



УДК 577.32:573.6.086.83:577.114.4/8

## ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ СВОЙСТВ АЛЬГИНАТА, СИНТЕЗИРОВАННОГО ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *AZOTOBACTER VINELANDII* Д-05



В. В. Шутова, А. Б. Русяева

Шутова Виталина Викторовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва, Саранск, vshutova@yandex.ru

Русяева Анна Бозорбоевна, магистрант, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва, Саранск, 39anchiklobaski@mail.ru

Бактериальные альгинаты находят широкое применение в биомедицине в качестве носителей при иммобилизации клеток, ферментов, лекарств. Их функциональные свойства зависят от их мономерного состава и молекулярной массы и варьируют в зависимости от источника и условий культивирования. Установлено, что в качестве эффективного и дешевого источника питания для роста бактерии *Azotobacter vinelandii* штамм Д-05 и получения альгината можно использовать мелассу (отход свеклосахарного производства). Предложено использовать глубинное периодическое культивирование продуцента на средах различного состава. Изучение свойств альгината проводилось методами ИК-спектроскопии с использованием инфракрасного анализатора фурье-спектрометра Shimadzu IRPrestige-21, а также ВЭЖХ на приборе Shimadzu LC-20 Prominence. При культивировании *A. vinelandii* на средах с мелассой оптимальной концентрацией субстрата для накопления полисахарида является 5% (по сахарозе). С помощью ИК-спектроскопии доказана идентичность полисахарида, выделенного из культуральной жидкости альгинату, который включает несколько субфракций с молекулярной массой от 3 до 350 кДа, причем максимальная доля приходится на фракцию с молекулярной массой 300 кДа. **Ключевые слова:** экзополисахарид, глубинное культивирование, меласса, альгинат, *Azotobacter vinelandii*.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-455-461>

### Введение

В настоящее время большое внимание уделяется эффективному использованию вторичных ресурсов биотехнологических производств. Отходом свеклосахарного производства является меласса – сиропобразная жидкость тёмно-бурого цвета со специфическим запахом, содержащая большое количество углеводов (главным образом сахарозы), которые являются главными источниками для питания бактерий – продуцентов полисахаридов [1, 2]. Одним из таких полисахаридов является альгинат. Известно, что альгинаты представляют собой гетерополисахариды (из  $\beta$ -D-маннуроносовой (М) и  $\alpha$ -L-гулууроносовой кис-

лоты (G), связанных 1,4-гликозидными связями), которые формируют либо гомополимерные блоки М, либо гетерополимерные блоки М и G, чередуясь случайным образом [3]. Бактериальные альгинаты отличаются от альгината из водорослей наличием О-ацетилированных маннуроносовых остатков по C<sub>2</sub> и C<sub>3</sub> атомам М звеньев и отсутствием GG-звеньев; большинство этих остатков являются моно-О-ацетилированными, но среди них имеются 2,3-О-ацетилированные. Кроме того, бактериальные альгинаты обычно характеризуются более высокой молекулярной массой: молекулярная масса альгинатов различных штаммов *A. vinelandii* варьирует в пределах от 340 000 до 4 000 000 кДа [4–6]. Отметим, что некоторые штаммы *Pseudomonas aeruginosa* могут синтезировать большое количество альгинатов, достаточное для формирования высокоструктурированных биопленок [7], тогда как *A. vinelandii* синтезирует полимер с высокой долей остатков G, которые связаны с клеткой и формируют цисты, устойчивые к обезвоживанию [6]. Из-за патогенной природы *P. aeruginosa* в получении данного полисахарида наибольшее применение нашли бактерии *A. vinelandii* [7].

Отметим, что *A. vinelandii* синтезирует два полимера, используемые в производстве: внутриклеточный (поли- $\beta$ -гидроксипропанат (ПГБ)) и внеклеточный альгинат, функциональные свойства которых зависят от состава и молекулярной массы. Предполагается, что внеклеточный альгинат формирует барьер для проникновения кислорода или тяжелых металлов [8]. Также есть штамм, который может образовывать полисахарид леван, в том числе на средах с мелассой [9, 10]. Для получения полисахаридов применяется как периодическое, так и непрерывное культивирование бактерий *A. vinelandii* [11, 12], причем большое значение имеет регуляция аэрации [13, 14].

