

УДК 579.841.21:577.11

## БИОСИНТЕЗ АЛЬГИНАТА И ПОЛИ(3-ОКСИБУТИРАТА) БАКТЕРИАЛЬНЫМ ШТАММОМ *Azotobacter agile* 12

© 2019 г. А. А. Дудун<sup>1, \*</sup>, Е. А. Акулина<sup>1, 2</sup>, В. В. Воинова<sup>2</sup>, Т. К. Махина<sup>1</sup>, В. Л. Мышкина<sup>1</sup>,  
В. А. Жуйков<sup>1</sup>, А. П. Бонарцев<sup>1, 2</sup>, Г. А. Бонарцева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
Москва, 119234 Россия

\*e-mail: dudunandrey@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2019 г.

После доработки 31.05.2019 г.

Принята к публикации 20.06.2019 г.

В работе исследована способность бактерии *Azotobacter agile* 12 к биосинтезу полимеров: альгината (АЛГ) и поли(3-оксибутирата) (ПОБ), изучены их физико-химические свойства. Показано, что в условиях высокого уровня аэрации, штамм *A. agile* 12 синтезирует оба полимера одновременно, причем АЛГ в большем количестве по сравнению с ПОБ. Методом ИК-спектроскопии показано преобладание в полимерной цепи АЛГ маннуроновых кислот над гулуруновыми (M/G = 70/30) и наличие ацетильных групп в маннуроновых остатках. ПОБ при анализе методом ИК-спектроскопии имел полосу поглощения в области 1760 см<sup>-1</sup>. Методом ЯМР подтверждено, что ПОБ является гомополимером, состоящим из звеньев 3-гидроксимасляной кислоты. Термогравиметрический анализ (ТГА) показал, что АЛГ имел три стадии разложения – дегидратация, первое и второе разложение. В отличие от АЛГ, ПОБ имел только одну стадию разложения с предварительной очень малой потерей массы (1.25%) при дегидратации. Тест на водопоглощение показал, что бактериальный АЛГ обладает большей водопоглощающей способностью по сравнению с АЛГ из водорослей, тогда как ПОБ является гидрофобным полимером. Таким образом, синтезированные одновременно бактериальным штаммом *A. agile* 12 полимеры ПОБ и АЛГ различались по физико-химическим свойствам: ПОБ – гидрофобный, термопластичный, механически устойчивый полимер, АЛГ – гидрофильный, формирующий гидрогели, эластичный, термически и механически неустойчивый полимер.

**Ключевые слова:** биополимеры, биосинтез, альгинат, поли(3-оксибутират), ацелирование

**DOI:** 10.1134/S0555109919060072

Альгинат (АЛГ) и поли(3-гидроксибутират) (ПОБ) – два основных полимера, продуцируемые бактериями рода *Azotobacter*. Эти полимеры могут быть использованы в различных областях биотехнологии, экспериментальной биологии и медицины [1]. Альгинат представляет собой линейный неразветвленный полисахарид, который состоит из двух мономеров – маннуроновой (М) и гулуруновой (G) кислот. Соотношение этих уроновых кислот и числа ацетильных групп в остатках маннуроновой кислоты влияет на гелирующие свойства полимера [2]. Биосинтез альгината *Azotobacter*, способствует сохранению жизнеспособности при высушивании, а также обеспечивает защиту от токсичного действия тяжелых металлов и диффузии кислорода, ингибирующего активность нитрогеназы [3]. ПОБ – полиэфир 3-гидроксимасляной кислоты семейства полиоксикарбоновых кислот (ПОА), внутриклеточное запасное вещество, источник

энергии и углерода для продуцента [4, 5]. Основным преимуществом биосинтеза биополимеров бактериями рода *Azotobacter* является возможность, изменяя условия выращивания, получать полимеры с заданными свойствами, различной молекулярной массой (ММ) для ПОБ и различным содержанием мономеров (соотношение гулуруновых к маннуроновым кислотам) и степенью ацелирования для АЛГ [6, 7]. Полученные при биосинтезе полимеры с заданными свойствами могут быть использованы для культивирования различных культур тканей в биотехнологии, а также в модельных системах для экспериментальной биологии при разработке различных медицинских изделий и лекарственных форм [8].

