

УДК 579.222

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЕВАНА *Azotobacter vinelandii* В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТА БИОСОРБЕНТОВ СОЕДИНЕНИЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И РАДИОНУКЛИДОВ

© 2021 г. В. В. Шутова¹, *, В. В. Ревин¹, Е. А. Калинин¹,
А. В. Сафонов², А. Г. Савченко⁴, Г. В. Максимов^{3,4}

¹Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва,
Саранск, 430005 Россия

²Институт физической химии и электрохимии имени А. Н. Фрумкина РАН, Москва, 119991 Россия

³Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, 119892 Россия

⁴Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Москва, 119049 Россия

*e-mail: vshutova@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.03.2020 г.

После доработки 31.08.2020 г.

Принята к публикации 02.09.2020 г.

Показано, что культивирование *Azotobacter vinelandii* Д-08 на средах с мелассой и бардой увеличивало активность левансахаразы и биосинтез левана. Максимальная удельная активность левансахаразы также была получена на среде с мелассой, что коррелировало с максимальным синтезом полисахарида. Бактерии синтезировали в такой среде дополнительную фракцию высокомолекулярного левана (более 1000 кДа) с измененной молекулярной структурой (снижение вклада колебаний двойных связей и меньшей гидратированностью молекулы), что сопровождалось увеличением связывания молекулой Na, Mg, S, K, Ca, Mn, Fe из среды культивирования. Криогели на основе поливинилового спирта и левана были способны эффективно сорбировать ионы меди (максимально за 1 ч), цинка (за 24 ч) и кадмия (за 10 мин), а также радиоактивные плутоний (максимально за 4 ч) и уран (максимально за 168 ч), что свидетельствует о возможности их использования в качестве сорбентов при очистке стоков различных предприятий от тяжелых металлов и радионуклидов.

Ключевые слова: леван, *Azotobacter vinelandii* Д-08, адсорбция, ионы меди, ионы кобальта, радионуклиды

DOI: 10.31857/S0555109921010347

В настоящее время актуальной задачей биотехнологии является разработка новых технологий очистки сточных вод, содержащих высокотоксичные соединения тяжелых металлов и радионуклиды [1, 2]. В основе ряда технологий важное место занимают сорбционные методы, обеспечивающие максимальное извлечение соединений тяжелых металлов и радионуклидов, а в качестве сорбентов — биоматериалы с высокой эффективностью сорбции и механической прочностью [3, 4]. Для решения проблемы очистки стоков предприятий с многокомпонентными отходами, содержащими тяжелые металлы и радионуклиды (атомные станции и предприятия по добыче и обогащению урановой руды), предлагается использовать микробные экзополисахариды. Очевидно, что биоматериал, используемый для сорбции ионов тяжелых металлов и радионуклидов, должен обладать не только хелатирующими свойствами, но и ста-

бильной гидрофильной трехмерной структурой, обеспечивающей возможность фильтрации воды в течение длительного периода времени. Существенным моментом при создании новых технологий очистки сточных вод может быть использование полисахаридов с подходящей молекулярной структурой [5], затраты на получение которых при культивировании бактерий на средах с вторичными продуктами пищевых производств могут быть минимальными.

Такому критерию могут соответствовать биоматериалы на основе полисахаридов, а также композитные гидрогели [6–8]. Технология производства данных биосорбентов (гидрогель) включает формирование комплекса биополимеров (хитозана, альгината, крахмала и др.) с синтетическими полимерами — полиакриламидом [9], поливиниловым спиртом [10, 11], поливинипирролидоном [12]. Например, гидрогели на основе хитозана

обладают высокой сорбционной способностью для свинца [13] и меди [14], а гидрогель, состоящий из хитозана, желатина и полиакриламида (матрица) – высокой прочностью и сорбционной емкостью для меди и свинца [15].

Таким образом, удаление ионов тяжелых металлов из сточных вод возможно с помощью разработки адсорбента, в состав которого входит полисахарид (например альгинат или леван). Для получения такого сорбента может использоваться полисахарид *Azotobacter vinelandii* – грамотрицательной почвенной бактерии семейства *Pseudomonadaceae* [16, 17]. Известно, что внеклеточное накопление самого значимого полисахарида бактерии (альгината) выполняет барьерную функцию для проникновения к бактерии кислорода или тяжелых металлов, что особенно важно при разработке биосорбентов [16]. Другим полисахаридом бактерии, который может быть использован для создания биоадсорбента, является леван [17, 18]. Леван представляет собой разветвленный гомополисахарид, полифруктан из остатков D-фруктофуранозы с высокой молекулярной массой (10^3 – 10^8 Да) [20, 21]. Молекула левана состоит из остатков фруктофуранозы, соединенных β -(2, 6)-связями в цепях и α -(2, 1)-связями в местах ветвления, и имеет D-глюкозильный остаток на конце. При культивировании бактерий на средах с сахарозой синтезируется также внеклеточная левансахарара, расщепляющая сахарозу на глюкозу и фруктозу, при этом фруктоза используется для биосинтеза полисахарида, а глюкоза – в метаболизме бактерии [22].

Для бактериального синтеза полисахаридов важен состав культуральной среды (углерод, азот, микро- и макроэлементы и т.д.) [23]. Для повышения рентабельности производства биоадсорбентов были предложены субстраты – вторичные продукты пищевой промышленности, меласса (вторичный продукт сахарного производства), послеспиртовая зерновая барда (вторичный продукт производства спирта). Известно, что меласса содержит (%): сухие вещества – 82, сахароза – 48.4, не сахара – 33.6, а барда – 33–45% сухих веществ затора [24, 25].