Функциональные свойства альгинатов зависят от их мономерного состава и молекулярной массы и варьируют в зависимости от источника их получения. Альгинаты используют для регуляции вязкости (желирующий агент для пищевой промышленности), в качестве клеящих или сор-



бирующих краску веществ (в бумажной и текстильной промышленности). Из нерастворимых альгинатов получают волокна и относительно негорючие маслостойкие пленки. Уникальные свойства альгинатов, а также очевидная биологическая совместимость позволяют рекомендовать их для использования в медицине в качестве повязки на рану или матрицы для образования ткани [15, 16].

В настоящее время особое внимание уделяется разработке технологии иммобилизации биологически активных веществ путем химической коацервации в оболочки из природных полиэлектролитов. С помощью ионной сшивки мультивалентных катион- и анионсодержащих полиэлектролитов (в частности, таких полисахаридов, как хитозан и альгинаты) формируются гелевые микросферы, внутри которых могут быть локализованы фармакологические препараты, бактерии, факторы роста, ткани животных, косметические, парфюмерные и пищевые материалы. Важно, что микросферы можно производить из альгината в присутствии ионов кальция и они обладают пролонгированным действием и низкой токсичностью в течение длительного периода времени [17].

Цель настоящего исследования заключалась в получении, выделении и очистке бактериального альгината на средах с мелассой, а также изучении его свойств методами ИК-спектроскопии и ВЭЖХ.

### Материалы и методы

Объектом исследования служила культура штамма бактерии *A. vinelandii* D-05 (ВКПМ), которую выращивали в течение 3 суток при 28°C на агаризованной среде Эшби (среда А, г/л): маннит – 20;  $K_2HPO_4$  – 0,2; NaCl – 0,2;  $K_2SO_4$  – 0,1;  $FeSO_4$  – 0,1;  $CaCO_3$  – 5; агар-агар – 20. Для получения инокулята использовали жидкую сахаросодержащую среду (среда Б, г/л): сахароза – 20;  $KH_2PO_4$  – 0.011;  $Na_2HPO_4$  – 0.189;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.2;  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  – 0.02;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.006;  $MoO_3$  – 0.00005; NaCl – 0.01;  $NaHCO_3$  – 0.05. Культивирование бактерий *A. vinelandii* осуществляли в шейкере 2 суток при 250 об/мин и температуре 28°C. В эксперименте инокулятом (10%) засеивали мелассные среды (1–10% по сахарозе) и среду Б с измененным содержанием сахарозы (4 и 5%) и культивировали в течение 72 ч в тех же условиях, что и инокулят.

Для определения биомассы использовали весовой метод. Отделение клеток микроорганизма от среды культивирования проводили с помощью центрифугирования (при 7000 г 45 мин). Осадок

промывали дистиллированной водой и высушивали при 102–105°C. Содержание альгината в среде культивирования контролировали, осаждая полисахарид из 5 мл культуральной жидкости, освобожденной от клеток, изопропиловым спиртом в соотношении 1:2. Осадок высушивали при 105±2 °С до постоянной массы. Для регистрации содержания полисахарида в культуральной жидкости образец центрифугировали (18000 об/мин, 4°C в течение 30 мин), проводили двухкратное осаждение изопропиловым спиртом и лиофилизировали (при – 50 °С в течение 24 ч с помощью лиофильной сушилки модель FreeZone Plus (Labconco, США)).

Молекулярную структуру полисахарида исследовали с помощью ИК-фурье-спектрометра Shimadzu IRPrestige-21 (Япония), а молекулярный вес определяли с помощью жидкостного хроматографа Shimadzu LC-20 Prominence (Япония) с колонкой SupelcoGel LC-NH2 (США) [18]. Скорость подачи растворителя варьировала в диапазоне 0.4 мл/мин, температура колонки – 27°C. В качестве стандартов использовали растворы декстранов с известной молекулярной массой: 12, 25, 80, 270 кДа.

### Результаты и их обсуждение

Известно, что азотобактер является полифагом, который в качестве источника углерода использует моно-, ди- и полисахариды, органические кислоты жирного и ароматического ряда, летучие органические соединения (пары этилового спирта, ацетона) [19]. Важно, что *A. vinelandii* штамм D-08 может синтезировать экзополисахарид леван на средах с мелассой [20], есть исследования по культивированию других штаммов на мелассных средах [21]. Значение pH важно для культивирования микроорганизмов, поскольку определяет метаболизм клеток и активное состояние ферментов.

