

[illegible]

УДК 290532

ДЕЙСТВИЕ УФ-ЛУЧЕЙ НА ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРОДУЦЕНТА *ЛЕВАН*АА. *VINELANDII* ШТАММА Д-08 ПО МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫМ ПРИЗНАКАМ И АКТИВНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПОЛИСАХАРИДА

Н.А. Ракова, Н.В. Новокупцев

МГУ им. Н.П. Огарёва» факультет биотехнологии и биологии, Саранск, Россия

За последние годы широкое применение находят микробные полисахариды. Из них особая роль принадлежит полисахариду левану. Он представляет собой водорастворимый углеводный полимер, способный образовывать вязкие опалесцирующие растворы как в воде, так и масле из-за его β – (2,6) связей [1]. Запутанные ветви в структуре левана способствуют когезионной прочности, а большое количество гидроксильных групп помогает формировать адгезионные связи с различными субстратами [2]. Сухие клеи левана могут быть легко удалены водой. При добавлении пластификаторов леван также способен образовать гибкую, полупрозрачную и водостойкую пленку [4]. Не цитотоксичен. Не вызывает раздражение и аллергические реакции.

В настоящее время обнаружено, что данный полимер способны синтезировать многие микроорганизмы, из них наиболее известны: *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum*, *Paenibacillus polymyxa*, *Zyotomonas mobilis*.

A. vinelandii впервые был описан в 1903 году Липманом. Бактерии рода *Azotobacter* относятся к 4 группе по классификации Берджи – грамотрицательные аэробные палочки и кокки. Бактерии *A. vinelandii* штамма Д-08 при глубинном культивировании на сахарозосодержащих средах образуют значительные количества полисахарида левана, который представлен как в виде капсул, окружающих бактериальные клетки, так и в виде слизи, распространяющейся в питательной среде [1].

Актуальной задачей является повышение продуктивности бактерий *A. vinelandii* Д-08, в связи с расширением сфер использования микробного левана. Как правило, штаммы микроорганизмов, выделенные из природных источников, не способны к синтезу сверхвысоких количеств углеводов.

Исходя из этого, целью работы было получение новых штаммов *A. vinelandii* с повышенным синтезом полисахарида левана под воздействием физического мутагена, в частности ультрафиолета.

В представленной работе мы провели индуцированный мутагенез ультрафиолетом и оценивали эффект ультрафиолетового излучения по выходу полисахарида левана.

Мы готовили суспензию клеток *A. vinelandii* Д-08 переносом колонии бактерий в пробирки со стерильной водой и тщательно перемешивали. По 4 мл суспензии разливали в стерильные чашки Петри и помещали в камеру УФ-облучения CL – 1000 с дозой облучения 100 мкДж/см², время экспозиции: 10, 30 и 60 с.

Далее контрольные и облученные клетки *A. vinelandii* в объеме 0,1 мл высевали на чашки Петри с агаризованной средой следующего состава, (г/л): K₂ HPO₄ – 0,8; KH₂ PO₄ – 0,2; CaSO₄×7H₂O – 0,2; MgSO₄×7 H₂O – 0,2; Na₂ MnO₄ – 0,05; FeCl₃ – 0,05; дрожжевой экстракт – 0,5; сахароза – 20,0; агар – агар – 20,0. Инкубировали в термостате при 28 °С трое суток. Подсчитывали выросшие колонии и пересеивали в биологические пробирки со скошенной агаризованной средой.

Для получения инокулята бактерий *A. vinelandii* Д-08 готовили питательную среду того же состава, только без агара. pH в пределах 6,8–7,2. Стерильной средой смывали *A. vinelandii* со скошенного питательного агара и культивировали в течении суток в термостатируемом шейкере при 250 об/мин.

Дальнейшее культивирование исходного и мутантного штамма бактерий проводили на сахарозной среде в аналогичных условиях. На третьи сутки в полученной культуральной жидкости определяли pH, содержание левана и биомассу *A. vinelandii* Д-08.

Водородный показатель измеряли потенциометрическим методом, количество биомассы – гравиметрическим методом, а количество полисахарида левана методом осаждения.

В контрольном варианте на третьи сутки мы наблюдали сплошной агаризованный рост *A. vinelandii* Д-08, местами переходящий в единичные колонии. При обработке 60 с роста культуры обнаружено не было. При обработке бактерий 10 и 30 с получили единичные колонии, выживаемость клеток составила 28 и 16 % соответственно.

Клетки молодых культур (вплоть до 2-х суток культивирования) имеют форму палочек с закругленными концами, чаще расположены попарно [3]. После обработки появляются шаровидные формы, увеличивается формирование цист.

При проведении эксперимента произошел резкий сдвиг pH в кислую сторону, относительно исходного значения. Это свидетельствует об интенсивном процессе выделения кислоты, накопления продуктов метаболизма бактерий. Расхождения pH между контрольными облученным штаммом несущественны.

Увеличение времени экспозиции облучения бактерий ультрафиолетом благоприятно повлияло на выход полисахарида. Максимальный выход левана наблюдается в мутантных вариантах бактерий *A. vinelandii* Д-08 со временем экспозиции 30 с. и составил $18,87 \pm 0,46$ г./л, при этом содержание биомассы $5,26 \pm 0,18$ г./л. В контрольном варианте обнаружено $15,58 \pm 0,67$ г./л левана и $3,56 \pm 0,24$ г./л биомассы.

Таким образом, при обработке культуры бактерий *A. vinelandii* Д-08 получены мутантные варианты, отличающиеся от исходной культуры повышенным синтезом микробного полисахарида левана.

ЛИТЕРАТУРА

1 Лияськина Е.В. Биотехнология бактериальных полисахаридов: учебное пособие / Е.В. Лияськина, В.В. Ревин, В.М. Грошев и др. – Саранск: Мордовский гос. Ун-т, 2010. – 120 с.

2Ревин В.В. Биокomпозиционные материалы на основе ультрадисперсных частиц древесины и левана, полученного путем микробного биосинтеза *Azotobacter vinelandii* Д-08 / В.В. Ревин, В.В. Шутова, Н.В. Новокупцев // Фундаментальные Исследования. – 2016. – № 1. – С. 53–57.

3Díaz-Barrera A. Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* grown at two bioreactor scales under oxygen-limited conditions / A. Díaz-Barrera, J. Gutierrez, F. Martínez [et al.] // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2014. – V. 37, № 2. – P. 1128–1133.

4 Kang N.K. Levan: Applications and perspectives. Microbial production of biopolymers and polymer precursors / N.K. Kang, M.Y. Seo, E.S. Seo [et al.] // Caister Academic. – 2009. – V. 40. – P. 25–30.