

УДК 579.841.21:577.11

БИОСИНТЕЗ АЛЬГИНАТОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *Azotobacter*

© 2017 г. Г. А. Бонарцева*, Е. А. Акулина*, В. Л. Мышкина*, В. В. Воинова*. **, ***,
Т. К. Махина *, А. П. Бонарцев*, **, ***

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”, Москва, 119071

**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234

***Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603950

e-mail: bonar@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 11.05.2016 г.

Изучена способность представителей различных видов бактерий рода *Azotobacter* (*A. chroococcum* 7Б, *A. chroococcum* 12Б, *A. chroococcum* 12БС, *A. agile* 12, *A. indicum* 8, *A. vinelandii* 17, *A. vinelandii* 5Б) к синтезу альгинатов. Показано, что все испытанные штаммы бактерий в различной степени обладали этой способностью. Капсулярный альгинат составлял от 2.6% до 32% от общего количества синтезируемого альгината у разных видов бактерий. Отобраны штаммы, способные к активному синтезу альгинатов, изучено влияние состава среды на биосинтез. Оптимальные условия для синтеза альгинатов штаммом-продуцентом *A. chroococcum* 12БС: присутствие в среде маннита (40 г/л), дрожжевого экстракта (1%) и низкое содержание фосфатов (K_2HPO_4 – 0.008 г/л, K_2HPO_4 – 0.032 г/л); продукция альгината в этих условиях составляла 4.5 г/л. Показано влияние аэрации на синтез полимеров: увеличение аэрации приводило к увеличению синтеза альгинатов, уменьшение способствовало синтезу поли-3-оксибутирата. Методом ИК-спектроскопии показано, что альгинаты, полученные при разных условиях культивирования, содержали в цепи полимера различное соотношение остатков маннуроновых и гулууроновых кислот (M/G от 70/30 до 80/20), а также различались количеством ацетильных групп (от 10% до 25%) в структуре полимера.

Ключевые слова: биосинтез, биополимеры, экзополисахариды, альгинаты, полиоксиалканоаты, *Azotobacter*

DOI: 10.7868/S055510991701007X

Альгинаты (АЛГ) – полиуроновые кислоты, в состав которых входят в различном соотношении сополимеры β-D-мануроно- и α-L-гулууроно-кислоты, связанные 1–4 гликозидной связью. АЛГ продуцируются некоторыми видами бурых водорослей (Phaeophyceae), а так же синтезируются в качестве экзополимера бактериями рода *Pseudomonas sp.* и *Azotobacter sp.* [1]. АЛГ, синтезируемые бактериями, отличаются от продуцируемых водорослями присутствием ацетильных групп у С2 и С3 атомов остатков мануроновых кислот и более высокой молекулярной массой [2]. Молекулярная масса АЛГ водорослей колеблется в пределах 50–200 кДа, а молекулярная масса бактериальных АЛГ может достигать 4000 кДа. Ацетилирование и высокая молекулярная масса прямо связаны с реологическими свойствами растворов АЛГ и определяют возможность их применения в пищевой и фармацевтической промышленности [3]. Бактериальный синтез АЛГ дает возможность регулировать молекулярный состав и молекулярную массу полимера, что для водорослей практически невозможно, так как мономерный состав и молекулярная масса

АЛГ зависят от вида водорослей и условий их произрастания, а при выращивании в природных условиях сложно регулировать такие факторы, как температура, интенсивность света и т.д. [4].

Бактерии рода *Azotobacter* продуцируют два класса биотехнологически важных полимеров – полиоксиалканоаты (ПОА), которые являются запасными веществами бактерий, и АЛГ, выполняющие защитную функцию. Функция защиты от различных неблагоприятных факторов является одной из основных функций бактериальных АЛГ. Считается, что АЛГ нужны клетке для создания диффузионного барьера от O_2 и защиты от него нитрогеназы. При этом у АЛГ, который выполняет эту функцию, отмечено высокое содержание гулууроновой кислоты [5]. Клементи с соавт. показали, что обладая высокой аффинностью к ионам кальция, АЛГ защищают клетку от токсического действия тяжелых металлов, а также от неблагоприятных условий окружающей среды – высушивания, высокой температуры и др. [6].