В связи с этим мы исследовали зависимость интенсивности роста *A. vinelandii* и биосинтеза альгината от содержания сахарозы в мелассной среде. В этих экспериментах культивирование бактерии проводили как в средах с 1–10% мелассы (по сахарозе), так и в жидкой сахаросодержащей среде с 4 и 5% сахарозы. Исходное значение pH питательных сред составляло pH 6.8–7.2. Установлено, что при культивировании бактерии в средах, содержащих от 1 до 5% (по сахарозе) мелассы, pH снижается в 1 сутки, а в средах, содержащих от 5 до 10% мелассы, к 1-м суткам отмечено незначительное увеличение pH (рис. 1, а). Контролем служили данные исследования изменений pH при культивировании



бактерии на питательных средах, содержащих 4 и 5% сахарозы. Установлено, что в среде с 4% сахарозы pH уменьшается в течение 2 суток, а в среде с 5% сахарозы – в течение одних суток (см. рис. 1, б). Таким образом, максимальные изменения pH при культивировании бактерии происходят в средах, содержащих 1–4% мелассы.

Установлено, что при добавлении 1 и 2% мелассы накопление альгината к 3-м суткам

было незначительным, при увеличении содержания мелассы до 3 % выход экзополисахарида возрастал до 2,7 г/л (рис. 2, а). Отметим, что в среде с 4 и 5% мелассы наблюдали самое высокое накопление альгината (до 15 г/л). На средах с сахарозой количество экзополисахарида также возрастало при культивировании до 3 суток и составило около 16 г/л в обоих вариантах, что на 6,3% выше, чем на мелассной среде (рис. 2, б).

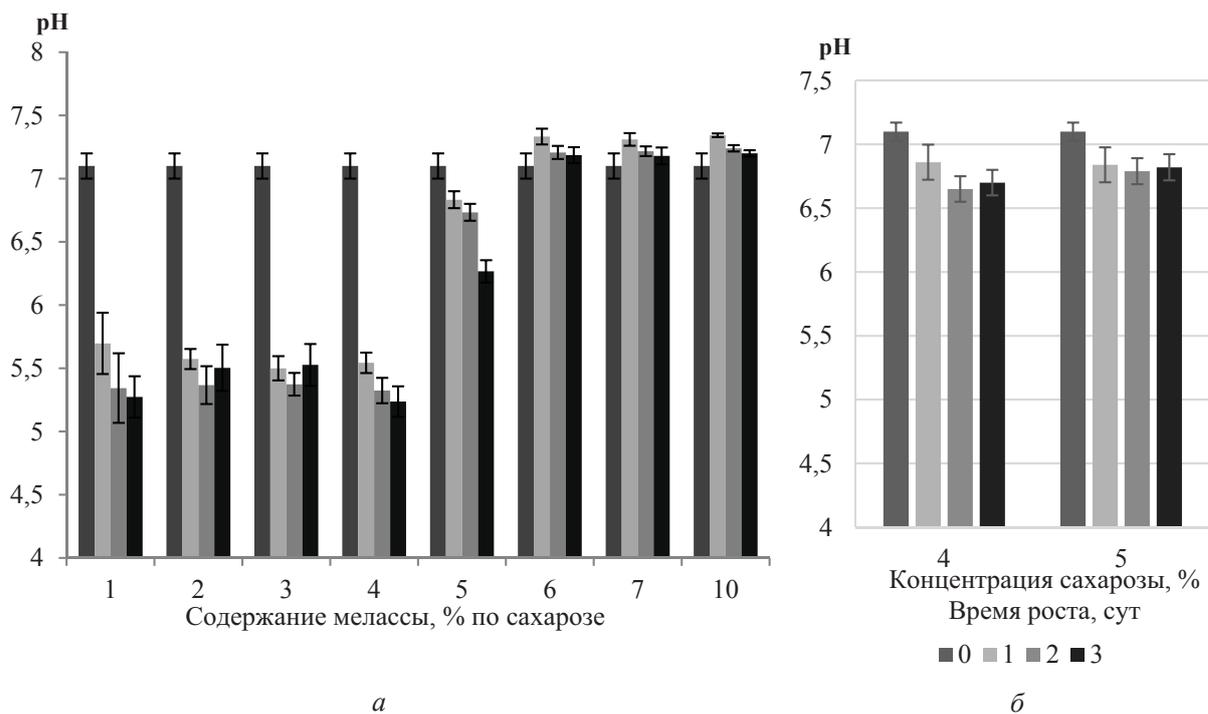


Рис. 1. Динамика pH среды при культивировании бактерии *A.vinelandii* на средах: а – с мелассой, б – сахарозой

