

НАКОПЛЕНИЕ АЛЬГИНАТА И ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА КУЛЬТУРОЙ *AZOTOBACTER VINELANDII* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С РАЗНОЙ ЧАСТОТОЙ ПЕРЕМЕШИВАНИЯ

Немойкина Анна Леонидовна

*канд. биол. наук, зав. лабораторией биополимеров и биотехнологии
Национального исследовательского Томского государственного университета,*

РФ, г. Томск

E-mail: nemoykina@rambler.ru

ALGINATE AND POLY-3-HYDROXYBUTYRATE ACCUMULATION IN *AZOTOBACTER VINELANDII* CULTURES WHEN CULTURED UNDER VARIABLE SHAKING SPEED

Anna Nemoykina

*candidate of Science, Head of Laboratory of biopolymers and biotechnology,
Tomsk State University, Russia, Tomsk*

АННОТАЦИЯ

Целью работы было оценить накопление альгината и поли-3-гидроксибутирата бактерией *Azotobacter vinelandii* БИМ В-216 при культивировании в колбах с разной частотой перемешивания. При частоте перемешивания 200 об/мин наблюдали высокую конверсию источника углерода в альгинат, в то время как при 100 об/мин источник углерода преобразуется в ПГБ. Максимальная концентрация биомассы ($4,2 \pm 0,1$ г/л) была получена в культурах, выращенных при 200 об/мин

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the alginate and poly-3-hydroxybutyrate accumulation by *Azotobacter vinelandii* bacterium (BIM B-216) when cultured in flasks under variable shaking speed. Highest levels of carbon to alginate conversion were observed at 200 rpm, while culturing at 100 rpm resulted in carbon to PHB conversion. The maximum biomass concentration ($4,2 \pm 0,1$ g / l) was obtained in cultures grown at 200 rpm.

Ключевые слова: *Azotobacter vinelandii*; альгинат; поли-3-гидроксибутират.

Keywords: *Azotobacter vinelandii*; alginate; poly-3-hydroxybutyrate.

Большое количество микроорганизмов, включая бактерии, микроводоросли, дрожжи и грибы, могут производить внеклеточные полисахариды. Эти микробные экзополисахариды представляют потенциальный интерес с экономической точки зрения, в зависимости от их структурных свойств [7, 9]. Большой интерес на сегодняшний день представляют бактерии *Azotobacter vinelandii*. Из литературных данных известно, что данная культура способна продуцировать в среду полисахариды, в том числе и альгинаты, которые образуют гели различной плотности [3, 8].

Альгинаты широко используются в качестве загустителей, стабилизаторов, гелеобразующих агентов и эмульгаторов в пищевой, текстильной, бумажной и фармацевтической промышленности [6].

Наряду с альгинатами клетки азотобактера способны синтезировать биополимер поли-3-гидроксibuтират (ПГБ). Данный полимер не токсичен, сырьевые ресурсы его производства возобновляемы, продукты распада не вызывают вредного воздействия на организм и ухудшение экологии [1]. ПГБ используется, как альтернативный упаковочный материал способный к разложению в почве и воде [2].

Целью настоящей работы было оценить влияние частоты перемешивания на накопление альгината и ПГБ бактерией *Azotobacter vinelandii* БИМ В-216.

Azotobacter vinelandii БИМ В-216 предоставлен Белорусской коллекцией непатогенных микроорганизмов. Культурально-морфологические признаки штамма: колонии крупные, слизистые; клетки овальной формы, подвижные, расположенные одиночно, парами, иногда группами, граммотрицательные, эндоспор не образуют. Физико-биохимические признаки: строгий аэроб, каталазоположительный, продуцирует зеленый водорастворимый флюоресцирующий пигмент.

Культуру бактерий выращивали на среде, г/л: сахароза — 20; дрожжевой экстракт — 3; K_2HPO_4 — 0,66; KH_2PO_4 — 0,16; $CaSO_4$ — 0,05; $NaCl$ — 0,2; Mg

$\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,0029; FeSO_4 — 0,027. pH доводили до 7,2. В колбы объемом 500 мл наливали по 100 мл среду, культивировали при 28 °С.