Использование бактерий рода *Azotobacter* для биосинтеза АЛГ предпочтительнее, чем работа с бактериями рода *Pseudomonas*. Во-первых, бактерии рода *Pseudomonas* являются патогенными или условно-патогенными, что затрудняет работу с ними. Во-вторых, синтезируемые ими АЛГ обладают меньшей вязкостью, так как в их полимерной цепи реже встречаются остатки гулуруоновой кислоты, отвечающие за образования сшивков между полимерными цепями [7].

Основным параметром, оказывающим влияние на рост бактерий и синтез ими полимеров, является аэрация. Показано, что добавление фосфатов вызывает уменьшение количества АЛГ, а источников азота увеличивает синтез [3, 8].

АЛГ, получаемые из водорослей, много лет используются в качестве материала для исследований в различных областях биологии и медицины, а также в медицинской практике, например, в качестве носителя для доставки лекарств, раневых покрытий, материалов для стоматологии и в некоторых случаях при болезнях ЖКТ. Одно из преимуществ использования АЛГ в качестве пероральных препаратов – это их способность сохранять гелеобразное состояние даже в условиях низкой кислотности желудочного сока. Эти особенности позволяют АЛГ осуществлять эффективную защиту ЖКТ при гастритах и других заболеваниях [9]. Исследование возможности получения АЛГ бактериями рода *Azotobacter* является сегодня весьма актуальной задачей.

Цель работы – изучение влияния условий культивирования бактерий *Azotobacter chroococcum* на синтез и физико-химический состав АЛГ.

МЕТОДИКА

Объект исследования. В работе использованы штаммы из коллекции бактерий рода *Azotobacter*: *A. chroococcum* 12Б, *A. chroococcum* 12БС (обладающий повышенной способностью к слизиобразованию), *A. chroococcum* 7Б, *A. agile* 12, *A. indicum* 8, *A. vinelandii* 17, *A. vinelandii* 5Б, выделенные из дерново-подзолистых почв Подмоскovie. Коллекция поддерживается в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН. Культурально-морфологические признаки штаммов: колонии крупные, слизистые; клетки продолговатой формы, грамотрицательные, подвижные (со жгутиками), расположены одиночно, парами и в цепочках, строгие аэробы.

Для поддержания культур бактерий использовали твердую питательную среду Эшби, следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 0.2, $MgSO_4$ – 0.2, $NaCl$ – 0.2, Na_2MoO_4 – 0.006, $CaCO_3$ – 5.0, сахароза – 20, агар – 20.

Условия культивирования *A. chroococcum*. Для культивирования бактерий в жидкой среде традиционно используется жидкая среда Берка следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.2, K_2HPO_4 – 1.05, $MgSO_4$ – 0.4, $NaCl$ – 0.1, $FeSO_4$ – 0.01, Na_2MoO_4 – 0.06, $CaCl_2$ – 0.1, цитрат Na – 0.5, сахароза – 20.

Для изучения влияния условий культивирования на синтез АЛГ были использованы варианты среды Берка, а именно: в качестве источника углерода использовали разные концентрации сахарозы; сахарозу заменяли маннитом; изменяли концентрацию фосфатов в среде; вносили разные концентрации дрожжевого экстракта в качестве источника азота.

Приготовление посевного материала. *A. chroococcum* выращивали на жидкой среде Берка в качалочных колбах объемом 750 мл (200 мл среды) при 250 об./мин, исходный pH среды – 7.2; температура культивирования – 28°C; возраст посевного материала – 1 сут; объем вносимого посевного материала – 4%.

Культивирование *A. chroococcum* для изучения синтеза АЛГ проводили в тех же условиях, что и выращивание посевного материала, но с изменением состава среды. Длительность проведения ферментации – 72 ч. Ферментацию проводили в качалочных колбах на 750 мл (объем культуральной среды – 200 мл) на микробиологической качалке Innova 43 (“New Brunswick Scientific”, США) при различных скоростях перемешивания: 200, 280, 340 об./мин. Оптическую плотность культуральной жидкости определяли нефелометрически при 520 нм. Морфологию бактерий рода *Azotobacter* исследовали методом световой микроскопии с использованием микроскопа Биомед-1 (“Биомед”, Россия) с цифровой камерой. Для визуализации клеток и альгината использовали окраску фуксином. Определение содержания полиоксибутирата (ПОБ) в клетках бактерий проводили экстракцией хлороформом [2].