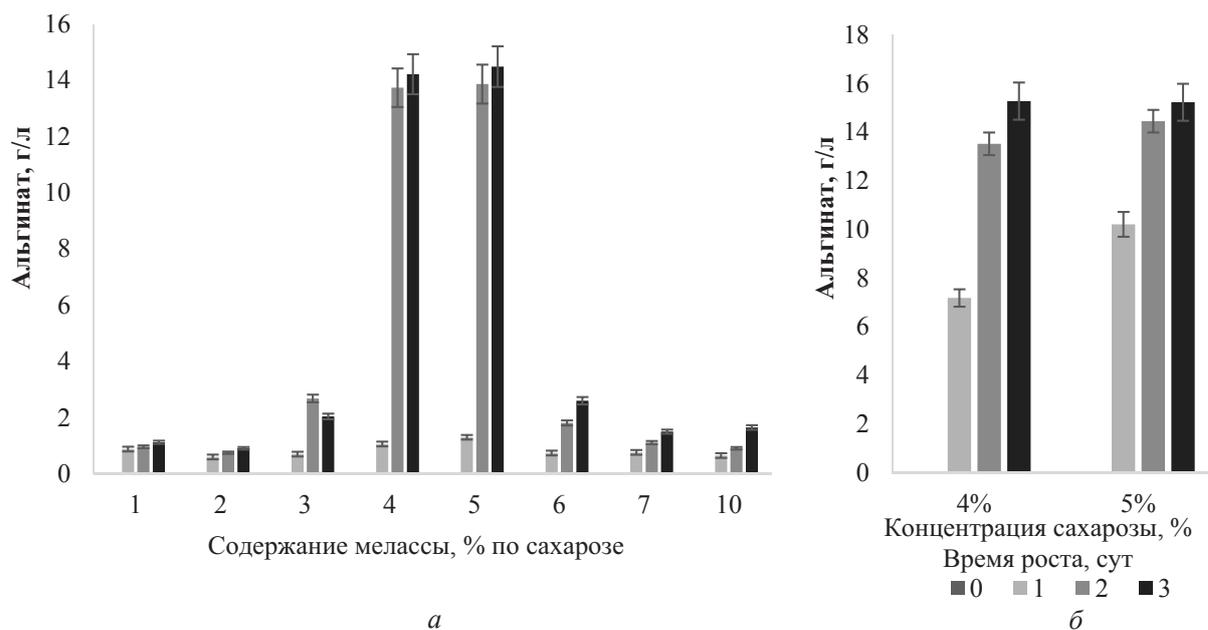


Рис. 2. Динамика содержания альгината при культивировании *A.vinelandii* на средах: а – с мелассой, б – сахарозой



Итак, в ходе проведенного исследования установлено, что мелассу можно использовать для культивирования продуцентов альгината наряду с сахарозосодержащими средами. Для оптимального функционирования микроорганизма и синтеза полисахарида в мелассе содержится достаточно питательных веществ и субстрата. Резкое снижение выхода альгината при культивировании бактерий в средах с высоким содержанием мелассы обусловлено, вероятно, присутствием ингибиторов роста или субстратным ингибированием ферментов клеток. Это, прежде всего, продукты превращения формалина, меланоидины и карамели, они могут осаждаться на поверхности бактериальной клетки и снижать проницаемость клеточной стенки [22].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при изменении содержания мелассы от 1 до 3% наблюдался существенный рост внеклеточного белка: максимальное содержание (90 мкг/мл) выявлено при 3% мелассы, а при повышении ее содержания обнаружено снижение показателя, но значения оставались достаточно высокими. При культивировании в средах с сахарозой наблюдалось более высокое содержание белка (150 мкг/мл), причем на средах с содержанием сахарозы 4 и 5% значения отличались незначительно.

Также исследовали динамику роста бактерий в жидких питательных средах с мелассой и сахарозой. Показано, что в течение 3 суток культивирования штамма на среде с 1–5% мелассы

содержание биомассы росло. Максимальное содержание биомассы выявлено при культивировании *A. vinelandii* на среде с 4% (2,1 г/л), что выше, чем при 5% мелассы (1,87 г/л), хотя именно на этой среде культура показывала высокий выход полисахарида (рис. 3, а). При культивировании на 4% и 5% сахарозной среде в обоих случаях также наблюдался рост биомассы к 3-м суткам, а максимальное количество составило 2,3 г/л (рис. 3, б). Таким образом, наибольший рост биомассы отмечен на 4% меласной среде по сахарозе, однако на сахарозной среде количество биомассы было больше. При биосинтезе альгината микроорганизмами высокий выход полимера достигается при ограничении роста культуры лимитирующими факторами, например, источниками азота и углерода [23]. Известно, что для роста бактерий *A. vinelandii* необходимы такие компоненты, как углеводы, спирты, органические кислоты, минеральные элементы в виде фосфорных и кальциевых солей [19]. Используемая нами меласса содержит вещества, необходимые как для роста микроорганизма, так и для образования и накопления полисахарида альгината. В результате исследований мы выяснили, что в меласной среде лучшей концентрацией сахарозы для накопления альгината является 5%.