В работе Хименеса с соавт. [9] было показано, что различный синтез АЛГ или ПОБ связан с определенными условиями культивирования бактерий. В работе других исследователей установлено, что при

культивировании *A. vinelandii* с высоким уровнем аэрации увеличивался синтез АЛГ и ингибировался синтез ПОБ [10].

Некоторые виды бактерии рода *Azotobacter* являются уникальными организмами, которые могут активно синтезировать оба полимера одновременно, например *A. agile* 12.

Цель работы — исследование способности бактерий *A. agile* 12 к одновременному синтезу АЛГ и ПОБ, а также изучение физико-химических свойств выделенных биополимеров.

## МЕТОДИКА

**Материалы.** В работе использовали следующие реагенты: ЭДТА, NaOH, компоненты культуральной среды:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , NaCl,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $CaCO_3$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , цитрат натрия,  $CaCl_2$ ,  $KH_2PO_4$ , сахароза, агар, натрий-фосфатный физиологический раствор (PBS), альгинат натрия из бурых водорослей. Все реагенты были приобретены в фирме “Sigma Aldrich” (Германия).

**Объект исследования.** Работу проводили со штаммом *A. agile* 12, выделенным из дерново-подзолистых почв Московской области (Россия) и любезно предоставленным сотрудниками кафедры микробиологии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. *A. agile* 12 поддерживается в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН [11].

Бактерии представляет собой клетки продолговатой формы, граммотрицательные, строгие аэробы, подвижные, образующие слизистые колонии темно-оранжевого цвета.

**Условия культивирования *A. agile* 12.** *A. agile* 12 выращивали на модифицированной жидкой среде Берка с сахарозой — 30 г/л,  $KH_2PO_4$  — 0.008 г/л и  $K_2HPO_4$  — 0.032 г/л в качалочных колбах объемом 800 мл с содержанием 100 мл среды в течение 48 ч при 250 об./мин, 28°C, pH среды — 7.2 [11, 12].

**Выделение и очистка АЛГ и ПОБ из культуральной среды и клеточной биомассы.** Биомассу после окончания выращивания отделяли центрифугированием при 11000 g в течение 30 мин. Супернатант смешивали с 3 об. охлажденного до –20°C этанола; полученный осадок АЛГ собирали и высушивали методом лиофилизации (лиофильная сушка Martin Christ Alpha 1–2 LD plus, Германия). Для очистки АЛГ высушенный осадок полимера растворяли в 45 мл 1 М NaCl с 5 мл 100 мМ ЭДТА и инкубировали в течение 1 ч при 60°C с перемешиванием на орбитальном шейкере (PSU-20i, “Biosan”, Латвия) для полной гомогенизации раствора. Осадок отделяли центрифугированием при 11000 g в течение 30 мин. К супернатанту добавляли 3 об. охлажденного этанола, осадок собира-

ли и лиофильно высушивали. На конечной стадии сухой осадок растворяли в 1 М NaCl, раствор диализовали против 1 л 0.1 М NaCl в течение 30 ч. Для получения АЛГ диализованный раствор снова осаждали 3 об. ледяного этанола и лиофилизировали.

Выделение ПОБ из клеточной биомассы осуществляли экстракцией хлороформом в течение 12 ч при 37°C. Полученный экстракт отделяли от клеточных остатков фильтрацией, затем ПОБ выделяли из хлороформного экстракта осаждением изопропиловым спиртом. Стадию растворения в хлороформе и осаждения ПОБ изопропиловым спиртом повторяли не менее 3 раз. ПОБ сушили при 60°C.

**Качественная реакция на определение АЛГ.** Качественное определение АЛГ в культуральной среде выполняли, как описано в работе [13]. Для определения 10 мл 10%-ного раствора  $CaCl_2$  добавляли к 1 мл культуральной среды. Реакция сопровождалась образованием нерастворимых в воде хлопьевидных частиц альгината кальция.