Определение и накопления АЛГ культурой *A. chroococcum*. Для разрушения капсул и уменьшения вязкости раствора к 100 мл культуры добавляли 10 мл 0.1 М раствора ЭДТА и 10 мл 1.0 М $NaCl$. Затем образцы центрифугировали при 4500 г в течение 30 мин. Осадок отделяли, промывали водой и высушивали при 60°C до постоянного веса. Для определения АЛГ к супернатанту добавляли трехкратный объем изопропанола или этилового спирта. Осадок собирали центрифугированием (20 мин при 2000 г) высушивали и растворяли в воде. Эту процедуру повторяли трижды, после чего осадок промывали дистиллированной водой и высушивали, получая растворимый в воде сухой АЛГ натрия. Все опыты и измерения проводили в трехкратной повторности.

Качественную реакцию на АЛГ проводили с $CaCl_2$ [4]. Для этого к 1 мл культуральной жидкости приливали 10 мл 10%-ного раствора $CaCl_2$.

Таблица 1. Образование АЛГ бактериями рода *Azotobacter* при культивировании на твердой среде Эшби

Вид, штамм	Биомасса, г/л	АЛГ, г/г биомасы.	Капсулярный АЛГ, г/г биомассы	Доля капсулярного АЛГ от общего АЛГ, %
<i>A. chroococcum</i> 7Б	8.75	5.88	1.88	32.0
<i>A. chroococcum</i> 12Б	4.56	8.32	1.35	16.2
<i>A. chroococcum</i> 12БС	4.52	8.20	1.10	13.4
<i>A. agile</i> 12	9.34	5.07	0.15	3.0
<i>A. indicum</i> 8	5.27	8.48	2.31	27.2
<i>A. vinelandii</i> 17	0.89	5.61	0.15	2.6
<i>A. vinelandii</i> 5Б	1.06	8.23	1.40	17.0

Наблюдали образование АЛГ кальция, сформированного в виде нерастворимого в воде хлопьевидного осадка.

Определение вязкости АЛГ. Молекулярную массу АЛГ определяли методом вискозиметрии. Измерения вязкости раствора АЛГ в 0.2 М NaCl проводили при температуре 25°C.

Удельную вязкость рассчитывали по формуле:

$$\eta_{уд} = (t - t_0)/t_0,$$

где: t_0 – время истечения растворителя, с; t – время истечения раствора полимера, с.

Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка–Хаувинка–Сакурада [4] $[\eta] = K(M)^a$, используя следующие коэффициенты: $K = 7.3 \times 10^{-5}$; $a = 0.92$;

$$[\eta] = 7.3 \times 10^{-5} \times (M)^{0.92},$$

M – молекулярная масса, $[\eta]$ – вязкость [10].

ИК-спектроскопия. ИК спектры регистрировались в режиме отражения на ИК микроскопе Nuregion-2000, сопряженном с ИК-Фурье спектрометром IFS-66 v/s (кристалл Ge, разрешение 2 см^{-1} , диапазон $4000\text{--}600 \text{ см}^{-1}$, скан.-50) (“Bruker”, США). Для сравнения этим методом был также исследован АЛГ, выделенный из водорослей коммерческий образец (“Sigma-Aldrich”, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Была проведена оценка способности разных видов бактерий рода *Azotobacter* к синтезу АЛГ. В работе использованы штаммы, способные к синтезу ПОБ, имеющиеся в коллекции азотфиксирующих микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнология РАН (Россия): *A. chroococcum* 7Б, *A. chroococcum* 12Б, *A. chroococcum* 12БС, *A. agile* 12, *A. indicum* 8, *A. vinelandii* 17, *A. vinelandii* 5Б.

Все штаммы разных видов *Azotobacter* были способны к синтезу АЛГ (табл. 1), однако, количество синтезированного полимера различалось у разных видов. Показано, что капсулярный АЛГ

составлял у разных видов от 2.6% до 32% от общего АЛГ. Капсулярный АЛГ, как правило, содержит большее количество гулурановых звеньев в цепи полимера, обладая большей способностью к гелеобразованию, что функционально важно для клетки при образовании защитной капсулы. Были отобраны потенциальные продуценты АЛГ – штаммы, способные к активному синтезу полимера.

Для дальнейших исследований были выбраны штаммы *A. chroococcum* 12Б и 12БС, способные к активному росту и активному синтезу АЛГ с большой долей капсулярного АЛГ.

Известно, что условия ферментации определяют мономерный состав цепи, молекулярную массу и степень ацетилирования бактериальных АЛГ. Состав питательной среды является определяющим при синтезе бактериальных АЛГ. В частности, источники углерода, азота, содержание в среде молибдена, железа, магния, калия, натрия, сульфатов, и особенно кальция и фосфатов влияют как на рост бактерий, так и на способность их к синтезу полимеров [2, 3].