Цель работы – исследование свойств левана, получаемого при культивировании *A. vinelandii* Д-08 на средах с мелассой и бардой, для его использования в качестве компонента гидрогеля, способного к сорбции высокотоксичных соединений тяжелых металлов и радионуклидов.

МЕТОДИКА

Объект исследования, условия культивирования. Объектом исследования служили бактерии

Azotobacter vinelandii (*Lipman*) Д-08, депонированные в ВКПМ как *Azotobacter chroococcum* В-5787. Для поддержания культуры *A. vinelandii* использовали агаризованную среду (г/л): KH_2PO_4 – 0.2; K_2HPO_4 – 0.8; MgSO_4 – 0.2; CaSO_4 – 0.1; FeCl_3 – следы; Na_2MoO_4 – следы; дрожжевой экстракт – 0.5; сахароза – 20.0; агар-агар – 15–20, pH 7.0–7.2. Бактерии выращивали при 28°C в течение 72 ч. Для выращивания инокулята бактерий *A. vinelandii* использовали жидкую питательную среду аналогичного состава. С поверхности агаризованной среды клетки смывали 10 мл питательной среды и засеивали колбы на 250 мл со 100 мл среды с сахарозой. Инокулят выращивали в шейкерах Environmental shaker – Inkubator ES – 20/60 (Латвия) при 28°C и 250 об./мин 24 ч.

Для приготовления питательных сред использовали свеклосахарную мелассу с 48% сахарозы (Ромодановский сахарный завод, Россия). Для культивирования *A. vinelandii* с мелассой использовали контрольную среду с 4% сахарозы и среды с 5% мелассы (по сахарозе), в которые добавляли барду в количестве 2–15%. Бактерии выращивали при тех же условиях, что и инокулят при pH 7.0–7.2.

После окончания выращивания клетки осаждали центрифугированием при 8000 g 30 мин, количество биомассы определяли взвешиванием после высушивания образца при 100°C.

Получение криогеля. Для получения криогеля 1 г сухого полисахарида и 4 г поливинилового спирта (ПВС) растворяли в 50 мл воды, выдерживали при –20°C 12 ч, оттаивали, выдерживая при 8°C. Для получения однородных гранул криогель измельчали методом экструзии через отверстия определенного диаметра ($d = 2$ мм). В качестве контроля использовали криогель, полученный без добавления левана [26].

Активность левансахаразы. Активность левансахаразы регистрировали по накоплению глюкозы, которую определяли с помощью глюкозооксидазно-пероксидазного метода. Реакционная смесь включала: 3 мл 50 мМ фосфатного буфера (pH 6.5) с сахарозой (100 г/л) и 1 мМ CaCl_2 . К смеси добавляли 0.5 мл супернатанта и инкубировали при 30°C в течение 7 мин. За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль глюкозы в минуту [27]. Белок определяли методом Бредфорда.

Определение содержания левана. Осаждение полисахарида проводили из супернатанта культуральной жидкости (КЖ) 96%-ным этанолом (в соотношении 1 : 2) и высушивали при $102 \pm 1.5^\circ\text{C}$. Содержание полисахарида определяли весовым методом по разнице между весом осадков, обра-

зовавшихся при добавлении этанола к культуральной жидкости и к среде после стерилизации.

Жидкостная хроматография полисахаридов. Разделение водорастворимых соединений из КЖ (20 мкл) проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 A Prominence (Япония) с колонкой Ultrahydrogel 6 × 40 mm Guard Column WATO11565 (Япония). В качестве подвижной фазы использовали деионизированную воду, скорость подачи растворителей не превышала 0.4 мл/мин при 25°C, длина волны оптического детектора – 190 нм. В качестве стандартов использовали декстран с молекулярной массой 12, 25, 80 и 670 кДа.

Инфракрасная спектроскопия. ИК-спектры образцов регистрировали с помощью ИК-Фурье-спектрометра IRPrestige-21 (“Shimadzu”, Япония) в диапазоне от 4000 до 400 см⁻¹. Сухой полисахарид измельчали вместе с KBr (~1 мг вещества + 250–300 мг KBr) и с помощью пресс-формы, получали таблетку для регистрации ИК-спектров.

Рентгенофлуоресцентный анализ (РФА). РФА полисахарида проводили для контроля элементного состава образца с помощью анализатора SciAps X_XRF (РФА) SciAps (США), оснащенного рентгеновской трубкой (напряжение 40 или 50 кэВ, ток до 200 мкА, Rh или Au-анод) и высокоскоростным кремниевым дрейфовым детектором площадью 20 мм²SDD, с разрешением 135 эВ на 5.95 Мп К-альфа линии, 250 тыс. импульсов в с. В основе принципа действия анализатора лежит метод энергетической дисперсии, который заключается в анализе смешанных спектров, полученных после возбуждения характеристического рентгеновского излучения, что позволяет оценить вклад (масса, %) различных элементов. Метод позволяет контролировать содержание анализируемых элементов: 100% ~ 0.001%, с относительной погрешностью 0.5–20% (от веса) и стабильностью ≤0.3%, время анализа 1 мин. Высушенные образцы полисахарида фиксировали в ячейке прибора в специальной подложке и проводили анализ.

Содержание ионов меди и кобальта. Содержание ионов определяли с помощью метода спектрофотометрического анализа в водном растворе [28], используя цветную реакцию с 4-(2-пиридилазо)резорцином (ПАР) при длине волны 530 нм. Адсорбент и раствор соли металла (1 : 20) инкубировали в течение: 5, 10, 30 мин, 1, 2, 3 ч, 1 и 4 сут, затем удаляли адсорбент и к раствору соли металла (0.375 мл для соли кобальта, 0.875 мл для соли меди) добавляли 2 мл ПАР, доводя объем до 20 мл водой. Оптическую плотность растворов регистрировали в 1 см кювете относительно воды.