**Определение ММ АЛГ и ПОБ.** ММ биополимеров определяли методом вискозиметрии. Удельную вязкость рассчитывали по формуле:

$$\eta_{sp} = (t - t_0)/t_0,$$

где  $t_0$  — время истечения растворителя, а  $t$  — время истечения раствора полимера. ММ рассчитывали по уравнению Марка–Хоувинка:  $[\eta] = K(M)^a$  с коэффициентами для АЛГ [14, 15]:

$$K = 7.3 \times 10^{-5}; \quad a = 0.92;$$

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

Для ПОБ:

$$K = 7.7 \times 10^{-5}; \quad a = 0.82;$$

$$[\eta] = 7.7 \times 10^{-5} \times (M)^{0.82},$$

где  $M$  — молекулярная масса,  $[\eta]$  — вязкость,  $K$  и  $a$  — константы, величина которых зависит от природы полимера (АЛГ и ПОБ).

**ИК-спектроскопия.** ИК-спектры биополимеров регистрировали в режиме отражения в ИК-микроскопе Nuregion-2000, связанном с ИК-спектрометром IFS-66 v/s FTIR (Gecrystal, разрешение 2 см<sup>-1</sup>, диапазон 4000–600 см<sup>-1</sup>, сканирование — 50, “Bruker”, США). Для сравнения этот метод был также применен для исследования коммерческого образца АЛГ, выделенного из водорослей (“Sigma-Aldrich”, Германия).

**<sup>1</sup>H-ЯМР анализ ПОБ.** Протонные (<sup>1</sup>H) ЯМР-спектры растворов ПОБ в дейтерированном хлороформе регистрировали на спектрометре MSL-300 (“Bruker”, Германия) при рабочей частоте 400 МГц. Химические сдвиги в частях на миллион (м.д.) из-

меряли от 0 ч/млн к сигналу остаточных протонов хлороформа-d (CDCl<sub>3</sub>), 7.27 ч/млн. Параметры эксперимента были следующими: 1% (вес/об.) полимера в хлороформе-d, 313 К, время сбора 2.5 с и ширина спектра 4000 Гц [16].

**Подготовка ПОБ пленок.** Для анализа физико-химических свойств были получены полимерные пленки из ПОБ. Образцы ПОБ растворяли в хлороформе (3% вес/об.) и разливали в чистые, сухие, стерильные стеклянные чашки Петри. Толщину пленки измеряли с помощью цифрового микрометра (796XFL-1, Starrett, США). Толщина полимерных пленок составляла 50 ± 4 мкм.

**Термогравиметрический анализ (ТГА).** Термогравиметрические ТГА измерения АЛГ и ПОБ выполняли на термовесах (TG 209 F1, NETZSCH, Германия). Устройство было откалибровано по точкам плавления стандартных веществ. Эксперимент проводили в открытом алундовом тигле с использованием образца массой 7 мг в потоке (20 мл/мин) воздуха при температуре от 30 до 600°C со скоростью нагрева 10°C/мин. Температуры разложения были взяты на пике максимума первой производной оставшегося веса (%) по отношению к кривой температуры (°C).

**Тест на водопоглощение АЛГ и ПОБ.** Образцы выдерживали при температуре 50°C до постоянного значения массы ( $m_1$ ) в течение 2–3 дней. После этого их погружали в деионизированную воду (25°C) на 3 ч. После удаления капель воды образцы снова взвешивали. Водопоглощение АЛГ кальция и полимерных пленок ПОБ рассчитывали по уравнению:

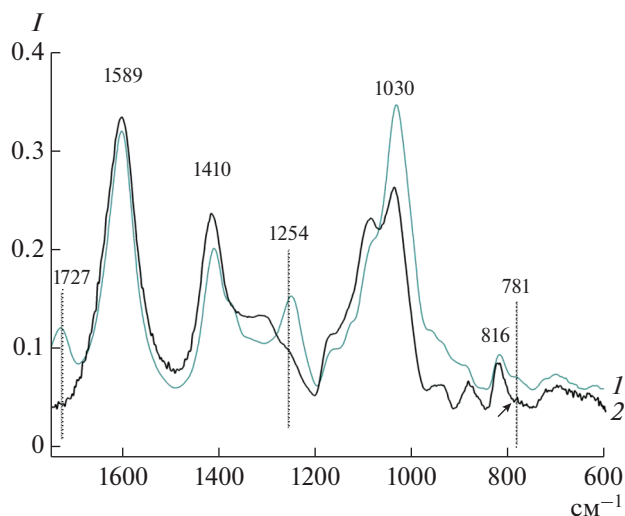
$$A = (m_2 - m_1) / m_1 \times 100$$

где  $m_1$  и  $m_2$  – массы сухого и насыщенного водой АЛГ кальция и пленок ПОБ соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Биосинтез АЛГ и ПОБ бактериальным штаммом *A. agile* 12.** Бактерии штамма *A. agile* 12 были способны продуцировать АЛГ и ПОБ одновременно. Штамм выращивали на среде, которая была подобрана ранее *A. chroococcum* 12В для стимулирования синтеза АЛГ [11]. Для выращивания *A. agile* 12 использовали ту же среду Берка с низкой концентрацией фосфатов при высоком уровне аэрации, что также способствовало преимущественному синтезу АЛГ. Выход АЛГ после 48 ч выращивания составил 0.7 г/л, ПОБ 0.38 г/л, что составило в расчете на г биомассы 0.37 и 0.20 г соответственно.

Молекулярная масса АЛГ составила ~112 кДа. Такая величина характерна для внеклеточного полимера, в отличие от входящего в состав капсул бактериальных клеток высокомолекулярного АЛГ. Молекулярная масса ПОБ в *A. agile* 12, напротив, была такой же высокой (1472 кДа), как и



**Рис. 1.** ИК-спектр АЛГ, полученного при культивировании *A. agile* 12 в среде Берка (1), и АЛГ из водорослей (2) в диапазоне 2000–600 см<sup>-1</sup>.

у ПОБ *A. chroococcum* и *A. vinelandii*, изученных в предыдущих работах [5, 11, 17].

**ИК-спектроскопия.** Бактериальный АЛГ исследовали методом ИК-спектроскопии с целью определения мономерного состава полимера и уровня ацетилирования. Полученные ИК-спектры бактериального АЛГ показаны на рис. 1, а ИК-показатели приведены в табл. 1. Спектры альгината имели полосы поглощения различной интенсивности при 1600 см<sup>-1</sup> (COO<sup>-</sup>), 1720 см<sup>-1</sup> (COCH<sub>3</sub>), 1030 см<sup>-1</sup> (CO), 1254 см<sup>-1</sup> (COOR), 816 см<sup>-1</sup> (M-блоки) и 785 см<sup>-1</sup> (G-блоки). Необходимо отметить, что на представленных ИК-спектрах АЛГ полос поглощения, характерных для компонентов бактериальных клеток, таких как белки и нуклеиновые кислоты, не обнаружено, что говорит о высокой степени чистоты полученных АЛГ.

Присутствие маннурановой кислоты в полимерной цепи определялось по наличию в ИК-спектре полосы валентных колебаний пиранозного кольца маннурановой кислоты (M) – 816 см<sup>-1</sup>; присутствие гулурановой кислоты (G) подтверждали полосы поглощения при 785 см<sup>-1</sup> [18]. Относительные интенсивности этих полос и их процентные соотношения показаны в табл. 1.

Уровень ацетилирования определяли по соотношению полос 1600 к 1720 см<sup>-1</sup>. Известно, что полосы 1030 и 1254 см<sup>-1</sup> также показывают сигналы полос поглощения ацетильных групп [13].

Таким образом, ИК-анализ показал соотношение M/G – 70/30, а уровень ацетилирования – 11.5% (табл. 1). Сравнение спектров показало присутствие полос при 1720 и 1254 см<sup>-1</sup> у АЛГ бактерий, которые отсутствовали у АЛГ из водорослей, а также увеличение поглощения при 1030 см<sup>-1</sup> толь-