В используемой для выращивания бактерий среде Берка снижали концентрацию фосфатов в 4 раза [11]. Кроме того, в среду Берка, не содержащую источника азота, добавляли дрожжевой экстракт в количестве 1.0 и 3.0 г/л [8]. Проводили также замену источника углерода – сахарозы на маннит [1].

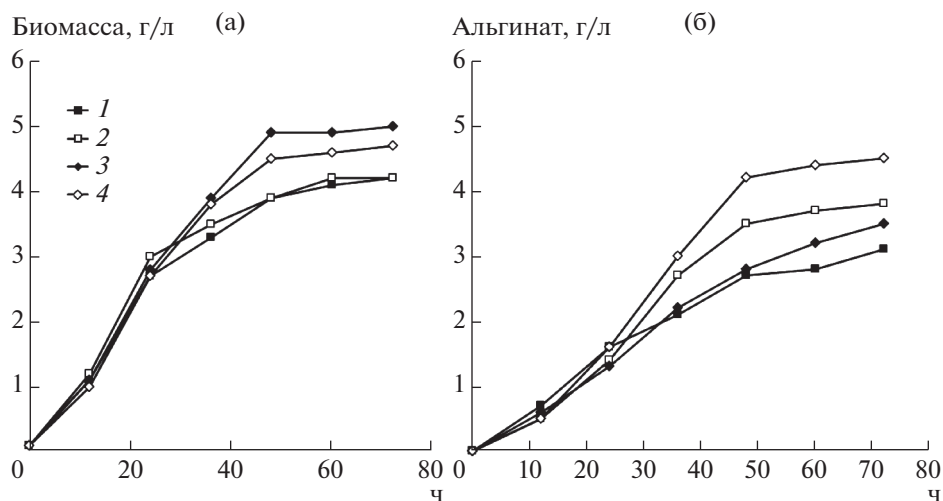
В табл. 2 представлены результаты определения выхода биомассы и синтеза АЛГ культурами *A. chroococcum* 12Б и 12БС на средах различного состава, на рис. 1 – кривые роста культур *A.* и синтеза АЛГ на отобранных средах Берка с сахарозой и мелассой в качестве основных источников углерода с добавлением дрожжевого экстракта. Из представленных данных видно, что на всех испытанных средах рост культур различался незначительно. Наилучший рост культуры 12Б и 12БС наблюдался при добавлении дрожжевого экстракта, что объясняется добавлением в среду источника азота.

Таблица 2. Биосинтез АЛГ культурами *Azotobacter chroococcum* 12Б и *Azotobacter chroococcum* 12БС на модифицированных средах Берка различного состава

Среда Берка	Источник углерода, 40 г/л	Дрожжевой экстракт, г/л	Фосфаты, г/л	Выход биомассы, г/л	Продукция АЛГ, г/л
<i>Azotobacter chroococcum</i> 12Б					
1	Сахароза	Нет	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	4.3	2.5
2.1	Маннит	Нет	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.2, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 1.05$	4.2	2.2
2.2	»	Нет	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	4.2	2.5
3.1	Сахароза	1.0	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	4.2	3.1
3.2	»	3.0	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	4.7	2.8
4.1	Маннит	1.0	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	4.2	3.8
4.2	»	3.0	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	5.2	3.2
5	Сахароза	Нет	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.2, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 1.05$	4.4	0.8
<i>Azotobacter chroococcum</i> 12БС					
1	Сахароза	Нет	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	4.3	2.2
2.1	Маннит	Нет	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.2, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 1.05$	4.1	1.5
2.2	»	Нет	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	3.4	2.7
3.1	Сахароза	1.0	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	5.0	3.5
3.2	»	3.0	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	5.7	2.0
4.1	Маннит	1.0	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	4.7	4.5
4.2	»	3.0	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$	5.0	3.8
5	Сахароза	Нет	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.2, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 1.05$	4.9	0.9

Показано также, что обе культуры при культивировании в течение 72 ч синтезировали максимальные количества АЛГ – 3.7 г/л и 4.5 г/л соответственно на среде с маннитом в качестве источника углерода и с добавлением дрожжевого экстракта в количестве 1 г/л при низком содержании в среде

фосфатов $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.008, \text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.032$ г/л. На стандартной среде культивирования (среда Берка) обе культуры синтезировали минимальное количество АЛГ. Использование других модификаций этой же среды приводило к более высокому выходу полимера. Во всех вариантах проводили

**Рис. 1.** Динамика роста биомассы (а) и продукции альгинатов (б) культурами *A. chroococcum* 12Б и *A. chroococcum* 12БС на средах Берка 3.1 и 4.1.