В следующих экспериментах из культуральной жидкости, полученной на среде с 5% мелассы, был выделен полисахарид, было проведено изучение его фракционного состава и ИК-

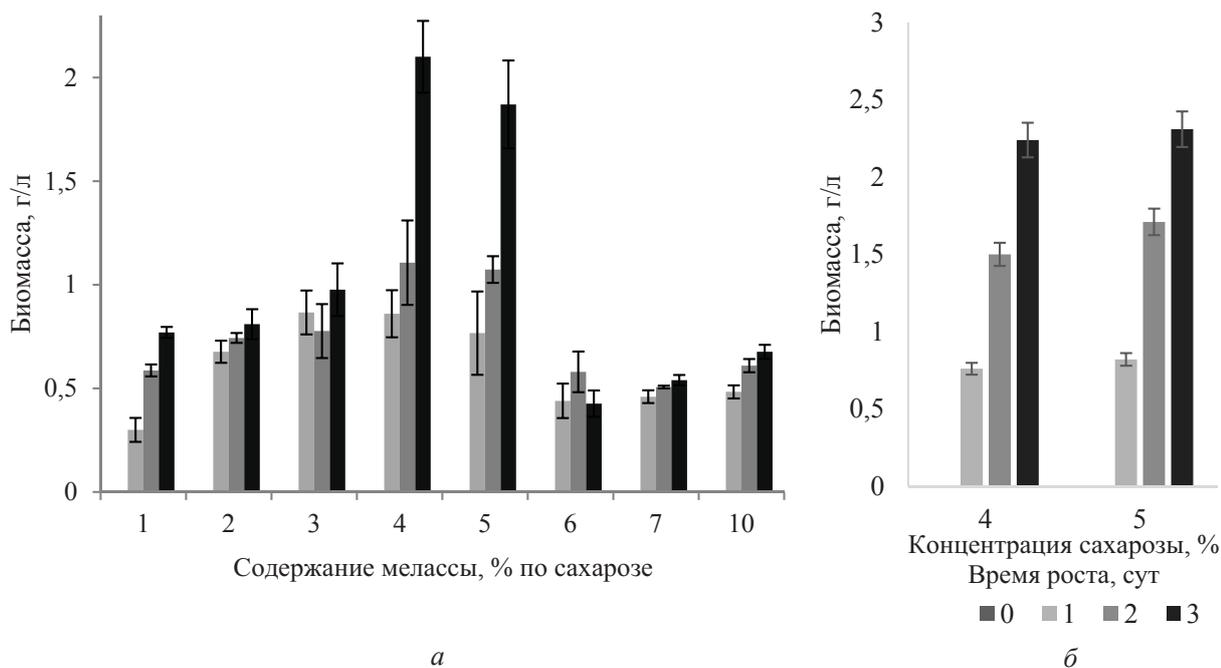


Рис. 3. Динамика изменения биомассы при культивировании бактерии в средах: а – с мелассой, б – сахарозой



спектроскопия. ИК-спектры альгината (рис. 4), характеризуются колебаниями следующих молекулярных связей:  $3400\text{ см}^{-1}$  – групповые валентные колебания  $-\text{OH}$ ,  $2900\text{--}2950\text{ см}^{-1}$  – групповые валентные колебания  $-\text{CH}_2$ ,  $2400\text{ см}^{-1}$  – колебания  $-\text{COOH}$ ,  $1800$  и  $1730\text{ см}^{-1}$  – область колебаний двойных связей ( $-\text{C}=\text{O}$ ),  $1607\text{ см}^{-1}$  – колебания  $-\text{COO}^-$ ,  $1320\text{ см}^{-1}$  – скелетные колебания маннуроновой кислоты,  $1100$  и  $900\text{ см}^{-1}$  – скелетные колебания  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ,  $600\text{ см}^{-1}$  – деформационные колебания углерода. Полоса  $1290\text{ см}^{-1}$ , которая обусловлена колебаниями гулууроновой кислоты, выражена в виде плеча. Поскольку в ИК-спектре максимум пика полосы поглощения из области  $1630\text{ см}^{-1}$  ( $\text{COO}^-$ ) смещается в область  $1730\text{ см}^{-1}$

( $\text{COOH}$ ), можно заключить, что альгинат находится в неионизированной форме альгиновой кислоты [24–29].