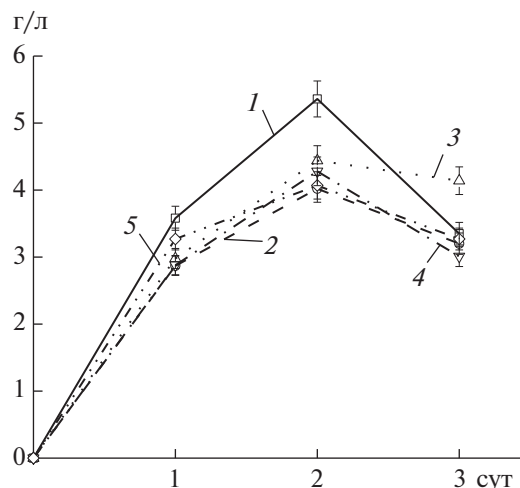


Рис. 1. Динамика роста *A. vinelandii* на средах с мелассой и различным содержанием барды: 1 – среда с мелассой; 2 – добавление барды, 2%; 3 – добавление барды, 5%; 4 – добавление барды, 10%; 5 – добавление барды, 15%.

Сорбцию радиоактивных образцов на адсорбенте. Сорбцию на сорбенте оценивали с помощью радионуклидов ²³³U, ²³⁹Pu. Эксперименты проводили при соотношении сорбент : раствор 1 : 50. Перед экспериментом в раствор вносили индикаторные количества - радионуклиды (моль/л): ²³³U – 4.5 × 10⁻¹⁰, ²³⁹Pu – 8.7 × 10⁻⁸, чтобы исходная концентрация активного нуклида в растворе составляла до 200 Бк/мл.

Радиоактивность. Радиоактивность регистрировали методом жидкостно-сцинтилляционного счета с помощью низкофонового альфа-бета-спектрометра Tri-Carb 3180TR/SL (“Perkin Elmer”, США) с использованием сцинтиллятора Perkin Elmer Optiphase Hisafe3 (соотношение сцинтиллятор : аликвота – 10 : 1). Степень сорбции (*S*, %) рассчитывали как долю радионуклида, перешедшего из воды на/в сорбент по формуле: $S = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\%$, где *C*₀ и *C* – соответственно начальная и конечная концентрация радионуклида в растворе, Бк/мл.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excell 2015.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследовали условия синтеза и молекулярные характеристики левана, выделяемого при культивировании *A. vinelandii* на средах с мелассой и бардой. Установлено, что среда культивирования (СК) с добавлением 5% мелассы (по

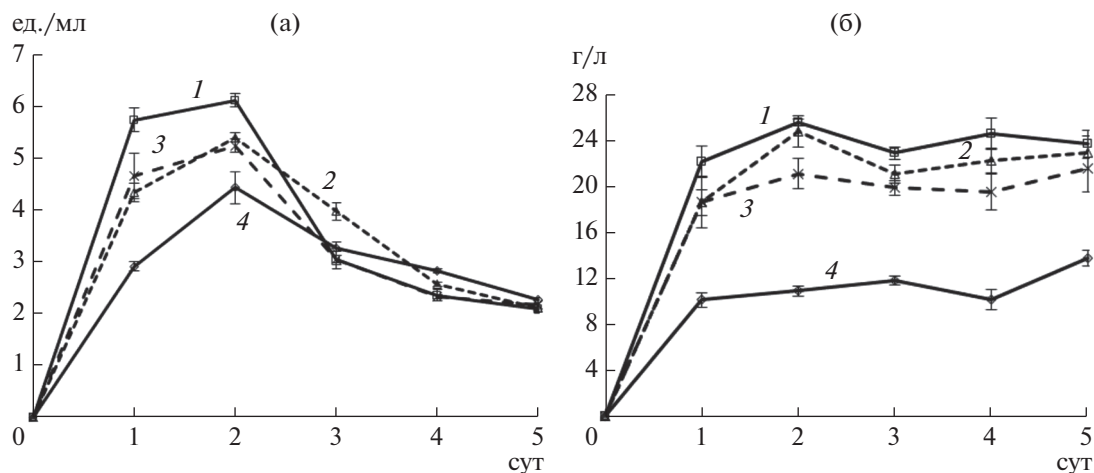


Рис. 2. Изменение активности левансахаразы (а, ед./мл) и накопления левана (б, г/л) при культивировании *A. vinelandii* на средах с мелассой и бардой. 1 – среда с мелассой; 2 – добавление барды 5%; 3 – добавление барды 10%; 4 – среда с сахарозой.

сахарозе) и среды с 5% мелассы и добавлением 2–15% барды (комплексная среда) обеспечивали оптимальные условия для эффективного синтеза левансахаразы и левана.

Содержание биомассы при культивировании в присутствии мелассы достигало максимума на 2 сут, добавление барды к среде не оказывало существенного влияния на рост биомассы и только на 3 сут превышало контроль в СК с 5% барды (рис. 1). Максимальное содержание внеклеточного белка в КЖ было выявлено на 4 сут роста в среде с 10% барды (0.197 мг/мл).

При культивировании *A. vinelandii* левансахаразная активность была максимальной на 2 сут: на среде с мелассой (6.12 ед./мл) и на той же среде с добавлением барды 5 и 10% – 5.4 и 5.25 ед./мл соответственно. Максимальная активность левансахаразы соответствовала и максимальному выходу левана (рис. 2а). Для биотехнологического производства важно контролировать изменение удельной активности левансахаразы, поскольку оно может отражать также и содержание

левана в КЖ (табл. 1). Максимальное количество полисахарида накапливалось в 1 сут, максимальная удельная активность левансахаразы зафиксирована на среде с мелассой, что коррелирует с максимальным выходом экзополисахарида (ЭПС).