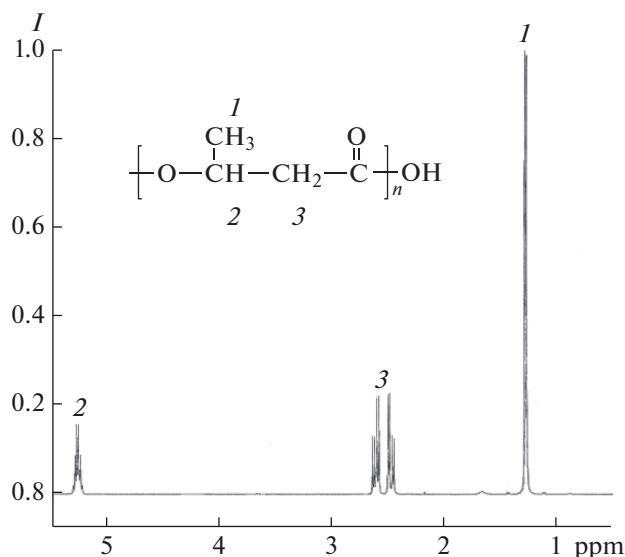


Рис. 2.  $^1\text{H}$ -ЯМР спектр бактериального ПОБ *A. agile* 12:  
1 –  $\text{CH}_3$ -группа, 2 –  $\text{CH}$ -группа и 3 –  $\text{CH}_2$ -группа.

ко в бактериальном АЛГ. Полученные результаты указывают на наличие ацетильных групп на маннуроновых остатках бактериального АЛГ.

Наличие ацетильных групп и большее количество гулуруновых остатков, которые могут селективно связывать ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , позволяют получать более плотные гидрогели, что делает бактериальный АЛГ более перспективным биоматериалом для медицины и биотехнологии по сравнению с АЛГ водорослей [19].

При проведении ИК-спектроскопии ПОБ на спектрах получена полоса поглощения в области  $1760\text{ см}^{-1}$ , указывающая на наличие карбонильной группы ( $\text{C}=\text{O}$ ) в полимере и являющаяся характерной для ПОБ.

**$^1\text{H}$ -ЯМР анализ ПОБ.** Химическая структура ПОБ была подтверждена методом  $^1\text{H}$ -ЯМР. Анализ спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР показал, что боковую метильную группу отображает только выраженный пик при 1.27 ppm. Полимер является гомополимером, который состоит только из мономеров 3-гидроксимасляной кислоты (рис. 2).

**Термогравиметрический (ТГ) анализ.** Термогравиметрия – это метод, который позволяет быстро и просто получать информацию о влажности и зольности полимеров. Скорость нагрева оказывает серьезное влияние на разрешение кривой ТГ. Этот параметр является фундаментальным для термогравиметрического исследования [20, 21]. Данное исследование проведено при стабильной скорости нагрева  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ .

В табл. 2 представлены результаты термогравиметрического анализа биополимеров: потеря массы при разложении и температурные интервалы бактериальных ПОБ, АЛГ и АЛГ водорослей для сравнения, на рис. 3 – кривые ТГ. Кривые ТГ в воздушной атмосфере для АЛГ имели три стадии потери массы: первая связана с дегидратацией, а следующие две – с разложением органического вещества до образования углеродистого остатка, соответственно. Первая стадия характеризовалась дегидратацию (потеря массы в диапазоне от 6 до 8%)

Таблица 1. Состав маннуроновых и гулуруновых кислот, уровень ацетилирования бактериального АЛГ и АЛГ из водорослей, по полосам поглощения в ИК-спектрах

АЛГ образцы	$D_{1600}/D_{1720}$	$D_{1030}/D_{1254}$	$D_{816}/D_{785}$	Степень ацетилирования, %	М/Г
Бактериальный АЛГ	8.69	2.30	2.34	11.5	70/30
Водорослевый АЛГ	90.10	–	4.10	–	80/20

Таблица 2. Результаты термического разложения АЛГ и ПОБ при атмосфере воздуха

Биополимеры	Стадия	Температура, $^\circ\text{C}$	Потеря массы, %
Бактериальный альгинат	Дегидратация	2 – 195.6	6.19
	Первое разложение	195.6 – 330	29.38
	Второе разложение	330 – 490	3.88
Водорослевый альгинат	Дегидратация	10 – 175.4	7.93
	Первое разложение	175.4 – 348.4	33.92
	Второе разложение	348 – 490	6.78
Бактериальный ПОБ	Дегидратация	25 – 218.3	1.25
	Разложение	218.3 – 330	98.53