1 – *A. chroococcum* 12Б, среда Берка 3.1; 2 – *A. chroococcum* 12Б, среда Берка 4.1; 3 – *A. chroococcum* 12БС, среда Берка 3.1; 4 – *A. chroococcum* 12БС, среда Берка 4.1.

Обозначения и характеристики сред Берка приведены в табл. 2.

Таблица 3. Влияние аэрации на биосинтез полимеров АЛГ и ПОБ при выращивании *A. chroococcum* 12БС на среде Берка с сахарозой (40 г/л)

Скорость перемешивания, об./мин	Биомасса, г/л	АЛГ, г/л	ПОБ, г/л	АЛГ : биомасса, %	Отношение ПОБ : биомасса, %
340	2.6	2.2	1.5	83.3	77.6
280	5.1	1.1	3.2	21.2	81.5
200	4.4	1.1	2.5	25.8	78.3

Таблица 4. Влияние состава среды на молекулярную массу и характеристическую вязкость АЛГ *A. chroococcum* 12БС на различных средах

Среда Эшби	Источник углерода, 40 г/л	Дрожжевой экстракт	Фосфат, г/л	Характеристическая вязкость, см ³ /г	Молекулярная масса, кДа
1	Сахароза	Нет	0.2	2.2	75
2	Сахароза	Нет	0.05	2.3	98
3	Сахароза	1 г/л	0.05	2.25	94
4	Маннит	Нет	0.05	2.4	88

качественную реакцию на АЛГ с CaCl₂ по образованию осадка АЛГ кальция и во всех вариантах отмечали его образование.

Основным параметром, влияющим на рост бактерий и синтез ими полимеров, является аэрация [3]. Культивирование бактерий *A. chroococcum* 12БС при различных условиях аэрации (об. качалки/мин) проводили в течение 3 сут на среде Берка с сахарозой в качестве источника углерода. Из результатов, представленных в табл. 3, видно, что максимальный рост бактерий отмечался при 280 об./мин. Выход биомассы достигал 5.1 г/л. В этом варианте опыта отмечен и самый высокий выход ПОБ – 3.2 г/л. Увеличение степени аэрации до 340 об./мин снижало прирост биомассы клеток в 2 раза – до 2.6 г/л. При максимальной аэрации отмечался также самый низкий уровень выхода ПОБ, что связано, прежде всего, с низким выходом биомассы в этих условиях. В то же время, в этих условиях аэрации активно синтезируются АЛГ (2.2 г/л). Снижение аэрации до 200 об./мин незначительно снижало выход биомассы и ПОБ и не влияло на выход АЛГ. Таким образом, увеличение аэрации приводило к увеличению синтеза АЛГ, тогда как уменьшение аэрации, наоборот, способствовало синтезу ПОБ. Полученные данные согласуются с литературными данными [2, 5, 8, 12].

В табл. 4 представлены результаты изучения влияния состава среды на молекулярную массу полимера. В условиях эксперимента молекулярная масса в различных вариантах изменялась незначительно и не превышала 98 кДа. Французскими исследователями [13] при работе со штам-

мом *A. vinelandii* NCIMB 9068 был также получен альгинат с относительно низкой молекулярной массой (168 кДа), и они также не наблюдали значительного изменения молекулярной массы при изменении состава среды для продуцента. При снижении концентрации фосфатов в среде с 0.2 до 0.05 г/л мы наблюдали увеличение молекулярной массы на 20–25%. Добавление в среду источника азота (дрожжевой экстракт) практически не изменяло молекулярную массу синтезируемого АЛГ.