При культивировании бактерий на среде с мелассой уже на 1 сут содержание левана составляло 22.2 г/л, на вторые сутки достигло максимума 25.6 г/л (рис. 2б), добавление в СК барды (комплексная среда) не способствовало увеличению синтеза левана: на 2 сут выход составил 24.8 г/л при добавлении 5% барды и при 10% барды – 21.1 г/л.

Для понимания механизма сорбции катионов леваном был исследован состав и структура полисахарида. Известно, что молекулярная масса левана зависит от штамма бактерии и может меняться от 5 до 3500 кДа [27]. Молекулярную массу синтезированных полисахаридов исследовали методом ВЭЖХ. При культивировании бактерии на среде с сахарозой было обнаружено три фракции левана с молекулярной массой 600–700, 190–210 кДа и с массой менее 25 кДа (рис. 3а). При

Таблица 1. Динамика изменения удельной активности левансахаразы при культивировании *A. vinelandii* на средах с мелассой и бардой

Варианты сред	Удельная активность левансахаразы, ед./мг белка				
	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч	120 ч
С сахарозой	78.9 ± 4.0	68.3 ± 3.1	33.3 ± 2.1	28.3 ± 2.0	20.1 ± 1.2
С мелассой	249.6 ± 5.9	83.8 ± 2.1	27.6 ± 1.6	16.5 ± 1.0	19.0 ± 1.1
С мелассой + 5% барды	72.5 ± 3.0	61.4 ± 2.9	30.5 ± 1.7	20.0 ± 1.4	11.9 ± 0.7
С мелассой + 10% барды	57.5 ± 1.4	58.3 ± 2.4	18.8 ± 1.4	11.8 ± 0.8	11.5 ± 1.4

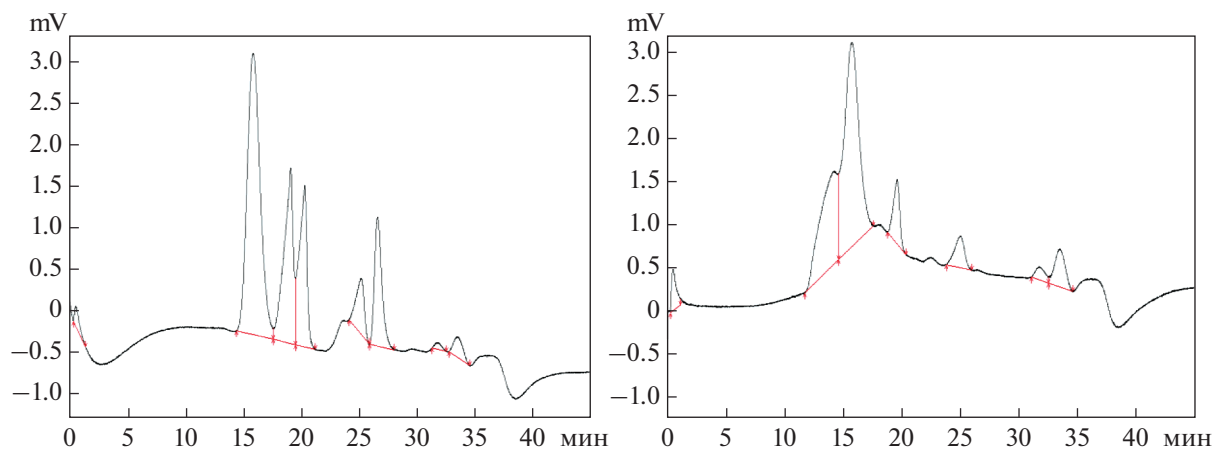


Рис. 3. Распределение по молекулярной массе левана, полученного при культивировании *A. vinelandii* на среде с сахарозой (а) и мелассой (б). (Красная линия – базовая).

культивировании бактерии на среде с мелассой была обнаружена дополнительная фракция левана с молекулярной массой более 1000 кДа (рис. 3б).

Для изучения возможности сорбции ионов важно знать особенности молекулярной структуры левана, синтезированного на среде с мелассой. С помощью ИК спектроскопии установлено, что в ИК-спектре левана наблюдались полосы, характерные для валентных колебаний гидроксильных групп (область 3700–3100 см^{-1}), валентных колебаний С–Н-связей метиленовых групп

(3000–2800 см^{-1}) и их асимметричных валентных колебаний (около 2945 см^{-1}).

В ИК-спектрах область 1500–900 см^{-1} характеризует различные колебания: С–Н-, С–О- и О–Н-гликозидной связи и глюкофуранозного кольца левана: полосы 1450 и 1430 см^{-1} обусловлены деформационными плоскостными колебаниями ОН-группы, а также принадлежат колебаниям метиленовой группы (около 1429 см^{-1}); 900 см^{-1} – асимметричным колебаниям кольца в

Таблица 2. Элементный состав левана (масс %), синтезированного при культивировании *A. vinelandii* Д-08 на средах с мелассой и бардой

