

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА БИОСИНТЕЗ АЛЬГИНАТА БАКТЕРИЯМИ *Azotobacter chroococcum*

Мартыненко Виталий Вячеславович

vitalya2497@gmail.com

Магистрант ЕНУ им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

Научный руководитель – А.А. Курманбаев

Аннотация

В работе исследована способность лабораторных штаммов бактерий *Azotobacter chroococcum* к синтезу биополимера альгината на стандартной и модифицированной среде Берка при разных уровнях аэрации. Из испытанных штаммов были отобраны 3 перспективных штамма *A. chroococcum* 1/5 Ас, *A. chroococcum* 13, *A. chroococcum* 22. Была показана способность этих штаммов к накоплению экзополисахарида. Повышение уровня аэрации положительно сказывалось на выходе альгината, в то время как изменение концентрации сахарозы и фосфатов практически не повлияло на синтез полисахарида.

Ключевые слова: *Azotobacter*, альгинат, полисахарид, биосинтез, биополимер

Введение

Альгинат представляет собой линейный неразветвленный биополимер. Данный полисахарид состоит из двух мономеров – маннуриновой и гулуриновой кислот, которые соединены гликозидной связью [1]. Основными продуцентами альгинатов – различные виды бурых водорослей (Phaeophyceae), а также бактерии рода *Pseudomonas sp.* и *Azotobacter sp.* [2].

Бактерии рода *Azotobacter* продуцируют альгинат в качестве экзополисахарида, выполняющего функцию защиты от неблагоприятных факторов. Альгинаты в бактериальной клетке создают диффузионный барьер для O₂, тем самым защищая внутриклеточную нитрогеназу [3]. Было показано, что альгинаты также защищают бактерии от действия тяжелых металлов и таких факторов окружающей среды, как высокая температура и высушивание. Считается, что это обеспечивается высоким сродством альгинатов к ионам кальция [4].

Альгинаты, получаемые из водорослей, нашли свое применение во многих областях медицины и биологии. В частности, их используют для изготовления носителей для доставки лекарств, раневых покрытий и материалов для стоматологии. Кроме того, способность растворов альгината сохранять гелеобразное состояние в условиях низкой кислотности обуславливает их применение при заболеваниях желудочно-кишечного тракта [5].

Высокая молекулярная масса альгинатов необходима для их применения в пищевой и фармацевтической промышленности. Как правило, молекулярная масса альгинатов водорослей на несколько порядков меньше таковой у бактерий. Молекулярная масса альгинатов водорослей сильно зависит от условий их произрастания, а при выращивании водорослей в природных условиях сложно регулировать факторы окружающей среды (температура, интенсивность света) [6].

В свою очередь, синтез альгинатов бактериями позволяет регулировать молекулярную массу полимера, изменяя условия выращивания культур. Если сравнивать продуценты альгината, то бактерии рода *Azotobacter* вырабатывают больше полисахарида по сравнению с бактериями рода *Pseudomonas*. Это обусловлено условной патогенностью и меньшим процентом содержания капсулярного альгината у последних [7].

Ключевым параметром, влияющим на рост бактерий и синтез ими полисахаридов, является аэрация. Было также показано, что состав среды может играть решающую роль в процессе синтеза бактериальных альгинатов. В частности, различные концентрации источника

углерода, а также различное содержание в среде фосфатов способны оказать существенное влияние на рост бактерий и их способности к синтезу альгината [8, 9].

Целью данной работы было исследование влияния аэрации и состава питательной среды на синтез альгинатов штаммами бактерий *Azotobacter chroococcum*.

Материалы и методы

Объект исследования. В работе использованы коллекционные штаммы бактерий *Azotobacter chroococcum*: *A. chroococcum*1/3 Ас, *A. chroococcum*1/5 Ас, *A. chroococcum*1 Ас, *A. chroococcum*2/1 Ас, *A. Chroococcum*3/1 Ас, *A. chroococcum*1/2, *A. chroococcum*5, *A. chroococcum*10, *A. chroococcum*13, *A. chroococcum* 22, *A. chroococcum* 37, *A. chroococcum* 30, *A. chroococcum* 21, *A. chroococcum* 28, *A. chroococcum* 8/9. Коллекция поддерживается в лаборатории экологической биотехнологии Национального центра биотехнологии.

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, сахара – 20, агар – 20.

Условия культивирования *A. chroococcum*. Культивирование бактерий осуществляли на жидкой среде Берка в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (100 мл среды) при температуре 28°C. Состав среды Берка (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 натрия – 0.5, сахара – 20. Конечный pH среды доводили до 7,2. Затем среду стерилизовали в автоклаве при 121 °C в течение 15 минут.

