

ИНВЕРСИЯ САХАРОЗЫ И БИОСОРБЦИЯ ИОНОВ Cu^{2+} МАГНИТОМАРКИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

С. В. Беспалова¹, Ю. А. Легенький¹, М. Г. Холявка², М. В. Солопов¹

¹ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 4.10.2016 г.

Аннотация. Проведена оценка динамики каталитических и сорбционных процессов клеток *Saccharomyces cerevisiae*, модифицированных с помощью магнитных наночастиц оксида железа, стабилизированных тетраметиламмонием гидроксидом (Fe_3O_4 -ТМАН) и лимонной кислотой (Fe_3O_4 -Cit), по сравнению с нативными клетками. Было выявлено отсутствие ингибирования процессов биосорбции и биокатализа после магнитной модификации клеток.

Ключевые слова: дрожжевые клетки, магнитные наночастицы, магнитомаркирование, биосорбент, биокатализатор

Abstract. Dynamics of catalytic and sorption processes of *Saccharomyces cerevisiae* cells modified with iron oxide magnetic nanoparticles stabilized with tetramethylammonium hydroxide (Fe_3O_4 -ТМАН) and citric acid (Fe_3O_4 -Cit) was evaluated, as compared to native cells. Absence of inhibition processes of biosorption and biocatalysis after magnetic modification of the cells was revealed.

Keywords: yeast cells, magnetic nanoparticles, magnetic marking, biosorbent, biocatalyst

Пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) давно известны человечеству благодаря набору ценных свойств, которые нашли широкое применение в промышленном производстве, биотехнологии, генетике, биохимии и молекулярной биологии. Однако, кроме использования этих объектов в производстве хлебопекарной и алкогольной продукции, имеются сферы, в которых дрожжевые клетки выступают в роли биокатализаторов и адсорбентов различных ксенобиотиков [1].

Применение модификации клеток с помощью наночастиц магнитных соединений даёт возможность повысить прикладной потенциал дрожжей, позволяя осуществлять их эффективную сепарацию из реакционных сред. В большинстве случаев для магнитомаркирования клеток используют наночастицы магнетита (Fe_3O_4). Маркирование дрожжевых клеток магнетитом для изготовления потенциально новых биосорбентов и биокатализаторов является перспективным направлением в

научных исследованиях [2-5]. Такие клетки можно использовать в качестве целостных управляемых ферментных систем, тем самым минуя сложные процедуры выделения и очистки катализирующих белков. За счёт возможности дрожжей аккумулировать широкий спектр тяжелых металлов их можно применять в очистительных сооружениях нового типа, основанных на магнитной сепарации клеток, связавших загрязняющие вещества.

Тем не менее, остается открытым вопрос о влиянии покрытия из магнитных наночастиц на активность ферментных систем клетки и интенсивность протекания адсорбционных процессов. Немаловажную роль в этом влиянии играет тип стабилизирующего покрытия магнитной наночастицы. В этой связи целью работы стала оценка динамики каталитических и сорбционных процессов клеток *Saccharomyces cerevisiae*, модифицированных с помощью магнитных наночастиц оксида железа, стабилизированных тетраметиламмонием гидроксидом (Fe_3O_4 -ТМАН) и лимонной кислотой (Fe_3O_4 -Cit), по сравнению с нативными клетками.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для магнитной модификации использовались сухие пекарские дрожжи производителя «Lesaffre» (Франция). В качестве магнитного маркера применялись наночастицы Fe_3O_4 , стабилизированные тетраметиламмонием гидроксидом (Fe_3O_4 -ТМАН) и лимонной кислотой (Fe_3O_4 -Cit). Процедуры синтеза и стабилизации наночастиц проводили по аналогии с методиками, описанными в работах [6, 7].