Альгинат из культуральной жидкости осаждали изопропиловым спиртом (2 объема спирта : 1 объем культуральной жидкости). Осадок собирали центрифугированием (15 мин при 7500 об/мин) с последующей фильтрацией. Осадок промывали изопропиловым спиртом до постоянной массы. Все измерения проводили в трех повторностях. ПГБ выделяли по методике описанной ранее [5].

При частоте перемешивания 200 об/мин наблюдали высокую конверсию источника углерода в альгинат, в то время как при 100 об/мин источник углерода преобразуется в ПГБ (Табл. 1).

Таблица 1.

Характеристик штамма *Azotobacter vinelandii* при культивировании с разной частотой перемешивания

Частота вращения, об/мин	Количество альгината, г/л	Количество ПГБ (% от сухого веса)	Биомасса, г/л
100	3,40±0,15	75,0±2,0	3,7±0,2
200	5,03± 0,11	62,0±3,0	4,2±0,1

Рисунок 1 показывает типичные кривые роста *Azotobacter vinelandii* при частоте вращения 100 и 200 об/мин. Максимальная концентрация биомассы (4,2 ± 0,1 г/л) была получена в культурах, выращенных при 200 об/мин. При перемешивании с частотой 100 об/мин концентрация биомассы достигала в конце культивирования 3,7 ± 0,2 г/л (Табл. 1)

Максимальные значения накопления ПГБ были 75 ± 2 % (по отношению к общей сухой массы) и 62 ± 3 % в культурах, выращенных при 100 и 200 об/мин соответственно.

Выявили, что максимальное содержание биомассы клеток и альгината наблюдается на 2 сутки культивирования и в дальнейшем достоверно не увеличивается (Рис. 1, Рис. 2).

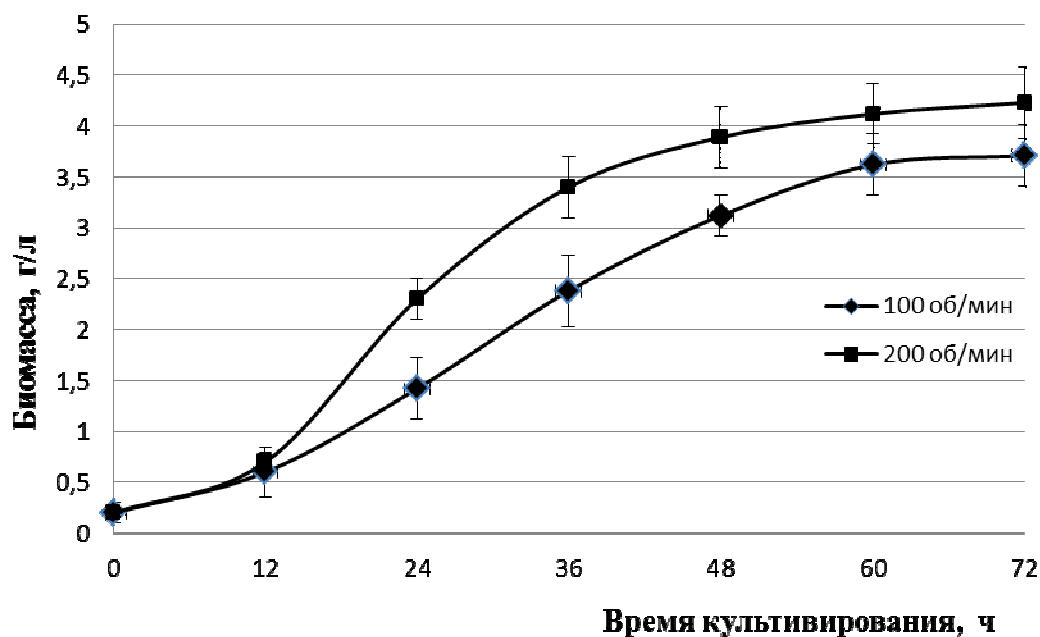


Рисунок 1. Рост биомассы *Azotobacter vinelandii* при культивировании с разной частотой перемешивания