Компоненты	Контроль	Меласса	Меласса + 5% барды	Меласса+ 10% барды
C	30.7 +/-0.1	32.7 +/-0.1	34.1 +/-0.4	30.2 +/-0.1
O	63.5 +/-0.1	60.2 +/-0.1	60.8 +/-0.1	61.4 +/-0.1
Na	0.0969 +/-0.1	0.0174 +/-0.1	0.0224 +/-0.1	0.186 +/-0.1
Mg	0.124 +/-0.1	0.126 +/-0.1	0.20 +/-0.1	0.273 +/-0.1
Al	0.0457 +/-0.1	0.0300 +/-0.1	0.0300 +/-0.1	0.0312 +/-0.1
Si	0.216 +/-0.1	0.106 +/-0.1	0.176 +/-0.1	0.137 +/-0.1
P	0.526 +/-0.1	0.109 +/-0.1	0.243 +/-0.1	0.530 +/-0.1
S	0.102 +/-0.1	0.0922 +/-0.1	0.27 +/-0.1	0.182 +/-0.1
Cl	0.0691 +/-0.1	0.0849 +/-0.1	1.26 +/-0.1	0.0538 +/-0.1
K	0.376 +/-0.1	1.56 +/-0.1	2.77 +/-0.1	2.21 +/-0.1
Ca	3.10 +/-0.1	4.40 +/-0.1	4.233 +/-0.1	3.39 +/-0.1
Mn	0.438 +/-0.1	0.0109 +/-0.1	0.0030 +/-0.1	0.0650 +/-0.1
Fe	0.421 +/-0.1	0.132 +/-0.1	0.0101 +/-0.1	1.000 0.243 +/-0.1

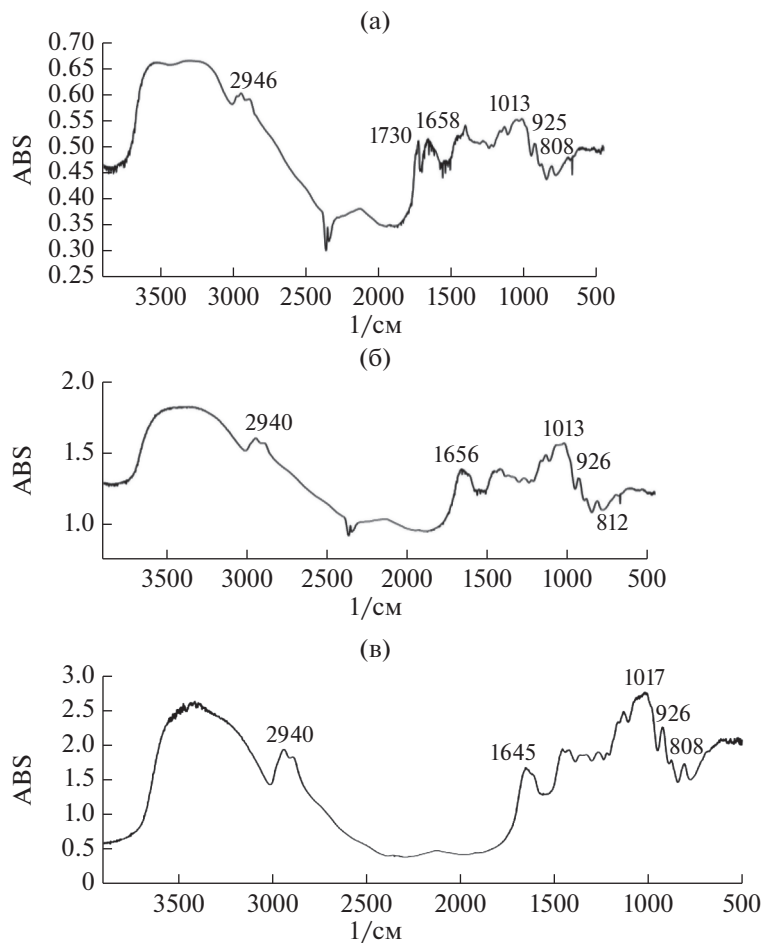


Рис. 4. ИК-спектры левана, синтезированного на среде с сахарозой (а), мелассой (б) и с мелассой + 10% барды (в).

противофазе и колебаниям атома C_1 и 4 окружающим его атомам в β -гликозидных структурах. Полоса около 800 см^{-1} обусловлена $C-H$ и $C-H_2$ -маятниковыми колебаниями фруктофуранозного кольца молекулы (рис. 4) [20]. Сопоставление ИК-спектра левана данного штамма и данных ИК-спектроскопии леванов *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, видов *Halomonas* [20, 29, 30] позволяет сделать вывод о том, что образец, полученный на средах с мелассой, идентичен левану других продуцентов.

В молекуле левана, синтезированного *A. vinelandii* среде с мелассой, были выявлены изменения как гидратированности молекулы полимера, так и колебаний двойных связей молекулы (область $1800\text{--}1500\text{ см}^{-1}$, рис. 4). Известно, что полоса с максимумом около 1640 см^{-1} обусловлена деформационными колебаниями OH -групп воды и при увеличении гидратированности левана полоса смещается в область больших волновых чисел (рис. 4а). Таким образом, молекула левана, синтезированного бактериями на СК с мелассой и

бардой, менее гидратирована по сравнению с леваном, синтезированным на среде с сахарозой.

В следующей серии экспериментов, с помощью РФА исследовали изменения элементного состава левана, полученного при культивировании *A. vinelandii* на разных средах (табл. 2). Установлено, что содержание углерода и кислорода в образцах, полученных при культивировании на СК с мелассой и с мелассой и бардой не менялось (30.2–34.1% и 60.2–63.5% соответственно). В то же время при культивировании бактерии на СК с мелассой в молекуле леване снижалось содержание Na , Al , S , Si , P , Mn , Fe , по сравнению с леваном, полученным на среде с сахарозой, но при этом увеличивается содержание Mg , Cl , K , Ca . При культивировании бактерий на комплексной среде (меласса + 5% барды) уменьшалось содержание Na , Al , Si , P , Ca , Mn , Fe , но увеличивается содержание Mg , S , Cl , K , по сравнению с леваном, синтезированным на среде с сахарозой. При культивировании бактерий на комплексной среде (меласса + 10% барды) уменьшалось содержа-