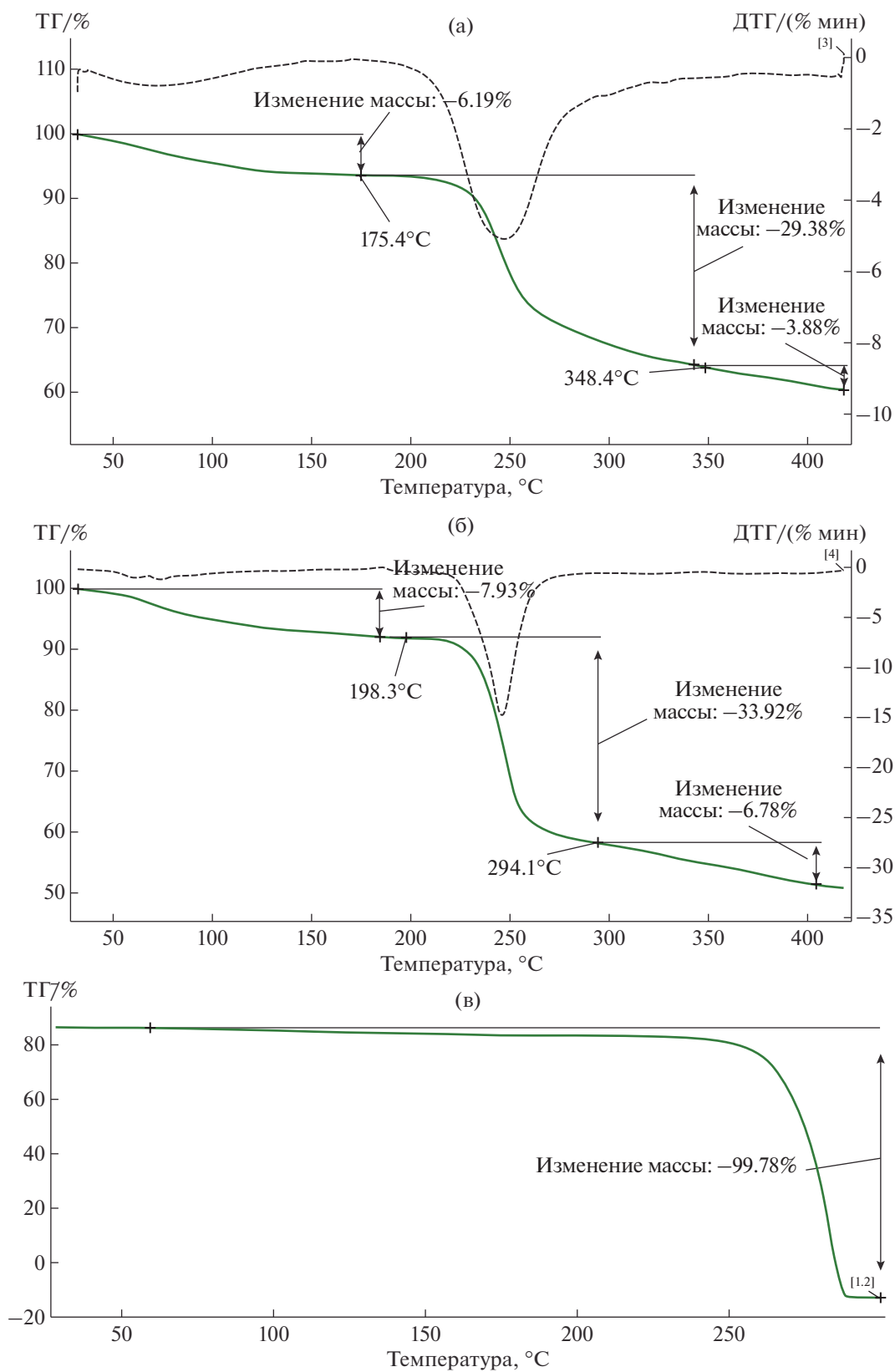


Рис. 3. Кривые ТГА АЛГ *A. agile* 12 (а), АЛГ из водорослей (б) и ПОБ из *A. agile* 12 (в).

