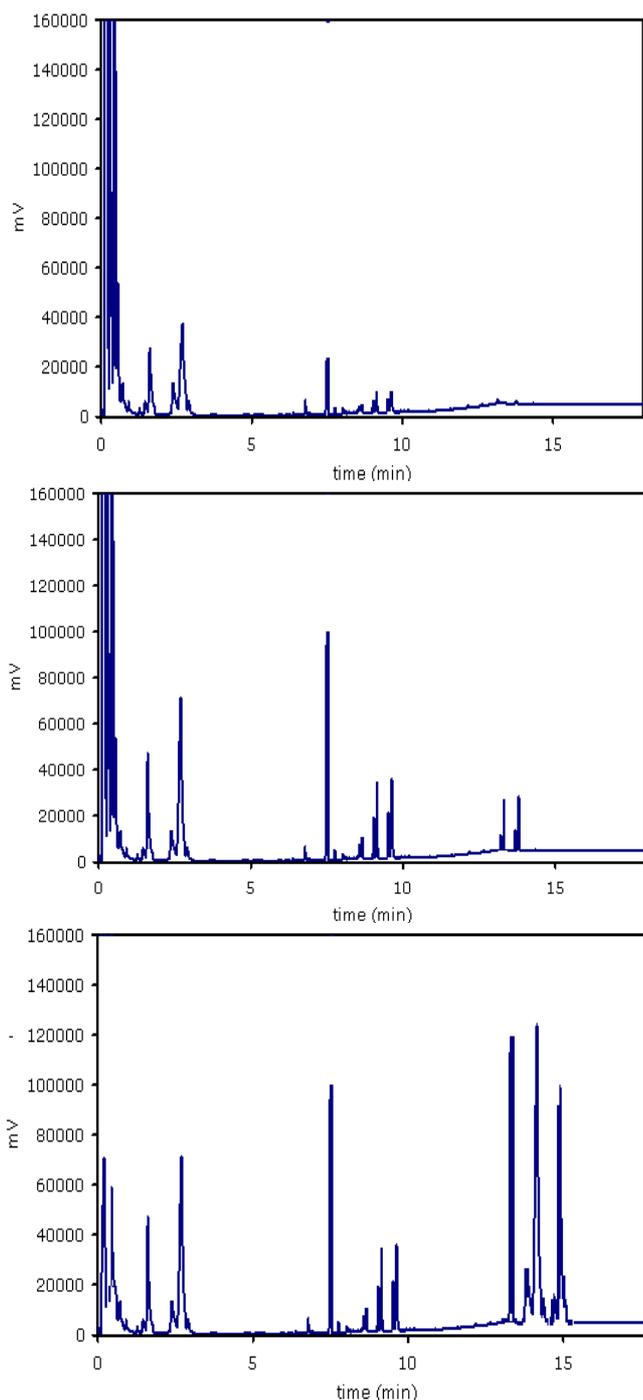


Рисунок 2. Хроматограммы, полученные при анализе образцов через 1, 10 и 20 суток.

спирту. В целях более четкого сравнения эффективности реакции, полученные результаты были умножены на соответствующие коэффициенты, например, полученные результаты при соотношении 1/1 были умножены на 4, а 1/2 умножены на 2. Полученные результаты приведены на рисунке 1.

Как видно из гистограмм, увеличение концентрации метанола резко уменьшает процесс переэтерификации, которое объясняется инактивацией ферментов.

Таким образом, оптимальным условием получения биодизеля из растительных масел ферментативным методом в не циркулирующих ре-

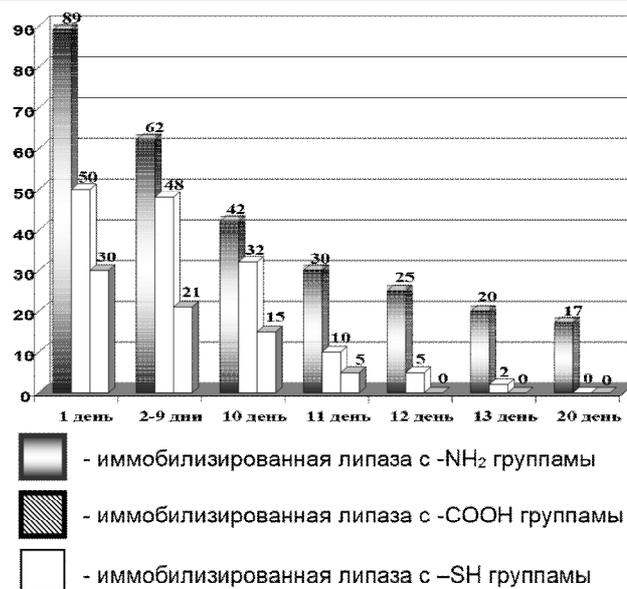


Рисунок 3. Эффективное действие биокатализаторов в процессе получения биодизеля.

акторах является: соотношение масла к этиловому спирту 1/4 (моль/моль) при температуре 35 °С.

Для исследования продолжительности эффективного действия биокатализатора проводили биокатализ в течение 20 дней на колонке с синтезированными аффинными сорбентами, при определенных оптимальных условиях. Процесс проводили без циркуляции и каждые 24 часа отбирали аликвотны на выходе биореактора и определяли количество этиловых эфиров, моно-, ди-, и триглицеридов. Профили ГХ хроматограмм, полученных при анализе образцов через 1, 10 и 20 суток приведены на рисунке 2.

Как видно из хроматограмм, в первые сутки эффективность биокатализа была высокой, так как не были обнаружены триглицериды. Из следующих хроматограмм видно, что интенсивность пиков, соответствующих эфирам жирных кислот уменьшается и интенсивность пиков для моно-, ди- и триглицеридов возрастает, что свидетельствует об постепенной инактивации ферментов. Результаты проведенных количественных анализов приведены на рисунке 3.

