

УДК 661.8.273

ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МАГНІТОКЕРОВАНОГО БІОСОРБЕНТУ НА ОСНОВІ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

С.В. Горобець, Н.О. Михайленко *, Ю.В. Карпенко

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»
Факультет біотехнології і біотехніки, кафедра біоінформатики
просп. Перемоги, 37, корпус 18, Київ, 03056, Україна

Вивчено сорбційну здатність та кінетику осадження магнітокерованого біосорбенту на основі дріжджів *S. cerevisiae* та наномагнетиту від параметрів процесу його приготування. Отримано оптимальні співвідношення маси клітин дріжджів і маси магнітних міток, та зроблено висновки щодо практичного застосування біосорбенту залежно від відсоткового вмісту магнітних наноміток.

ВСТУП

В останні роки широко використовуються методи видалення іонів важких металів із стічних вод і концентрування металів з руд мікроорганізмами. Накопичення мікроорганізмами катіонів металів з водних розчинів відбувається шляхом біосорбції. Практично у всіх випадках мікробна біомаса може утримувати значні кількості іонів металів, що дає перспективу широкого застосування мікроорганізмів в біотехнологічних способах очищення стічних вод від важких металів, токсинів і радіонуклідів [1].

В роботах [2–4] було показано, що магнітомічені дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є ефективними біосорбентами, з точки зору економічної доцільності використання відпрацьованої біомаси, зокрема хлібопекарських дріжджів. Крім того, після сорбції магнітокерований біосорбент може бути ефективно видалений з очищеної від важких металів води методом високоградієнтної магнітної сепарації [3].

Отримання стабільних магнітомічених клітин дріжджів є багатофакторною проблемою, оскільки необхідно враховувати метод і швидкість перемішування суспензії дріжджів з магнітною рідиною, тривалість процесу, кількісне співвідношення магнітних наночастинок і дріжджових клітин, рН середовища і ін.

Дослідження процесу осадження магнітокерованого сорбенту під дією гравітації

важливе для подальшого вивчення властивостей утвореного комплексу та дає змогу підбирати відповідну конструкцію високоградієнтної феромагнітної насадки магнітного фільтра, що буде використовуватися для вилучення відпрацьованого біосорбенту.

В роботах [5, 6] було показано, що для надання дріжджовим клітинам магнітної сприйнятливості та використання їх як магнітокерованого біосорбенту з метою вилучення іонів важких металів доцільно використовувати нанорозмірний магнетит з ефективним розміром частинок від 5 до 20 нм. Приготування магнітомічених клітин здійснюється багатовихровим гідродинамічним перемішуванням, що сприяє інтенсифікації процесу порівняно з механічним способом перемішування, більший сорбційний ємності біосорбенту щодо важких металів.

Прикріплення магнітних міток до клітин дріжджів відбувається на поверхні клітинної стінки, що впливає на її сорбційні характеристики. В роботі [7] було показано, що прикріплення наномагнетиту знижує електрокінетичний потенціал клітинної стінки магнітомічених дріжджів. Тому виникає завдання визначення оптимального співвідношення біомаси дріжджів і маси магнітних міток, з точки зору видалення магнітоміченого біосорбенту на високоградієнтних магнітних сепараторах, оскільки для біосорбції катіонів металів таке співвідношення вже встановлене і

* контактний автор pitbm@ukr.net
ХФТП 2013. Т. 4. № 2

складає близько 1% маси магнетиту до маси дріжджів [6].

Важливо відзначити, що нанорозмірні частинки магнетиту, що використовуються в сучасних дослідженнях [5], краще застосовувати у процесах магнітомічення біосорбенту. Нанорозмірні магнітні частинки мають більшу сорбційну ємність по відношенню до дріжджів порівняно з мікророзмірними частинками. Це пояснюється тим, що процес надання магнітних властивостей дріжджовим клітинам може проходити з використанням меншої кількості нанорозмірного магнетиту [6].