Таблица 3. Динамика сорбции ионов Cu и ионов Co образцами криогеля с леваном

Время	Адсорбция ионов Cu, %		Адсорбция ионов Co, %	
	Контроль	С леваном	Контроль	С леваном
5 мин	39.9 ± 1.3	44.8 ± 2.0	39.3 ± 3.4	34.1 ± 1.5
10 мин	41.4 ± 1.6	49.4 ± 0.6	42.2 ± 0.5	34.6 ± 2.0
30 мин	43.6 ± 1.9	51.7 ± 3.4	45.4 ± 3.1	35.7 ± 3.1
1 ч	44.5 ± 1.7	53.1 ± 3.6	35.6 ± 3.1	46.7 ± 1.4
2 ч	46.9 ± 3.0	55.4 ± 3.3	35.8 ± 0.9	35.9 ± 1.5
3 ч	47.3 ± 1.9	54.9 ± 0.8	37.2 ± 2.1	36.8 ± 2.9
24 ч	45.6 ± 4.4	46.9 ± 1.0	31.7 ± 2.2	37.2 ± 2.4
96 ч	43.2 ± 1.4	46.3 ± 1.4	21.1 ± 2.2	28.8 ± 2.9

Таблица 4. Динамика сорбции ионов Zn и ионов Cd образцами криогеля с леваном

Время, ч	Адсорбция ионов Zn, %		Адсорбция ионов Cd, %	
	контроль	с леваном	контроль	с леваном
5 мин	30.9 ± 1.7	31.1 ± 1.5	59.6 ± 3.3	69.9 ± 2.0
10 мин	30.3 ± 0.3	31.3 ± 0.6	60.8 ± 1.4	79.2 ± 2.2
30 мин	30.4 ± 0.4	31.3 ± 2.2	54.4 ± 2.8	62.7 ± 3.1
1	31.3 ± 0.5	31.9 ± 2.2	50.6 ± 1.1	51.9 ± 1.8
2	31.4 ± 0.1	41.7 ± 4.9	56.4 ± 1.0	66.8 ± 2.6
3	31.5 ± 0.6	37.8 ± 5.4	51.4 ± 3.3	73.3 ± 1.7
24	31.4 ± 0.2	48.1 ± 1.2	51.8 ± 2.8	78.8 ± 1.6
96	30.8 ± 1.6	34.5 ± 7.1	42.8 ± 3.9	70.8 ± 1.8

ние Al, Si, P, Cl, но увеличивалось Na, Mg, S, K, Ca, Mn, Fe (по сравнению с леваном на среде с сахарозой). Полученные данные свидетельствуют о различном элементном составе левана, полученного при культивировании бактерий на различных сложных средах. Культивирование бактерий на комбинированной среде (особенно меласса + 10% барды) способствовало синтезу левана с большим молекулярным весом (более 1000 кДа) и измененной молекулярной структурой: снижение вклада колебаний двойных связей и меньшая гидратированность молекулы. Вероятно, причиной этого могло быть увеличение связывания молекулой левана ионов Na, Mg, S, K, Ca, Mn, Fe из среды.

В дальнейшем исследовали сорбционные свойства криогеля с бактериальным леваном, полученным при культивировании на различных средах с

вторичными продуктами производства. Известно, что гидрогели во многом аналогичны полимерным материалам и в отличие от смол с жесткой структурой характеризуются гибкой структурой и могут пропускать гораздо больше воды. Наличие специфических функциональных групп (например, OH) в гидрогелях позволяет эффективно адсорбировать частицы на наружной поверхности, а также на внутренней поверхности их трехмерной сети [31]. Для исследования процесса адсорбции ионов Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} и Zn^{2+} к растворам солей добавляли измельченный криогель, приготовленный на основе ПВС (контроль) и ПВС с леваном (опыт). В ходе исследования показано, что все образцы были способны в разной степени к сорбции исследуемых ионов. Сорбция ионов меди в контроле достигала 47.3% в течение 3 ч, а при использовании ПВС с нативным леваном уже 57% в тече-