АЛГ, синтезированные *A. chroococcum* 12БС при различных условиях и различном составе среды, исследовали методом ИК-спектроскопии. Полученные ИК-спектры бактериального АЛГ представлены на рис. 2, а все результаты в табл. 5. Спектры синтезированных бактериальных АЛГ сходны и имеют общие полосы поглощения, отличаясь только относительными интенсивностями полос при 1600 см⁻¹ (COO⁻), 1720 см⁻¹ (COCH₃), 819 см⁻¹ (M-блоки) и 765 см⁻¹ (G-блоки). Одновременно тем же методом был исследован коммерческий препарат АЛГ из водорослей. На рис. 2б представлено сравнение двух спектров АЛГ, синтезированного *A. chroococcum* 12БС в условиях культивирования на среде Эшби и выделенного из водорослей. Спектры схожи и имеют общие полосы, однако есть и различия, заключающиеся в присутствии у бактериального АЛГ полос 1720 и 1245 см⁻¹, кроме того отмечено усиление полосы 1030 см⁻¹. Именно эти сигналы характерны для полос поглощения ацетильных групп (1245 и 1720 см⁻¹) [4]. Известно, что бактериальные АЛГ ацетилены по положениям 2 и/или 3 остатков D-маннуроновой кислоты и для АЛГ, содер-