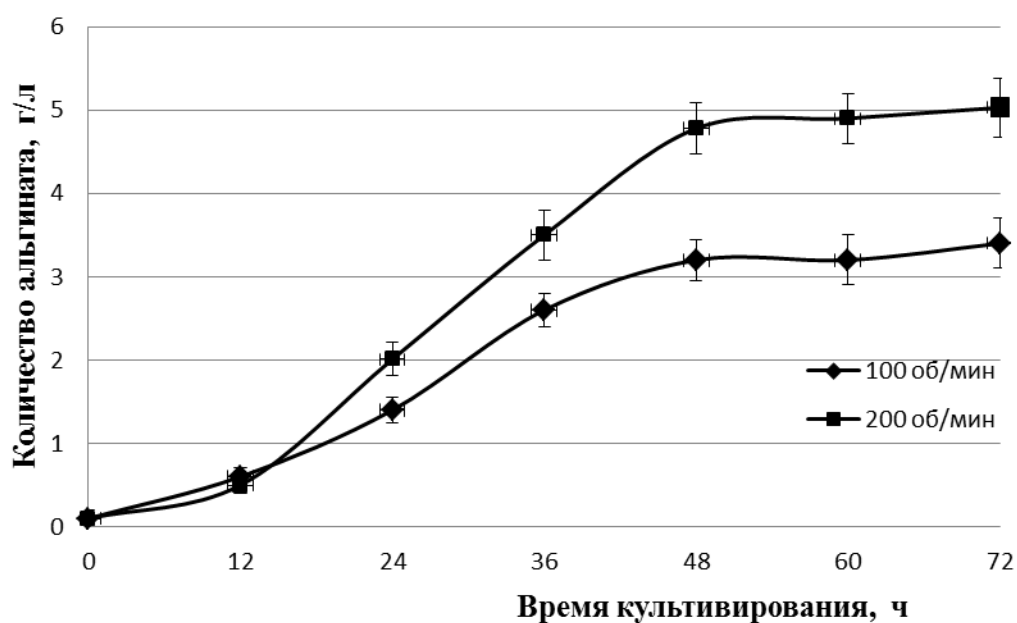


Рисунок 2. Накопление альгината бактерией *Azotobacter vinelandii* при культивировании с разной частотой перемешивания

Вязкость культуральной жидкости бактерии *Azotobacter vinelandii* БИМ В-216 через 72 ч культивирования составляла 3,63 Па·с (36,3 Пуаз).

Список литературы:

1. Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A. and Zaikov G.E. Biodegradation and Medical Application of Microbial Poly (3-Hydroxybutyrate). //Polymers Research Journal. — 2008. — Vol. 2(2). — P. 127—160.
2. Chen G.Q., Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials // Biomaterials. — 2005. — Vol. 26(33). — P. 6565—6578.
3. Draget I., Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications // Food Hydroc. — 2011. — V. 25. — P. 251—256.
4. Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espín G. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* // Microb Cell Fact. — 2007. — Vol. 6(7). doi: 10.1186/1475-2859-6-7.
5. Peña C., Campos N., Galindo E. Changes in alginate molecular mass distribution, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks //Appl Microbiol Biotechnol. — 1997. — Vol. 48. — Vol. 510—515.
6. Sabra W., Zeng A.P., Deckwer W.D. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects //Appl Microbiol Biotechnol. — 2001. — Vol. 56. — P. 315—325.
7. Saude N., Junter G.-A. Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter vinelandii*// Process Biochemistry. — 2002. — Vol. 37(8). — P. 895—900.
8. Skjak-Braec G, Espevic T. Application of alginate gels in technology and biomedicine // Carbohydr. Eur. — 1996. — V. 14. — P. 19—23.
9. Sutherland I.W. The properties and potential of microbial exopolysaccharides// ChimOggi. — 1990. — Vol. 8 (9). — P. 9—14.