Для изучения влияния состава среды на синтез альгината использовали разные концентрации сахарозы и фосфатов в среде. Культивирование проводили на микробиологической качалке Innova 43 (New Brunswick Scientific, США). Объем вносимого посевного материала - 1%. Период культивирования - 72 ч.

Культивирование *A. chroococcum* для изучения влияния аэрации на синтез альгината проводили на стандартной среде Берка при разных скоростях перемешивания: 100, 150, 200 об/мин.

Изучение синтеза альгината. Качественную реакцию на альгинат проводили с использованием $CaCl_2$. Для этого к 1 мл культуральной жидкости добавляли 10 мл 10%-ного раствора $CaCl_2$ и наблюдали образование альгината кальция в виде нерастворимого хлопьевидного осадка [6].

После окончания выращивания биомассу отделяли центрифугированием при 4500 g в течение 30 мин. Собранный супернатант использовали для определения альгината, выделяемого бактериями в среду. Для этого к нему добавляли трехкратный объем этилового спирта. Осадок альгината собирали центрифугированием при 2000 g в течение 20 минут, после чего высушивали при 60°C до постоянного веса [8].

Клеточную биомассу промывали путем добавления 5 мл дистиллированной воды и центрифугирования в течение 5 минут при 5000 g. Наконец, надосадочную жидкость сливали, а биомассу высушивали при 60°C до постоянного веса.

Биомассу бактерий и массу альгината измеряли с помощью лабораторных весов AdventurerAR 2140 (Ohaus Corporation, США).

Результаты и обсуждение

Была проведена оценка способности разных штаммов бактерий *Azotobacter chroococcum* к синтезу альгината. По результатам качественной реакции были отобраны 3 штамма: *A. chroococcum*13, *A. chroococcum*22, *A. chroococcum*1/5 Ас, показавших положительный результат (рис. 1).

Таблица 2. Биосинтез альгината при выращивании штаммов *Azotobacter chroococcum* на средах Берка разного состава

| Наименование штамма | Концентрация сахарозы, г/л | Концентрация K_2HPO_4 , г/л | Концентрация KH_2PO_4 , г/л | Выход биомассы, г/л | Выход альгината, г/л |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------|
| A. <i>chroococcum</i> 13 | 40 | 0,032 | 0,008 | 1,84 | 1,30 |
| | 30 | 1,050 | 0,200 | 1,58 | 1,24 |
| | 30 | 0,032 | 0,008 | 1,79 | 1,17 |
| A. <i>chroococcum</i> 22 | 40 | 0,032 | 0,008 | 4,34 | 1,68 |
| | 30 | 1,050 | 0,200 | 4,32 | 1,61 |
| | 30 | 0,032 | 0,008 | 4,20 | 1,73 |
| A. <i>chroococcum</i> 1/5 Ac | 40 | 0,032 | 0,008 | 2,76 | 0,88 |
| | 30 | 1,050 | 0,200 | 2,94 | 0,89 |
| | 30 | 0,032 | 0,008 | 2,70 | 0,91 |

Закключение

В настоящей работе была проведена оценка штаммов бактерий *Azotobacter chroococcum* из коллекции лаборатории экологической биотехнологии Национального центра биотехнологии на способность к синтезу альгината при разных уровнях аэрации и составе питательной среды. Были выявлены перспективные продуценты альгината, из которых наибольший интерес представляет штамм *A. chroococcum* 13.

Список использованных источников

1. Yoneyama F., Yamamoto M., Hashimoto W., Murata K. Production of polyhydroxybutyrate and alginate from glycerol by *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-free conditions // Bioengineered. 2015. V. 6. №4. P.209-217.
2. Логинов Я.О., Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П., Мелентьев А.И., Логинов О.Н. Биополимер альгинатной природы с преобладанием L-гулурановой кислоты // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. №3. С.343-347.
3. Sabra W., Zeng A.P., Deckwer W.D. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. №9. P.4037-4044.
4. Clementi F., Mancini M., Moresi M. Engineering and Food. - Scheffield: Academic Press. 1997. P.25-28.
5. Chatfield S. A comparison of the efficacy of the alginate preparation, Gaviscon Advance, with placebo in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease // Curr. Med. Res. Opin. 1999. V. 15. №3. P.152-159.
6. Усов А.И. Альгиновые кислоты и альгинаты: методы анализа, определения состава и установления строения // Успехи химии. 1999. Т. 68. №11. С.1051-1061.
7. Clementi F., Fantozzi P., Mancini F., Moresi M. Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii* // Enzyme Microb. Technol. - 1995. - V. 17. - №11. - P.983-988.
8. Peña C., Galindo E., Büchs J. The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate // Process Biochemistry. 2011. V. 46. №1. P.290-297.
9. Galindo E., Peña C., Nunez C., Segur D., Espin G. // Microb. Cell Fact. 2007. V. 6. №7. P.1-16.