Однак процес седиментації комплексу магнітні мітки – дріжджова клітина, що спостерігається після приготування магнітоміченого біосорбенту, практично не вивчався, хоча він має важливе значення для з'ясування механізмів біосорбції дріжджовими клітинами наномігнетиту та характеристик процесу. Зазначимо, що для технологічності процесу важливо, щоб магнітомічені клітини залишались у зваженому стані, а не осідали на дно апарату в технологічній лінії (відстійника або високоградієнтного магнітного сепаратора), мали сорбційну здатність таку ж як і нативні клітини та не утворювали конгломератів, щоб не зменшувалась загальна поверхня сорбції.

В роботі було досліджено оптимальні характеристики магнітокерowanego біосорбенту на основі дріжджів *S. cerevisiae* та наноміток магнетиту. Була визначена гранична кількість наномігнетиту, що може бути сорбована дріжджовою клітиною, досліджено процес седиментації комплексу магнітні мітки – дріжджові клітини за різного співвідношення кількості наномігнетиту і дріжджів *S. cerevisiae* та визначене їх оптимальне співвідношення для отримання стабільного розчину магнітокерowanego біосорбенту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Для проведення експериментів використовували дріжджі хлібопекарські пресовані *S. cerevisiae* виробництва ЗАТ «Ензим», розведені дистильованою водою до концентрації 50 мг/дм^3 (концентрація клітин $8 \cdot 10^6 \text{ кл/см}^3$), та розчин нанорозмірного магнетиту, приготований методом співосадження лугом солей дво-

тривалентного заліза Fe [6, 8], з концентрацією 50 мг/см^3 , який розводили до концентрацій 500, 250, 100, 75, 50, 25 і 10 мг/дм^3 .

Для дослідження процесу біосорбції *S. cerevisiae* в суспензії дріжджів додавали розчин наномігнетиту різної концентрації. Отриману суміш перемішували за допомогою механічної мішалки. Максимальний час перемішування становив 90 хв. Кожні 10 хв відбирали пробу та фільтрували її через фільтрувальний папір «червона стрічка» для видалення дріжджових клітин з відсорбованим магнетитом. Магнетит, який не був сорбований клітинами *S. cerevisiae*, залишався у відфільтрованому розчині, який досліджували фотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46. Значення довжин хвилі було 510 нм [9].

Для визначення оптичної густини розчину дріжджів вимірювання проводили на спектрофотометрі з довжиною хвилі 590 нм [10].

Було побудовано градувальний графік залежності оптичної густини розчину магнітних міток $D_{\text{сеп}}$ від його концентрації $C_{\text{м.м.}}$ (рис. 1). Розчини різної концентрації магнітних міток отримували методом розведення робочого розчину концентрацією 1 г/дм^3 дистильованою водою.

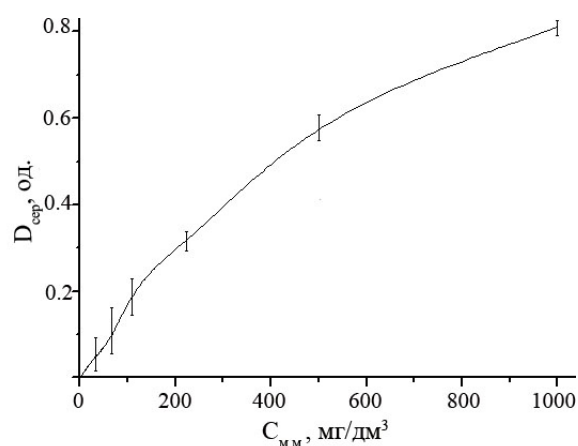


Рис. 1. Графік залежності оптичної густини розчину магнітних міток від його концентрації відразу після приготування

За даним градувальним графіком, після відділення магнітоміченої біомаси від розчину, проводили дослідження кількості

сорбованих магнітних міток дріжджами *S. cerevisiae*.