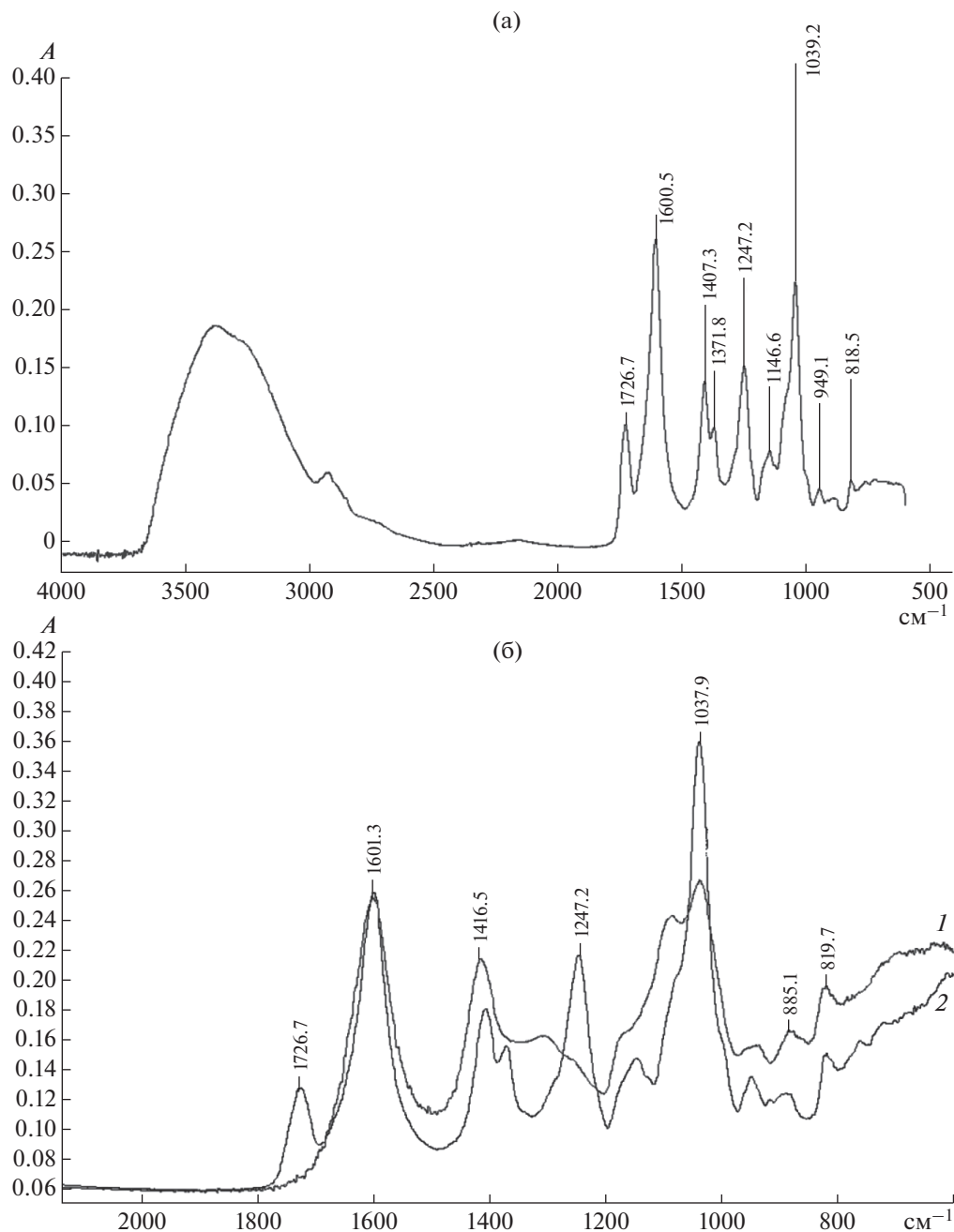


Рис. 2. Полный ИК-спектр АЛГ, полученного при культивировании *A. chroococum* 12БС на среде Эшби (а). ИК-спектры в интервале значений от 2000 до 500 см^{-1} АЛГ из водорослей (1) и бактериального АЛГ (2), полученного при культивировании *A. chroococum* 12БС на среде Эшби (б).

жащих более 55% маннуриновых остатков, характерно содержание более чем 22% ацетильных групп [14].

Наличие в полимерной цепи маннуриновой кислоты определяется на ИК-спектре полосой поглощения валентных колебаний пиранозного кольца маннуриновой кислоты (**M**) – 819 см^{-1} , а наличие гулуриновой кислоты (**G**) полосой по-

глощения на 765 см^{-1} . Относительные интенсивности указанных полос, а также их процентное соотношение приведены в табл. 5.

Соотношение полос 1600 и 1720 см^{-1} определяет процент ацетилированных остатков в полимере, соотношение полос 819 см^{-1} и 765 см^{-1} определяет соотношение количества маннуриновых остатков к гулуриновым (**M/G**). Соотношение маннуриновой

Таблица 5. Влияние состава среды на содержание маннурановой и гулурановой кислот, а также уровень ацетилирования исследуемых АЛГ, определенный по полосам поглощения в ИК-спектрах

Образец АЛГ (получен)	D_{1600}/D_{1726}	Степень ацетилирования, %	D_{819}/D_{765}	М/Г
Из водорослей	88.6**	1	4.4***	80/20
На среде Эшби 1*	3.0	25	2.6	72/28
На среде Эшби 2	9.3	10	4.3	81/19
На среде Эшби 3	2.9	26	3.1	75/25
На среде Эшби 4	3.6	22	2.4	70/30

* Характеристики сред приведены в табл. 4.

** Полоса 1726 см^{-1} в этом спектре отсутствовала, поэтому за интенсивность при 1726 см^{-1} принят общий фон поглощения.

*** Вместо полосы 765 см^{-1} в этом спектре проявлялась полоса 787 см^{-1} .

и гулурановой кислот в цепи АЛГ может различаться в зависимости от источника получения полимера. Именно от количества гулурановых остатков и их распределения в цепи зависит способность АЛГ к гелеобразованию [4]. Практически во всех полученных нами образцах наблюдали более высокое содержание гулурановых остатков, по сравнению с АЛГ водорослей, кроме образца, полученного при выращивании на среде с низким содержанием фосфатов. Этот образец так же показал низкий процент ацетилирования. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами немецких ученых [15], исследовавших синтез АЛГ бактериями *A. vinelandii* ATCC 9046, и показавших, что соотношение остатков в полученном ими полимере составило М/Г = 60/40, а наблюдаемое ацетилирование от 30% до 60%. Интересно отметить, что в работе Логинова Я.О. на среде Федорова [1], близкой по составу к используемой нами среде Берка, при ферментации *A. vinelandii* ИБ1 получен АЛГ с преобладанием в цепи полимера гулурановой кислоты над маннурановой (М/Г = 30/70) [1], что позволяет сделать вывод о большом значении вида и штамма используемого продуцента АЛГ.

Таким образом, нами получены АЛГ с различным содержанием маннурановой и гулурановой кислот в цепи полимера. Показано наличие ацетилирования урановых кислот в цепи бактериальных АЛГ в отличие от полимера водорослей. Изменение условий культивирования влияло на соотношение маннурановых и гулурановых кислот в цепи полимера, а также на степень ацетилирования.

В работе проведена оценка штаммов бактерий рода *Azotobacter* из коллекции Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН на способность к синтезу АЛГ. Выявлены потенциальные продуценты АЛГ. Показана возможность регуляции биосинтеза АЛГ за счет изменения условий культивирования. Методом ИК-спектроскопии показано, что АЛГ, полученные при разных условиях культивирования, обладали различным содержанием маннурановых и гулурано-

вых остатков (М/Г от 70/30 до 80/20) в цепи полимера, а также различались наличием ацетильных групп (от 10 до 25%) в молекулярной структуре. Показано, что изменением параметров культивирования можно направленно контролировать строение цепи синтезируемых АЛГ: соотношение маннурановых и гулурановых остатков, молекулярную массу и уровень ацетилирования полимеров.