С помощью ВЭЖХ-хроматографии (рис. 5) нами был определен фракционный состав альгината (таблица).

Относительная доля фракций альгината

Молекулярная масса, кДа	Относительная доля, %
3	15,8
6	4,3
10	2,2
25	29,6
290	7,9
300	37,8
350	2,5

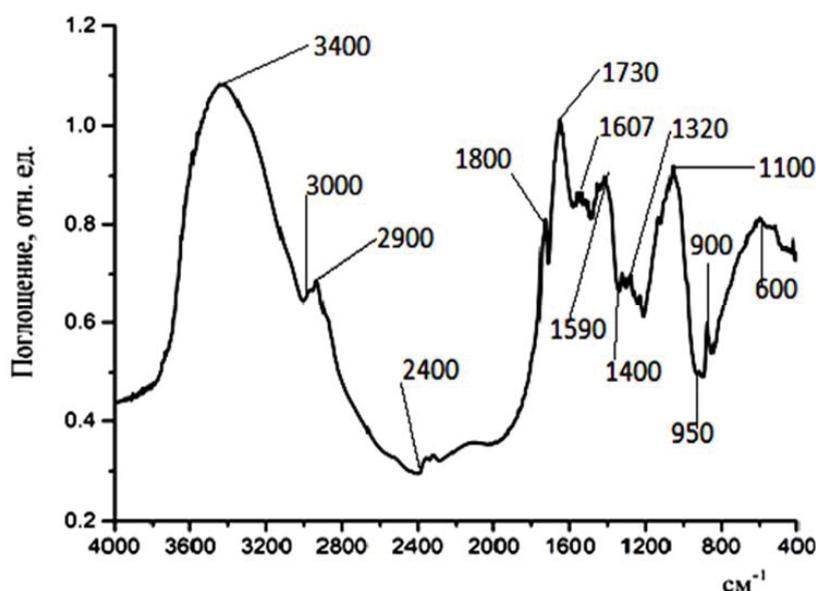


Рис. 4. ИК-спектр альгината *A. vinelandii* D-08

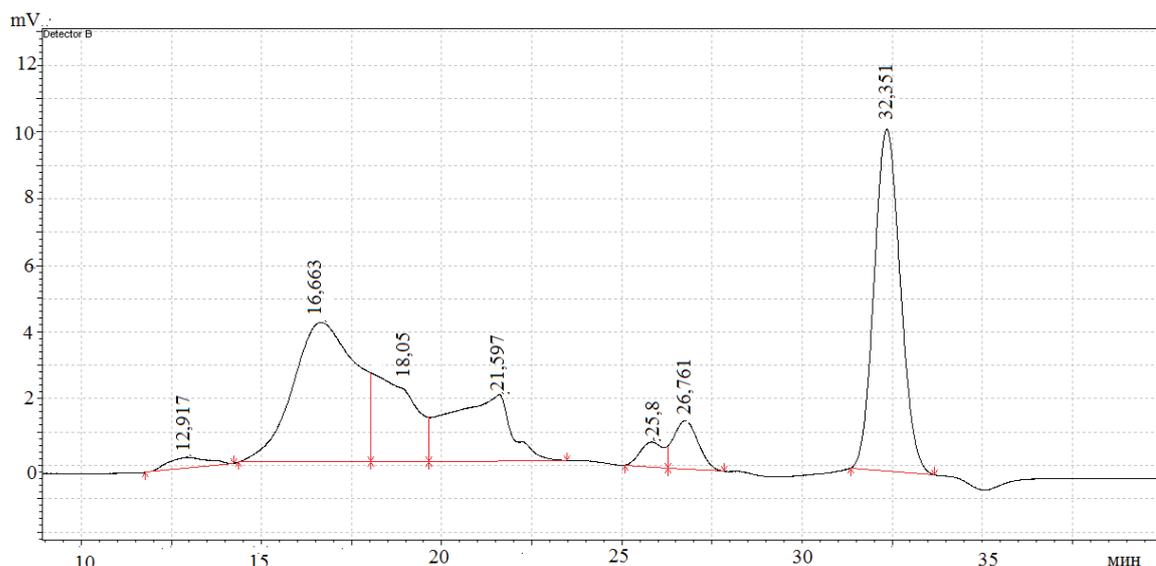


Рис. 5. ВЭЖХ хроматограмма фракций альгината *A. vinelandii* D-08



Максимальная доля фракций альгината приходится на молекулярные массы 3 кДа, 25 кДа и 300 кДа и составляет 15,8%, 29,6% и 37,8% соответственно. Известно, что для альгината *A. vinelandii*, полученного при культивировании на сахаросодержащей среде, характерны высокомолекулярные (300, 270, 100 и 50 кДа) [30] и низкомолекулярные фракции (3, 6 и 10 кДа) [8].