Було досліджено стабільність суспензії наномагнетиту (магнітних міток) в часі щодо процесу седиментації з метою оптимізації умов виготовлення магнітокерowanego біосорбенту зі стабільними властивостями.

Для проведення серії експериментів щодо виготовлення стабільного магнітокерowanego біосорбенту було досліджено процес седиментації наночастинок магнетиту в розчині (рис. 2) шляхом вимірювання часової залежності оптичної густини спектрофотометричним методом із застосуванням попередньо побудованого градуувального графіку (рис. 1).

Для дослідження процесів коагуляції і седиментації шляхом розведення дистильованою водою були отримані розчини магнітних міток із концентраціями 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 і 7.813 мг/дм³ відповідно. Такі концентрації розчинів магнітних міток найчастіше використовуються для виготовлення магнітокерowanego біосорбенту [4, 6]. Вимірювали оптичну густину розчинів магнітних міток одразу після розведення, через 5, 10 та 30 хв (рис. 2).

Проаналізувавши отримані дані, можна зробити висновок, що седиментація наночастинок магнетиту, незалежно від часу осадження, практично не відбувається і різниця оптичної густини $|\Delta D|$ була у межах похибки вимірювань.

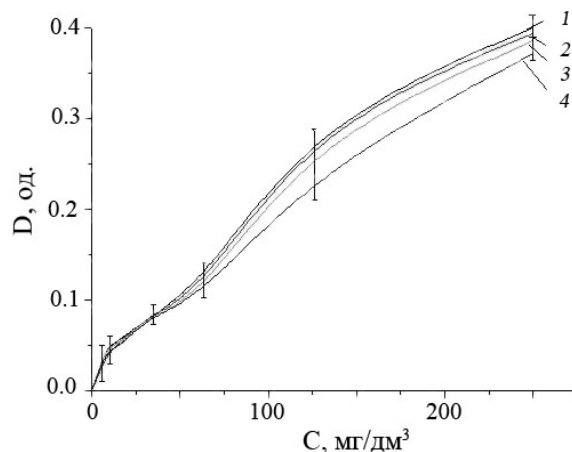


Рис. 2. Залежність оптичної густини від концентрації розчину наномагнетиту: 1 – значення одразу після перемішування; 2 – через 5 хв осадження; 3 – після 10 хв осадження; 4 – після 30 хв осадження

Для дослідження осадження магнітокерowanego біосорбенту в рідині під дією гравітаційних сил до приготованої суспензії дріжджів *S. cerevisiae* концентрацією 400 мг/дм³ додавали розчин наномагнетиту концентрацією 1 г/дм³ різних об'ємів для отримання співвідношень 1, 2, 4 та 6% до кількості дріжджів у суспензії та перемішували. Контрольним розчином була суспензія дріжджів без додавання наноміток. Перемішування проводили протягом 2, 4, 6 та 10 хв для кожного з розчинів. В таблиці 1 представлено схему приготування робочих розчинів магнітокерowanego біосорбенту.

Таблиця 1. Схема приготування робочих розчинів для дослідження процесів седиментації магнітокерowanego біосорбенту

Зразок	Відсоткове співвідношення магнітних наноміток до маси клітин у разі механічного перемішування біомаси дріжджів <i>S. cerevisiae</i> із суспензією наномагнетиту, $m_{\text{нм}}/m_{\text{др}}$, %					Тривалість механічного перемішування суспензії дріжджів <i>S. cerevisiae</i> із суспензією наномагнетиту для отримання магнітокерowanego сорбенту, t, хв			
	0	1	2	4	6	0	2	4	10
1 (контроль)	x					x			
2		x					x		
3		x						x	
4		x							x
5			x				x		
6			x					x	
7			x						x
8				x			x		
9				x				x	
10				x					x
11					x		x		
12					x			x	
13					x				x

Після проведення дослідження процесу осадження магнітокерованого біосорбенту усереднені значення були використані для побудови графіків залежності кінетики осадження. В експериментах, представлених на рисунках 3, 4 і 5, середня квадратична похибка вимірювань склала 5 %, на інших рисунках похибка представлена графічно.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ІХ ОБГОВОРЕННЯ

Було вивчено процес сорбції магнітних міток дріжджами *S. cerevisiae*, тобто визначено кількість наномангнетиту, що приєднується до клітин цих дріжджів. Рівноважний стан сорбційної системи

досягався через 90 хв механічного перемішування, тому для побудови ізотерми сорбції під час усіх експериментів тривалість перемішування була 90 хв (таблиця 2).