По результатам анализа, в первый день эффективность биокатализа достигала 89, 50 и 30% соответственно. В течение следующих восьми дней наблюдался стабильный биокатализ со сходными величинами преобразования растительного масла в этиловые эфиры 13 об.%, моноглицериды 1 об.%, диглицериды-4 об.%, триглицериды 82 об.%, а общая трансэтерификация составляла 62, 48 и 21%. В следующие четыре дня эффективность биокатализа с аффинным сорбентом иммобилизированной с -NH₂ группой липазы уменьшалась до 42, 30, 25, 20% соответственно, а другие два сорбента инактивировались. На 20 день биокатализ на сорбенте иммобилизированной с -NH₂ группой липазы все еще действовал, и величина конверсии составляла 17%.

Заклучение

Биокатализ с аффинным сорбентом иммобилизованным $-\text{NH}_2$ группой обладает высокой эксплуатационной стабильностью: после 240 ч работы он сохраняет более 50%, после 480 ч

17% своей первоначальной активности, но, несмотря на хорошие показатели на начальном этапе использования, биокатализаторы постепенно теряют свою активность под воздействием реакционной смеси.

REFERENCES

1. Pliego J., Mateos J.C., Rodriguez J., Valero F., Baeza M., Femat R., Camacho R., Sandoval G., Herrera-Lopez E.J. Monitoring lipase/esterase activity by stopped flow in a sequential injection analysis system using p-nitro phenyl butyrate. *Sensors* (Switzerland), 2015, no. 15, pp. 2798–2811. doi: 10.3390/s150202798.
2. Ulker S., Ozel A., Colak A., Karaoglu S.A. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. *Turkish Journal of Biology*, 2011, no. 35, pp. 543–550. doi: 10.3906/biy-1004-107
3. Brockerhoff H., Jensen R.G. Lipolytic enzymes. New York, Academic Press, 1974. 342 p. (Russ. ed.: Brokerhof H., Jensen R.G. Lipoliticheskiye fermenty. Moscow, Mir, 1978. 396 p.)
4. Schmid R., Verger R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie*, 1998, no. 37, pp. 1608–1633. doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V.
5. Semenov V.G., Kuxta V.G. Dizelnoe toplivo iz rapsa [Diesel fuel from rapeseed. Storage and processing of grain]. *Xranenie i pererabotka rapsa*, 2000, no. 12, pp. 59–61.
6. Yuzbasheva E.Y., Mostova E.B., Perkovskaya N.I., Sineokii S.P., Gotovtsev P.M., Lomonosova M.A., Butylin V.V., Vasilov R.G. Biodiesel production via enzymatic catalysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2014, vol. 50, no. 8, pp. 737–749.
7. Raman J.K., Abang S., Poncet D. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2008, vol. 28, no. 4, pp. 253–64. doi: 10.1080/07388550802428392
8. Yilmaz E., Can K., Sezgin M., Yilmaz M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester. *Bioresour. Technol.*, 2011, vol. 102, pp. 499–506. doi: 10.1016/j.biortech.2010.08.083.
9. Samoylova Yu.V., Piligayev A.V., Sorokina K.N., Parmon V.N. Primeneniye immobilizirovannoy rekombinantnoy lipazi bakterii *Geobacillus stearothermophilus* v reakcii pereeterifikatsii podsolnechnogo i gidrirovannogo soevogo masla [The use of immobilized recombinant lipase of *Geobacillus stearothermophilus* in the transesterification reaction of sunflower and hydrogenated soybean oil]. *Kataliz v promishlennosti*, 2016, no. 5, pp. 66–74. doi:10.18412/1816-0387-2016-5-66-74
10. Calero J., Verdugo C., Luna D., Sancho E.D., Luna C., Posadillo A., Bautista F.M., Romero A.A. Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, an immobilized *Rhizomucor miehei* lipase, to obtain a biodiesel-like biofuel, which avoids glycerol production through the monoglyceride formation. *New Biotechnol.* 2014, vol. 31, pp. 596–601. doi: 10.1016/j.nbt.2014.02.008.
11. Samoylova Yu.V., Piligayev A.V., Sorokina K.N., Rozanov A.C., Peltek S.E., Novikov A.A., Almyasheva N.R., Parmon V.N. Primeneniye immobilizirovannoy rekombinantnoy lipazi bakterii *Geobacillus stearothermophilus* G3 dlya polucheniya metilovix efirov jirnix kislot [The use of immobilized recombinant lipase bacteria *Geobacillus stearothermophilus* G3 for the production of methyl esters of fatty acids]. *Kataliz v promishlennosti*, 2015, vol. 15, no. 6, pp. 90–96. doi: 10.1134/S2070050416020082.
12. Berdiev N.Sh., Ziyavitdinov J.F., Bozorov S.S., Ishimov U.J., Olimzhonov Sh.S., Fazliddinov Sh.J., Salikhov Sh.I. *Pseudomonas aeruginosa* bakteriyasi cultural suyuqligidan ajratilgan lipaza fermentining strukturasi aniqlash [Pseudomonas aeruginosa bacterium as a cultured ligand Azhratilgan lipase fermentation of the structure of the rainy anilash]. *Aktualniy problemi ximii prirodnix soedineniy* [Actual problems of chemistry of natural compounds]. Tashkent. 2019, pp. 107.
13. Berdiev N.Sh., Ziyavitdinov Z.F., Fazliddinov Sh.J., Sadullaev Sh.T., Sherimbetov S.G. Biodizel – alternativniy istochnik energii [Biodiesel - an alternative source of energy]. *Universum*. 2019, vol. 60, no. 6, pp. 21–26.
14. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, pp. 265–275.