Итак, в ходе исследования был выделен альгинат, синтезированный при культивировании *A. vinelandii* на меласной среде и исследованы его молекулярные свойства. Установлено, что для синтеза альгината (с молекулярной массой 300 кДа) необходимо использовать среду культивирования с 5% мелассы (по сахарозе).

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-05054/18).

### Список литературы

1. Шутова В. В., Ведякина Т. А., Ивинкина Т. И., Ревин В. В. Получение клеевых составов и материалов при использовании культуральной жидкости полисахаридсинтезирующих микроорганизмов // Изв. вузов. Сер. Строительство. 2010. № 3. С. 31–36.
2. Шутова В. В., Ревин В. В. Химическая модификация декстрансодержащей культуральной жидкости для получения адгезивов // Актуальная биотехнология. 2014. № 3 (10). С. 118–119.
3. Donati I., Paoletti S. Material properties of alginates // Alginates : Biology and Applications / ed. B. H. A. Rehm. Berlin ; Heidelberg : Springer Verlag, 2009. P. 1–53.
4. Ревин В. В., Атыкян Н. А., Водяков В. Н., Ляськова Е. В., Кадималиев Д. А., Шутова В. В. Общая биотехнология. Саранск : Изд-во Морд. ун-та, 2015. 604 с.
5. Nivens D. E., Ohman D. E., Williams J., Franklin M. J. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms // J. Bacteriol. 2001. Vol. 183, № 17. P. 1045–1057.
6. Sabra W., Zeng A.P. Microbial production of alginates : physiology and process aspects // Alginates : Biology and Applications / ed. B. H. A. Rehm. Berlin ; Heidelberg : Springer Verlag, 2009. P. 153–173.
7. Galindo E., Peña C., Núñez C., Segura D., Espín G. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* // Microbial Cell Factories. 2007. Vol. 6, № 1. P. 7.
8. Peña C., Campos N., Galindo E. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks // Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1997. Vol. 48, № 4. P. 211–223.
9. Revin V. V., Shutova V. V., Novokuptsev N. V. Biocomposite materials from lignocellulose raw materials and levan produced by *Azotobacter vinelandii* // J. of Biotechnol. 2016. Vol. 231. Supplement. P. S8.
10. Ревин В. В., Шутова В. В., Новокупцев Н. В. Биоконпозиционные материалы на основе ультрадисперсных частиц древесины и левана, полученного путем микробного биосинтеза *Azotobacter vinelandii* Д-08 // Фундаментальные исследования. 2016. № 1. С. 53–57.
11. Mejía M. A., Segura D., Espín G., Galindo E., Peña C. Two-stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis // J. Appl. Microbiol. 2010. Vol. 108, № 1. P. 55–61.
12. Flores C., Díaz-Barrera A., Martínez F., Galindo E., Peña C. Role of oxygen in the polymerization and depolymerization of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* // J. of Chem. Technol. and Biotechnol. 2015. Vol. 90, № 3. P. 356–365.
13. Díaz-Barrera A., Martínez F., Pezoa F. G., Acevedo F. Evaluation of gene expression and alginate production in response to oxygen transfer in continuous culture of *Azotobacter vinelandii* // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 8. P. e105993.
14. Díaz-Barrera A., Silva P., Berrios J., Acevedo F. Manipulating the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in continuous culture // Bioresour Technol. 2010. Vol. 101, № 23. P. 9405–9408.
15. Christensen B. E. Alginates as biomaterials in tissue engineering // Carbohydrate Chemistry : Chem. and Biol. Appr. 2011. Vol. 37. P. 227–258.
16. Díaz-Barrera A., Soto E. Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii* : Current state, limits and prospects // Afr. J. Biotechnol. 2010. Vol. 9, № 33. P. 5240–5250.
17. Microbial production of biopolymers and polymer precursors : applications and perspectives / ed. B. H. A. Rehm. Norfolk, UK : Caister Acad. Press, 2009. 293 p.
18. Díaz-Barrera A., Silva P., Avalos R., Acevedo F. Alginate molecular mass produced by *Azotobacter vinelandii* in response to changes of the O<sub>2</sub> transfer rate in chemostat cultures // Biotechnol. Lett. 2009. Vol. 31, № 6. P. 825–829.
19. Díaz-Barrera A., Gutierrez J., Martínez F., Altamirano C. Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* grown at two bioreactor scales under oxygen-limited conditions // Bioprocess Biosyst. Eng. 2014. Vol. 37, № 6. P. 1133–1140.
20. Шутова В. В., Котина Е. А. Использование мелассы в средах для культивирования левансинтезирующего штамма *Azotobacter vinelandii* // Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке : сб. ст. Саранск : ООО «Референт», 2015. С. 54–57.
21. Логинов Я. О., Худайгулов Г. Г., Четвериков С. П., Мелентьев А. И., Логинов О. Н. Биополимер альгинатной природы с преобладанием L-гулурановой кислоты // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 3. С. 343–347.