Як видно з наведених результатів, чим менша концентрація наномангнетиту в досліджуваному розчині, тим ефективніше наномангнетит сорбується дріжджами.

Результати таблиці 2 було апроксимовано згідно моделі Ленгмюра [11] і побудовано ізотерму сорбції, яку представлено на рис. 3, де Q – сорбційна здатність клітин дріжджів, мг наномангнетиту на 1 г біосорбенту натуральної вологості.

Таблиця 2. Сорбція магнітних міток клітинами дріжджів *S. cerevisiae* за різних концентрацій розчину наномангнетиту

Концентрація наномангнетиту в досліджуваному розчині, $C_{\text{м.м}}$, мг/дм ³	Середнє значення оптичної густини розчину після сорбції, $D_{\text{к}}$, од.	Залишкова концентрація магнетиту згідно з градувальним графіком, $C_{\text{к}}$, мг/дм ³	Відсоткове співвідношення кількості сорбованого наномангнетиту до клітин дріжджів, $m_{\text{м.м}}/m_{\text{др}}$, %	Рівень видалення наномангнетиту з розчинів, $(1 - C_{\text{к}}/C_{\text{м.м}})$, %
500	0.38±0.01	295±15	51±4	41±3
250	0.13±0.02	80±10	43±23	68±4
100	0.083±0.002	65±10	15±3	60±15
75	0.045±0.001	30±5	10.0±1.3	57±6
50	0.031±0.003	27±3	6.0±0.8	46±6
25	0.008±0.002	10±2	4.0±0.5	60±8
10	0.002±0.001	1±2	2.0±0.5	90±5

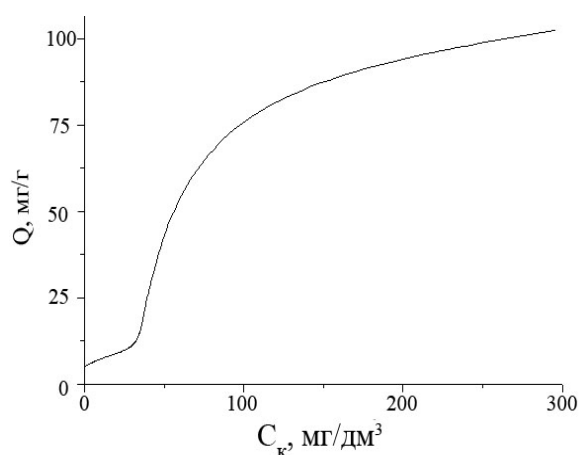


Рис. 3. Ізотерма сорбції магнетиту клітинами дріжджів *S. cerevisiae*

Як видно з рис. 3, гранична кількість наномангнетиту, що може бути сорбована дріжджами *S. cerevisiae*, складає близько

100 мг/г біосорбенту натуральної вологості. Також варто відзначити, що при $m_{\text{м.м}}/m_{\text{др}} = 6 \pm 0.75$ % сорбується 46 ± 6 % від наявної в системі маси магнітних міток, тобто кінцевий розчин містить половину початкової маси магнітних міток. При збільшенні початкової концентрації, рівень видалення коливається в діапазоні 38–75 %. Отже оптимальними співвідношеннями, з точки зору сорбції, будуть 0–6 % маси магнітних міток до біомаси дріжджів, де максимальний рівень видалення складає 95–40 % відповідно (див. три останні рядки таблиці 2).