Таблица 3. Физико-химические свойства ПОБ и АЛГ

Биополимеры	$T_{\text{разложения}}, ^\circ\text{C}$	Водопоглощение, %
Бактериальный ПОБ	218–330	1.2
Бактериальный АЛГ	195–330 первое разложение 330–490 второе разложение	341
Водорослевый АЛГ	175–348 первое разложение 348–490 второе разложение	230

при температуре нагревания от 20 до 200°C. Вторая стадия показывала наибольшую потерю массы (от 30 до 35%) при температуре от 200 до 300°C. Последняя стадия сопровождалась вторым разложением с низкой потерей массы (от 4 до 7%) в диапазоне температур от 325 до 450°C.

У АЛГ из водорослей большая потеря массы наблюдалась при всех стадиях разложения в отличие от бактериального полимера. Полученные результаты можно объяснить различной величиной молекулярной массы полимерных образцов: АЛГ *A. agile* 12 – 112 кДа, из водорослей (“Sigma Aldrich”, Германия) – 595 кДа.

ПОБ имел только одну стадию разложения при температурах от 220 до 330°C с низкой потерей массы (1.25%) на стадии дегидратации. Температуры разложения АЛГ и ПОБ приведены в табл. 2 и 3.

**Тест на водопоглощение.** Испытания препаратов АЛГ и ПОБ на водопоглощение показало, что полимеры значительно различались по своим характеристикам (табл. 3). Бактериальный АЛГ при погружении в деионизованную воду увеличивал свою массу в три раза, в то время как АЛГ из водорослей только в два. Таким образом, бактериальный АЛГ имел преимущество по сравнению с АЛГ морских водорослей, обладая большей водоудерживающей способностью. Это свойство может быть очень полезно для применения бактериального АЛГ в биотехнологии и медицине.

ПОБ является гидрофобным полимером, а его водопоглощение составило всего 1.2% (табл. 3) [22].

Таким образом, штамм *A. agile* 12 обладал способностью синтезировать одновременно два биополимера АЛГ и ПОБ с различными физико-химическими свойствами. Внутриклеточный ПОБ, как показано в работе, – гидрофобный, термопластичный, термически стабильный, механически прочный полиэфир, в то время как АЛГ гидрофильный, образующий гидрогели, термически нестабильный, эластичный и механически легко разрушаемый полисахарид. ПОБ в большей степени подходит для использования в качестве биоматериала для костной и хрящевой инженерии, тогда как АЛГ для инженерии мягких тканей. В дальнейшем планируется получение АЛГ и ПОБ с различными физико-химическими характеристиками и ис-

пользование их при создании композитных конструкций для тканевой инженерии.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда в части исследования физико-химических свойств АЛГ и ПОБ, проект № 17-74-20104.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoneyama F., Yamamoto M., Hashimoto W., Murata K. // Bioengineered. 2015. V. 6. № 4. P. 209–217.
2. Urtuvia V., Maturana N., Acevedo F., Peña C., Díaz Barrera A. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 33. № 11:198. P. 1–10.
3. Clementi F., Mancini M., Moresi M. // Engineering and Food at ICEF7. /R. Jowitt. Part I. Sheffield: Academic Press, 1997. P. 25–28.
4. Galindo E., Peña C., Núñez C., Segura D., Espin D. // Microbial. Cell Factories. 2007. V. 6. P. 1–16.
5. Millán M., Salazar M., Segura D., Castillo T., Díaz-Barrera A., Peña C. // Journal of Biotechnology. 2017. V. 259. P. 50–55.
6. Rehm B.H., Valla S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48. № 3. P. 281–288.
7. Ertesvåg H., Sletta H., Senneset M., Sun Y., Klinkenberg G., Konradsen T.A., Ellingsen T.E., Valla S. // BMC Genomics. 2017. V. 18. P. 11–13.
8. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Filatova E.V., Soboleva G.M., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Sha?tan K.V., Popov V.O., Kirpichnikov M.P. // Biochemistry, Supplemental Series B. 2012. V. 6. P. 42–47.
9. Jiménez L., Castillo T., Flores C., Segura D., Galindo E., Peña C. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 43. № 8. P. 1167–1174.
10. Peña C., Galindo E., Büchs J. // Process Biochemistry. 2011. V. 46. P. 290–297.
11. Bonartseva G.A., Akulina E.A., Myshkina V.L., Voinova V.V., Makhina T.K., Bonartsev A.P. // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 1. P. 52–59.
12. Kennedy C., Gamal R., Hummprey R., Ramos J., Brigle K., Dean D. // Mol. Gen. Genet. 1986. V. 205. P. 318–325.
13. Usov A.I. // Usp. Khim. 1999. V. 68. P. 1051–1061.
14. Martinsen A., Skjak-Braek G., Smidsrod O., Zanetti F., Paoletti S. // Carbohydr. Polym. 1991. V. 15. P. 171–193.
15. Akita S., Einaga Y., Miyaki Y., Fujita H. // Macromolecules. 1976. V. 9 № 5. P. 774–780.
16. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhiyev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K.,

- Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Feofanov A.V., Voinova V.V., Zernov A.L., Efremov Y.M., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P.* // BMC Biochemistry. 2013. V. 14:12. P. 1–13.
17. *Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A.* // Prep. Biochem. and Biotech. 2017. V. 47. № 2. P. 173–184.
18. *Jensen H.M., Larsen F.H., Engelsen S.B.* // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1308. P. 347–363.
19. *Ertesvåg H.* // Front. Microbiol. 2015. V. 6. № 523. P. 2–8.
20. *Cavalheiro E.T.G., Ionashiro M., Brevigliere S.T., Marino G., Chierice G.O.* // Quim. Nova. 1995. V. 18. № 3. P. 305–308.
21. *Soares J.P., Santos J.E., Chierice G.O.* // Cavalheiro E.T.G., Eclética Química. 2004. V. 29. № 2. P. 57–63.
22. *Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Filatova E.A., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E.* // Molecular Crystals and Liquid Crystals. 2012. V. 556. P. 288–300.

## Biosynthesis of Alginate and Poly(3-Hydroxybutyrate) by Bacterial Strain *Azotobacter agile* 12

A. A. Dudun<sup>a,\*</sup>, E. A. Akoulina<sup>a,b</sup>, V. V. Voinova<sup>b</sup>, T. K. Makhina<sup>a</sup>, V. L. Myshkina<sup>a</sup>, V. A. Zhuikov<sup>a</sup>,  
A. P. Bonartsev<sup>a,b</sup>, and G. A. Bonartseva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Bach Institute of Biochemistry, The Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”  
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia*

<sup>b</sup>*Faculty of Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University,  
Moscow, 119234, Russia*

\*e-mail: dudunandrey@mail.ru

Received March 28, 2019; revised May 31, 2019; accepted June 20, 2019

In the current work the ability of *Azotobacter agile* 12 to produce these polymers, as well as the physicochemical properties of obtained ALG and PHB were investigated. It was shown that under high level aeration conditions strain *A. agile* 12 produces ALG and PHB simultaneously but predominantly ALG. IR spectroscopy of bacterial ALG showed the prevalence of mannuronic over guluronic residues (M/G = 70/30) in the polymer chain and presence of acetyl groups on the mannuronic monomers. In the seaweed ALG the acetyl groups were not found. IR spectroscopy of PHB is characterized intensities band of absorption in region 1760 cm<sup>-1</sup>. The chemical nature of PHB as a homopolymer that consists from residues of 3-hydroxybutyric acid was confirmed by <sup>1</sup>H-NMR analysis. The thermal behavior of bacterial ALG by thermogravimetric analysis is characterized by three stages (dehydration, first decomposition and second decomposition). In opposition of ALG, PHB had only one stage of decomposition with previous very low mass loss (1.25%) at dehydration stage. The water absorption test showed that bacterial ALG has more water absorbing possibility in comparison with seaweed ALG, whereas PHB is hydrophobic polymer. Thus, produced by *A. agile* 12 simultaneously PHB is hydrophobic, thermoplastic, mechanically strong polyester, while alginate is hydrophilic, hydrogel-forming, temperature unstable, elastic and mechanically destructible polysaccharide.

**Keywords:** Biopolymers, biosynthesis, alginate, poly(3-hydroxybutyrate), acetylation