22. Огурцов А. Н. Молекулярная биотехнология микробиологических систем : учеб. пособие. Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. 142 с.
23. Savalgi V., Savalgi V. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in batch culture // J. of Gen. and Appl. Microbiol. 1992. Vol. 38, № 6. P. 641–645.
24. Larkin P. J. Infrared and Raman spectroscopy : principles and spectral interpretation. Waltham ; Elsevier, 2011. 230 p.
25. Chanda N. P., Matsuhiro B., Vásquez A. E. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy // Carbohydr. Polym. 2001. Vol. 46, № 1. P. 81–87.
26. Leal D., Matsuhiro B., Rossi M., Caruso F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds // Carbohydr. Res. 2008. Vol. 343, № 2. P. 308–316.
27. Liu Y., Zhao X. R., Peng Y. L., Wang D., Yang L., Peng H., Wang D. Y. Effect of reactive time on flame retardancy and thermal degradation behavior of bio-based zinc alginate film // Polymer Degradation and Stability. 2016. Vol. 127. P. 20–31.
28. Subramanian V., Ganapathi K., Dakshinamoorthy B. FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy of alginate extracted from *turbinaria decurrens* (Phaeophyta) // World J. of Pharm. and Pharm. Sci. 2015. Vol. 4, № 12. P. 761–771.
29. Tian G., Ji Q., Xu D., Tan L., Quan F., Xia Y. The effect of zinc ion content on flame retardance and thermal degradation of alginate fibers // Fiber Polym. 2013. Vol. 14, № 5. P. 767–771.
30. Pena C., Miranda L., Segura D., Nunez C., Espin G., Galindo E. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants // J. of Industrial Microbiol. and Biotechnol. 2002. Vol. 29, № 5. P. 209–213.

**Preparation and Identification of the Molecular Properties of Alginate Synthesized by the Cultivation of *Azotobacter vinelandii* D-05**

**V. V. Shutova, A. B. Rusyaeva**

Vitalina V. Shutova, <https://orcid.org/0000-0001-6437-3621>, Ogarev Mordovia State University, 68, Bolshevistskaya Str., Saransk, 430005, Russia, vshutova@yandex.ru

Anna B. Rusyaeva, Ogarev Mordovia State University, 68, Bolshevistskaya Str., Saransk, 430005, Russia, 39anchiklobaski@mail.ru

It is known that bacterial alginates are widely used in biomedicine as carriers in the immobilization of cells, enzymes and drugs. Their functional properties depend on their monomeric composition and molecular weight and vary depending on the source and the cultivation conditions. It was established that molasses (waste of sugar beet production) can be used as an effective and cheap source of nutrition for the growth of the bacterium *Azotobacter vinelandii* strain D-05 and the production of alginate. Submerged periodic cultivation of the producer on media of different composition was used. The properties of the alginate were controlled by IR spectroscopy. It was shown, that during *A. vinelandii* cultivation on molasses media, the best substrate concentration for the polysaccharide synthesis is 5% (by sucrose). The IR spectrum of the polysaccharide isolated from the culture liquid and purified alginate was similar. The alginate consists of several fractions with a different molecular weight the largest having a molecular mass of 300 kD.

**Key words:** exopolysaccharide, submerged cultivation, molasses, alginate, *Azotobacter vinelandii*.

**Acknowledgements:** *This work was supported by the Russian Foundation for Basic Researches (project no. 18-29-05054\18).*

**Образец для цитирования:**

Шутова В. В., Русяева А. Б. Получение и оценка молекулярных свойств альгината, синтезированного при культивировании *Azotobacter vinelandii* Д-05 // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 455–461. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-455-461>

**Cite this article as:**

Shutova V. V., Rusyaeva A. B. Preparation and Identification of the Molecular Properties of Alginate Synthesized by the Cultivation of *Azotobacter vinelandii* D-05. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 455–461 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-455-461>