Було досліджено стабільність характеристик магнітоміченого композиту наночастинки магнетиту – дріжджова клітина шляхом дослідження кінетики осадження магнітомічених клітин за допомогою вимірювання оптичної густини суспензії спектрофотометричним методом із застосуванням попередньо побудованого

градувального графіку (рис. 1). Також на рис. 2 показано осадження нанорозмірного магнетиту через 0, 5, 10 і 30 хв при різних розведеннях розчину магнітних міток.

Були проведені дослідження процесу коагуляції та седиментації для зразків 1–3. Для контрольного зразку 1, який представляє собою суспензію дріжджів, зміна концентрації складала $|\Delta C| < 0.1$ після 30 хв осадження, що свідчить про те, що осадження зважених клітин у розчині майже не відбувається, що розчин є стійким та може слугувати зразком для порівняння. Для зразків 2–7 концентрація суспензії також майже не змінювалась з часом та складала різницю $|\Delta C| < 0.1$ за 30 хв, свідчаючи, що для концентрації наноманетиту від 1 до 2 % суспензія комплексу магнітні мітки – дріжджова клітина відносно седиментаційно стійка.

Результати досліджень седиментаційної стійкості суспензій магнітомічених дріжджів з співвідношеннями маси наноманетиту до біомаси 4 і 6 % залежно від тривалості перемішування представлено на рис. 4 і 5 відповідно.

На рис. 4 і 5 спостерігаються різні початкові концентрації, що пояснюється різним часом перемішування магнітомічених клітин з магнітними мітками.

З графіків видно, що чим більший відсотковий вміст магнітних міток у розчині, тим ефективніше відбувається осадження суспензії. Це можна пояснити коагуляцією комплексів магнітокерowanego біосорбенту і як наслідок зменшення його електрокінетичного потенціалу. Також відомо, що седиментаційна стійкість системи визначається значенням електрокінетичного потенціалу, меншим за -30 мВ [12]. Дріжджові клітини без магнітних міток мають граничне значення електрокінетичного потенціалу близько -20 мВ [13], а у разі прикріплення магнітних міток воно зростає до -11 – -16 мВ, такі значення були отримані при розрахунках в роботі [7]. Чим більше електрокінетичний потенціал, тим швидше будуть осідати комплекси магнітокерowanego біосорбенту.

Зрозуміло, що наявність негативного заряду поверхні магнітоміченої дріжджової клітини змінює її сорбційні властивості. Це пояснюється тим, що після сорбції магнітних міток клітинами дріжджів *S. cerevisiae*

утворений комплекс стає схильним до коагуляції, що сприяє швидшому осадженню. З графіків видно, що зі збільшенням кількості наноманетиту з 0 до 6 % швидкість зменшення оптичної густини з часом зростає, що очевидно свідчить про збільшення швидкості осадження комплексів магніто-керowanego біосорбенту. Швидкість осадження, як відомо, залежить від розмірів комплексів і їх густини, отже таким чином було підтверджено експериментально залежність седиментації комплексів магнітокерowanego біосорбенту від його складу.

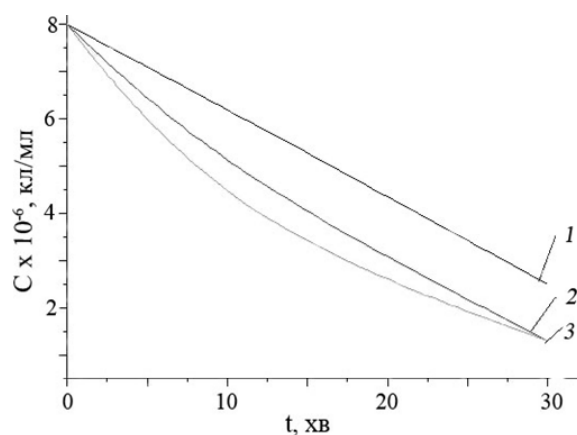


Рис. 4. Кінетика осадження 4%-ого магнітокерowanego біосорбенту: 1 – зразок 8, 2 – зразок 9; 3 – зразок 10