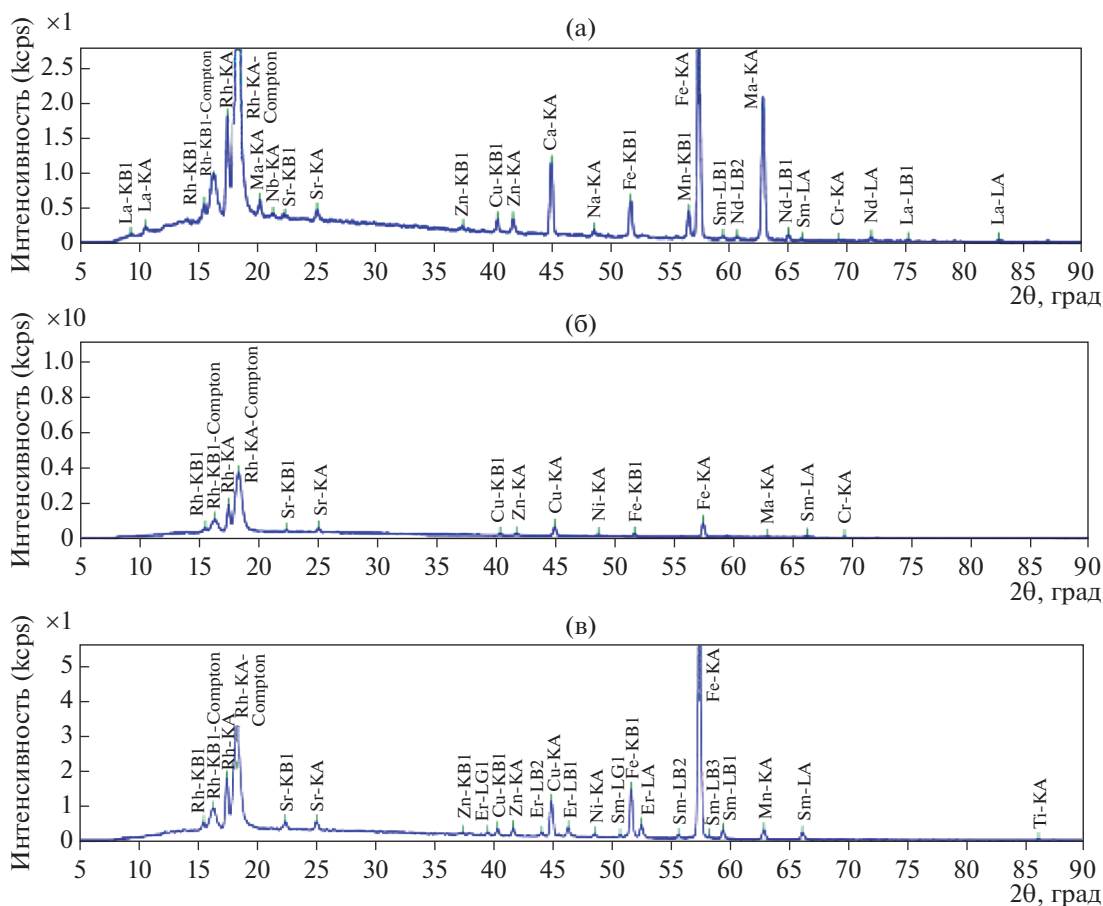


Рис. 5. РФА-спектры левана, синтезированного на среде с сахарозой (а), мелассой (б) и среде с мелассой и 10% барды (в).

ние 2 ч (табл. 3). В экспериментах с кобальтом максимальное значение сорбции в контроле наблюдали через 30 мин – 45.4%, образец с леваном максимально связывал катион через 1 ч – 46.7%. Максимальная сорбция ионов цинка приходилась на 24 ч и составляла 48.2%, в контроле значение было ниже – 33.4% на 18 ч. Эффективная сорбция ионов кадмия наблюдалась уже через 10 мин – 79.2% (табл. 4). В контроле процесс шел медленнее, и эффективность очистки от кадмия была меньше и составляла 60.8%.

Таким образом, из полученных результатов видно, что сорбция ионов меди, цинка и кадмия криогелем с леваном происходила эффективнее, чем с ПВС. Сорбция ионов меди, кобальта, цинка и кадмия достигала максимума в определенный момент времени, а после достижения равновесия процесс постепенно выходил на равновесное плато. Сорбция разных ионов криогелем с леваном имела различную динамику и амплитуду: максимальный эффект обнаружен при сорбции Cd^{2+} в течение 10 мин.

Установлено, что криогели с леваном способны сорбировать радиоактивный плутоний и уран: сорбция урана достигала 55% после двух нед. эксперимента и не достигла равновесия. Такую динамику сорбции, предположительно, можно объяснить большим радиусом гидратированного радионуклида и стерическими трудностями его абсорбции, а также отрицательным зарядом иона. Сорбция плутония происходила быстрее и достигала равновесия уже через 4 ч (40.9%).

Максимальная удельная активность левансахаразы наблюдалась при культивировании бактерии на среде с мелассой, что коррелировало и с максимальным синтезом левана. В этих условиях бактерии синтезировали высокомолекулярный леван (более 1000 кДа) с измененной молекулярной структурой (снижение вклада колебаний двойных связей и меньшая гидратированность молекулы). Все это, вероятно, обусловило увеличение связывания молекулой левана ионов Na, Mg, S, K, Ca, Mn, Fe из среды культивирования. На основе поливинилового спирта и левана были получены криогели, способные эффективно сор-