Дальнейшая работа предусматривает изучение влияния различных параметров ферментации на продукцию и композиционный состав альгинатов и ПОА, а также разработку новых ферментационных стратегий, которые могут быть применены для увеличения продукции полимеров бактериями рода *Azotobacter*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 15-15-10014. В работе было использовано оборудование центров коллективного пользования МГУ (в т.ч. в рамках Программы развития МГУ до 2020 г.) и ФИЦ Биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Логинов Я.О., Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П., Мелентьев А.И., Логинов О.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 343–347.
2. Peña C., Galindo E., Büchs J. // Process Biochemistry. 2011. V. 46. № 1. С. 290–297.
3. Galindo E., Pefia C., Nunez C., Segur D., Espin G. // Microb. Cell Fact. 2007. V. 6. P. 1–16.
4. Усов А.И. // Успехи химии. 1999. Т. 68. № 11. С. 1051–1061.
5. Sabra W., Zeng A.P., Deckwer W.D. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 9. P. 4037–4044.
6. Clementi F., Mancini M., Moresi M. // Engineering and Food at ICEF7. Ed. R. Jowitt. Part I. Scheffield: Academic Press, 1997. P. E25–28.
7. Clementi F., Fantozzi P., Mancini F., Moresi M. // Enzyme Microb. Technol. 1995. V. 17. № 11. С. 983–988.
8. Sabra W., Zeng A.P., Deckwer W.D. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 56. № 3–4. P. 315–325.

9. *Chatfield S.* // *Curr. Med. Res. Opin.* 1999. V. 15. № 3. С. 152–159.
10. *Martinsen A., Skjak-Braek G., Smidsrod O.* // *Carbohydrate Polymers*. 1991. V. 15. № 2. С. 171–193.
11. Патент США. 1973. № 3856625.
12. *Castillo T., Galindo E., Peña C.* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 40. № 7. P. 715–723.
13. *Saude N., Junter G.A.* // *Process Biochemistry*. 2002. V. 37. P. 895–900.
14. *Skjak-Braek G., Grasdalen H., Larsen B.* // *Carbohydrate Research*. 1986. V. 154. P. 239–250.
15. *Hoefler D., Schnepf J.K., Hammer T.R., Fischer M., Marquardt C.* // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2015. V. 26. № 4. P. 162.

Alginate Biosynthesis by *Azotobacter* Bacteria

**G. A. Bonartseva^{a,*}, E. A. Akulina^a, V. L. Myshkina^a, V. V. Voinova^{a,b,c},
T. K. Makhina^a, and A. P. Bonartsev^{a,b,c}**

^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of the Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

^c*Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

*e-mail: bonar@inbi.ras.ru

Received May 11, 2016

Abstract—The ability of representatives of various species of the bacterial genus *Azotobacter* (*A. chroococcum* 7B, *A. chroococcum* 12B, *A. chroococcum* 12BS, *A. agile* 12, *A. indicum* 8, *A. vinelandii* 17, and *A. vinelandii* 5B) to alginate synthesis has been studied. It has been shown that all tested bacterial strains have this ability to different extents. Capsular alginate comprises from 2.6% to 32% of the total amount of synthesized alginate in various bacterial species. Strains that are able to active alginate synthesis have been selected; the effect of the medium composition on biosynthesis has been studied. The optimal conditions for alginate synthesis by the *A. chroococcum* 12BS producer strain include the presence of mannitol (40 g/L) and yeast extract (1%) and low concentration of phosphates (KH_2PO_4 —0.008 g/L, K_2HPO_4 —0.032 g/L) in the medium; alginate production under these conditions is 4.5 g/L. The effect of aeration on polymer biosynthesis has been revealed: an increase in aeration causes an increase in alginate synthesis, while its decrease promotes the synthesis of poly-3-hydroxybutyrate. It has been shown by IR spectroscopy that alginates obtained under various culturing conditions contain different ratios of residues of mannuronic and guluronic acids (M/G from 70/30 to 80/20) in the polymer chain and also differ in the amount of acetyl groups (from 10% to 25%) in the structure.

Keywords: biosynthesis, biopolymers, exopolysaccharides, alginates, polyhydroxyalkanoate, *Azotobacter*