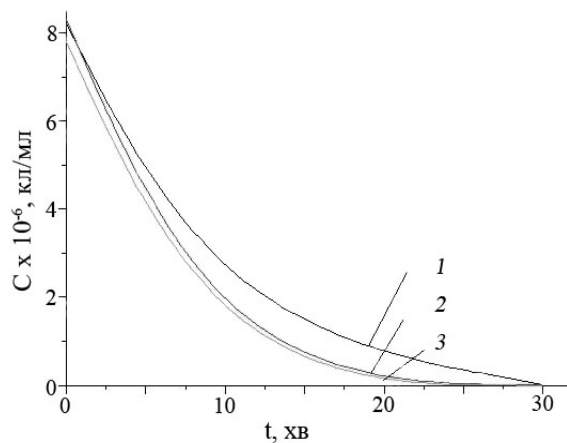


Рис. 5. Кінетика осадження 6%-ого магнітокерowanego біосорбенту: 1 – зразок 11, 2 – зразок 12 і 3 – зразок 13

За графіками було також визначено, що більша кількість магнітних міток була сорбована клітинами дріжджів, тому відсоткові співвідношення магнітних наноміток до маси клітин в діапазоні 0–6 % для отримання магнітокерowanego сорбенту є оптимальними з точки зору седиментації. З

точки зору сорбції магнетиту ці співвідношення також є оптимальними, оскільки при співвідношенні 0–6 % після сорбції дріжджами в розчині залишається не більше 15–60 % і не менше 5–48 % маси наномангнетиту відповідно (рис. 3). Для кращого розуміння механізмів сорбції дріжджами наномангнетиту необхідні подальші дослідження сорбції магнітних міток і катіонів важких металів дріжджами *S. cerevisiae*.

ВИСНОВКИ

Показано, що дріжджові клітини мають максимальну сорбційну ємність по відношенню до наномангнетиту, рівну 100 мг/г натуральної вологості. У разі максимального рівня сорбції дріжджами наномангнетиту, магнітокерований біосорбент буде мати співвідношення маси дріжджів до маси наномангнетиту 2 : 1. Використані співвідношення маси клітин дріжджів до маси частинок наномангнетиту в експериментах показали, що магнітокерований біосорбент з співвідношенням мас до 6 % володіє електрокінетичним потенціалом -11 – -16 мВ і швидкість процесу осадження сорбенту незначна, особливо для співвідношень мас 1–2 %. Варто відзначити, що витрата магнітної рідини запропонована в цій роботі є значно меншою і складала від 1 до 6 % порівняно з результатами інших досліджень, де використовували мікророзмірний магнетит, кількість якого складає 25–33 % від біомаси. Зменшення витрати магнітної рідини обумовлює економічність виготовлення магнітокерованого біосорбенту представленим методом.

Для практичних застосувань перспективним є магнітокерований біосорбент з відсотковим співвідношенням маси магнітних наноміток до маси клітин 1–2 %, у якого сорбційна ємність по відношенню до катіонів міді складає 25 мг/г сухого сорбенту [6, 7]. Такий магнітокерований біосорбент, як показано в цій роботі, не схильний до седиментації, а також більш економічний у виготовленні порівняно з іншими аналогами, в яких використано мікророзмірний магнетит. Водночас, такий магнітокерований біосорбент має достатню магнітну сприйнятливість для вилучення з робочого розчину магнітними сепараторами з ВГФН з розгалуженою поверхнею, запропонованими в роботі [14].