бировать ионы меди (максимально за 1 ч), цинка (за 24 ч) и кадмия (за 10 мин), а также радиоактивные плутоний (максимально за 4 ч) и уран (максимально за 168 ч). Все это свидетельствует о возможности использования криогелей ПВС с леваном в качестве компонентов сорбентов при очистке стоков различных предприятий от тяжелых металлов и радионуклидов. Дальнейшее обращение с сорбентами подразумевает их регенерацию с предварительной десорбцией металлов 1 н раствором соляной кислоты, поскольку известно, что леван обладает устойчивостью к нагреванию, кислотным и щелочным средам, высокой водоудерживающей способностью [21, 32]. В таком режиме возможно многократное использование биосорбентов. Окончательный этап утилизации может быть осуществлен сжиганием, что приводит к 95% сокращению объемов сорбента в виде зольного остатка.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Humelnicu D., Dinu M.V., Dragan E.S. // J. Hazard. Mater. 2011. V. 185. № 1. P. 447–455.
2. Zhang F., Wang M., Zhou L., Ma X., Zhou Y. // Desalination and Water Treatment. 2015. V. 54. №. 9. P. 2546–2556.
3. Wang X., Zheng Y., Wang A. // J. Hazard. Mater. 2009. V. 168. № 2–3. P. 970–977.
4. Karim M.R., Aijaz M.O., Alharth N.H., Alharbi H.F., Al-Mubaddel F.S., Awual M.R. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 169. P. 479–486.
5. Su T. Wu L., Pan X., Zhang C., Shi M., Gao R., Qi X., Dong W. // J. Colloid Interface Sci. 2019. V. 542. P. 253–262.
6. Bajpai A.K., Shukla S.K., Bhanu S., Kankane S. // Prog. Polym. Sci. 2008. V. 33. № 11. P. 1088–1118.
7. Myung D., Waters D., Wiseman M., Duhamel P.E., Noolandi J., Ta C.N., Frank C.W. // Polym. Adv. Technol. 2008. V. 19. № 6. P. 647–657.
8. Dragan E.S. // Chem. Eng. J. 2014. V. 243. P. 572–590.
9. Bonina P., Petrova T.S., Manolova N. // J. Bioact. Compat. Polym. 2004. V. 19. № 2. P. 101–116.
10. Liang S. Liu L., Huang Q., Yam K.L. // Carbohydr. Polym. 2009. V. 77. № 4. P. 718–724.
11. Liu J., Wang W., Wang A. // Polym. Adv. Technol. 2011. V. 22. № 5. P. 627–634.
12. Marsano E., Bianchi E., Vicini S., Compagnino L., Sionkowska A., Skopińska J., Wiśniewski M. // Polymer. 2005. V. 46. № 5. P. 1595–1600.
13. Huang D., Wang W., Kang Y., Wang A. // J. Macromol. Sci. Part A: Pure Appl. Chem. 2012. V. 49. № 11. P. 971–979.
14. Dragan E.S., Dinu M.V. // Res. J. Chem. Env. 2013. V. 17. № 10. P. 4–10.
15. Wang W.B., Huang D.J., Kang Y.R., Wang A.Q. // Colloid Surf. B: Biointerfaces. 2013. V. 106. P. 51–59.
16. Pena C., Miranda L., Segura D., Nunez C., Espin G., Galindo E. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 29. № 5. P. 209–213.
17. Шумова В.В., Русяева А.Б. // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18. № 4. С. 455–461.
18. Ревин В.В., Шумова В.В., Новокупцев Н.В. // Фундаментальные исследования. 2016. № 1-1. С. 53–57.
19. Revin V.V., Shutova V.V., Novokuptsev N.V. // J. Biotechnol. 2016. V. 231 (Supplement). P. S8.
20. Abdel-Fattah A.F., Mahmoud D.A.R., Esawy M.A.T. // Current Microbiology. 2005. V. 51. №. 6. P. 402–407.
21. Kang S.A., Jang K.H., Seo J.W., Kim K.H., Kim Y.H., Rairakhwada D., Seo M.Y., Lee J.O., Ha S.D., Kim C.-H., Rhee S.K. Levam: Applications and Perspectives. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives / Ed. B.H.A. Rehm. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. P. 145–161.
22. Vijn I., Smeekens S. // Plant physiology. 1999. V. 120. № 2. P. 351–360.
23. Revin V.V., Kostina E.G., Revina N.V., Shutova V.V. // Braz. Arch. Biol. Techn. 2018. V. 61. P. e18160406.
24. Бугаенко И.Ф., Штерман С.В. Меласса (свекловичная, тростниковая, сырцовая), состав и методы анализа. М.: МГУ, 2006. 72 с.
25. Distillers Grains: Production, Properties, and Utilization / Eds. K.S. Liu., K.A. Rosentrater. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, CRC Press, 2012. 564 p.
26. Stepanov N.A., Efremenko E.N. // Catalysts. 2018. V. 8. P. 33–49.
27. Ortiz-Soto M.E., Rivera M., Rudiño-Piñera E., Olvera C., López-Munguía A. // Protein Eng. Des. Sel. 2008. V. 21. № 10. P. 589–595.
28. Коломиец Л.Л., Пилипенко Л.А., Жмудь И.М., Панфилова И.П. // Журн. аналит. химии. 1999. Т. 54. № 1. С. 34–36.
29. Kucukasik F., Kazak H., Guney D., Finore I., Poli A., Yenigun O., Nicolaus B., Oner E.T. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 89. № 6. P. 1729–1740.
30. Sarilmiser H.K., Ates O., Ozdemir G., Arga K.Y., Oner E.T. // J. Biosci. Bioeng. 2015. V. 119. № 4. P. 455–463.
31. Khan M., Lo I.M.C. // Water Res. 2016. V. 106. P. 259–271.
32. Öner E.T., Hernández L., Combie J. // Biotechnology Advances. 2016. V. 34. № 5. P. 827–844.

Use of Levan from *Azotobacter vinelandii* as a Component of Biosorbent of Heavy Metals and Radionuclides

V. V. Shutova^{a,*}, V. V. Revin^a, E. A. Kalinkina^a, A. V. Safonov^b, A. G. Savchenko^d, and G. V. Maksimov^{c, d}

^aNational Research Mordovia State University, Saransk, 430005 Russia

^bA.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS, Moscow, 119991 Russia

^cMoscow Lomonosov State University, Moscow, 119892 Russia

^dNational Research Technological University MISIS, Moscow, 119049 Russia

*e-mail: vshutova@yandex.ru

Azotobacter vinelandii Д-08 cultivation on molasses and distiller's grains media increases levansaccharase activity and levan biosynthesis: the maximum specific activity of levansaccharase is found on molasses medium and correlates with the maximum synthesis of polysaccharide. It was found, that bacteria synthesized an additional fraction of high-molecular levan (more than 1000 kDa) with altered molecular structure (reduced contribution of double bond fluctuations and less hydration of the molecule), likely due to increased binding by the Na, Mg, S, K, Ca, Mn, Fe with levan molecule. The obtained cryogels based on polyvinyl alcohol and levan are able to effectively sorb ions with different dynamics: copper ions (max after 1 h), zinc (max after 24 h) and cadmium (max after 10 min), as well as radioactive plutonium (max after 4 h) and uranium (max after 168 h). All this shows the possibility of using cryogels with levan as components of sorbents in purification of effluents of various enterprises from heavy metals and radionuclides

Keywords: Levan, *Azotobacter vinelandii* D-08, adsorption, copper ions, cobalt ions, radionuclides