ЛІТЕРАТУРА

1. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод – Москва: Химия, 1984. – 448 с.
2. Wang J., Chen C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review // *Biotechnology Advances*. – 2006. – V. 24. – P. 427–451.
3. Yavuz C.T., Prakash A., Colvin V.L. Magnetic separations: from steel plants to biotechnology // *Chem. Engineer. Sci.* – 2009. – V. 64. – P. 2510–2521.
4. Patzak M., Dostalek P., Fogarty R. et al. Development of magnetic biosorbents for metal uptake // *Biotechnology Techniques*. – 1997. – V. 11, N 7. – P. 483–487.
5. Горобець С.В., Карпенко Ю.В. Интенсификация сорбционной способности дрожжей *S. cerevisiae* за допомогою багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування // *Электроника и связь*. – 2009. – Ч. 1, № 2–3. – С. 191–195.
6. Горобець С.В., Карпенко Ю.В., Маринченко Л.В. Біосорбція іонів міді Cu^{2+} магнітоміченими клітинами *S. cerevisiae* // *Вісник Донецького національного університету*. – 2010. – Серія А, Природничі науки. – № 1. – С. 230–236.
7. Карпенко Ю.В. Зміна заряду поверхні магнітомічених клітин дріжджів *S. cerevisiae* у разі збільшення концентрації наномангнетиту // *Всеукраїнська з міжнародною участю конференція молодих вчених "Хімія, фізика та технологія поверхні"* (15–16 травня 2012 р. Київ, Україна). – 19 с.
8. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media // *IEEE transactions on magnetics*. – 1981. – V. 17, N 2. – P. 1247–1248.
9. Огнеупоры и огнеупорное сырье. Методы определения оксида железа (III). ГОСТ 2642.5-97. – УкрНИИО. – Дата введения 23 апреля 1997 г.
10. Эмануэль Н.М. Экспериментальные методы химической кинетики. Учебн. пособие / Под редакцией Н.М. Эмануэля, М.Г. Кузьмина. – Москва, 1985 г. – 348 с.
11. Пальтиель Л.Р., Зенин Г.С., Вольнец Н.Ф. Физическая химия. Поверхностные явления и дисперсные системы, Учебное пособие / Санкт-Петербург. – 2004. – 69 с.

12. Воюцкий С.С. Курс коллоидной химии. – Москва: Химия. – 1975. – 519 с.
13. Маринченко В.О., Домарецький В.А., Шиян П.Л. та ін. Технологія спирту / Під редакцією Маринченка В.О. – Вінниця: «Поділля-2000», 2003. – 496 с.
14. Горобець С.В., Горобець О.Ю., Двойненко О.К., Михайленко Н.О. Очищення стічних вод від іонів купруму (II) магнітокерованим біосорбентом за допомогою високоградієнтних феромагнітних насадок // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2010. – № 3. – С. 21–25.

Надійшла 06.11.2012, прийнята 25.02.2013

Определение оптимальных характеристик магнитоуправляемого биосорбента на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

С.В. Горобец, Н.А. Михайленко, Ю.В. Карпенко

*Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»,
Факультет биотехнологии и биотехники, кафедра биоинформатики
просп. Победы, 37, корпус 18, Киев, 03056, Украина, pitbm@ukr.net*

*Изучены сорбционная способность и кинетика осаждения магнитоуправляемого биосорбента на основе дрожжей *S. cerevisiae* и наномагнетита в зависимости от параметров процесса его приготовления. Получены оптимальные соотношения массы клеток дрожжей и массы магнитных меток, и сделаны выводы о практическом применении биосорбента в зависимости от процентного содержания магнитных нанометок.*

Determination of optimum characteristics of magnetically operated biosorbent based on *Saccharomyces cerevisiae* yeasts

S.V. Gorobets, N.O. Mykhailenko, Yu.V. Karpenko

*National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”,
Faculty of Biotechnology and Bioengineering, Department of Bioinformatics
37 Peremohy Avenue, 18 build., Kyiv, 03056, Ukraine, pitbm@ukr.net*

*The sorption capacity and kinetics of magnetically operated biosorbent based on *S. cerevisiae* yeasts and nanomagnetite were determined depending on parameters of its preparation. The optimum ratios of the number of yeasts cells to magnetic particles have been obtained, and conclusions about the practical applications of biosorbent with the mass percentage of magnetic nanoparticles have been made.*