Магнитная маркировка клеток Fe_3O_4 -ТМАН и Fe_3O_4 -Cit наночастицами проводилась при концентрации 1.5 мг Fe/кл по методике, описанной в работе [3]. Кратко опишем основные этапы этой процедуры. Сухие дрожжи суспендировали и отмывали в физиологическом растворе с последующим центрифугированием при $F_r=1500$. После этого осадок суспендировали в глицин-NaOH буфере (pH=10.6) при маркировании клеток Fe_3O_4 -ТМАН наночастицами или глицин-HCl буфере (pH=2.2) в случае модификации дрожжей Fe_3O_4 -Cit наночастицами. После маркировки проводили трехкратную отмывку клеток физиологическим раствором от незахваченных наночастиц. Магнитомаркированные клетки хранили в физиологическом растворе при 4°C.

Оценку биокаталитической активности магнитомаркированных дрожжей проводили путём определения концентрации глюкозы в культивируемой среде, образуемой после реакции гидролиза сахарозы клетками, осуществляемой β -D-фруктофуранозидазой (КФ 3.2.1.26). К 0.2 г модифицированных клеток вносили 7 мл 20%_{масс} сахарозы. Пробы перемешивали в механическом смесителе проб с частотой 28 об/мин. Содержание глюкозы определяли на протяжении 80 мин с начала перемешивания, используя набор для определения её концентрации в биологических жидкостях глюкозооксидазным методом (REF HP009.02). Принцип метода основан на том, что глюкоза в присутствии глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха до глюконовой кислоты и пероксида водорода, который в присутствии пероксидазы реагирует с фенолом и 4-аминофенолом с образованием хинонимина красно-фиолетовой окраски. Оптическую плотность образцов регистрировали с помощью спектрофотометра ULAB S 108UV при 500 нм.

Сорбционную способность дрожжей, модифицированных наночастицами Fe_3O_4 , в сравнении с нативными клетками, оценивали по динамике сорбции клетками катионов меди Cu^{2+} в течение

60 минут. Определение изменения концентрации Cu^{2+} в среде, содержащей магнитомаркированные дрожжевые клетки, проводили путём измерения оптической плотности комплекса $[Cu(NH_3)_4]^{2+}$ при 590 нм.

Статистическую обработку результатов проводили, используя непараметрический критерий Манна-Уитни ($p<0.05$) в программе MS Excel. Построение графиков экспериментальных зависимостей осуществляли в программе Origin Pro 9.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для выявления влияния магнитомаркирования на каталитическую активность дрожжей было проведено сравнение динамики интенсивности гидролиза сахарозы нативными и модифицированными клетками. Известно, что большая часть фермента, осуществляющего процесс гидролиза сахарозы, в дрожжевых клетках локализована снаружи цитоплазматической мембраны. Исходя из этого, целесообразно предположить, что наличие магнитных наночастиц на поверхности клеточной стенки дрожжей может сказаться на каталитической активности этого фермента.

Оценка изменения концентрации катионов Cu^{2+} в среде, содержащей магнитомаркированные клетки, позволила детектировать влияние покрытия из магнитных наночастиц на процессы биосорбции металлов, участие в которых принимают различные химические функциональные группы, находящиеся на поверхности клеточной оболочки.

Статистический анализ результатов по образованию глюкозы исследуемыми типами клеток показал, что достоверно значимых различий между динамикой инверсии сахарозы нативными дрожжами и клетками, покрытыми Fe_3O_4 -ТМАН, не наблюдается (рис. 1). Однако, как можно заметить из представленной зависимости, клетки, модифицированные Fe_3O_4 -Cit наночастицами, более интенсивно преобразуют сахарозу в инвертный сахар. Однозначно объяснить основание этого явления без дополнительных исследований сложно. Возможной причиной такой интенсификации протекания реакции может быть активизирующее действие лимонной кислоты, стабилизирующей магнитную наночастицу, на работу β -D-фруктофуранозидазы.

Стоит также отметить, что кривые, характеризующие инверсию сахарозы дрожжевыми клетками, отличаются выходом на пологую вершину. Скорее всего, это связано с тем, что с течением

времени скорости образования глюкозы и её потребления дрожжевыми клетками уравниваются, тем самым позволяя концентрации гексозы оставаться на относительно постоянном уровне.

На рис. 2 представлены зависимости, полученные в результате экспериментов по исследованию сорбции ионов Cu^{2+} нативными и магнитомаркированными клетками.

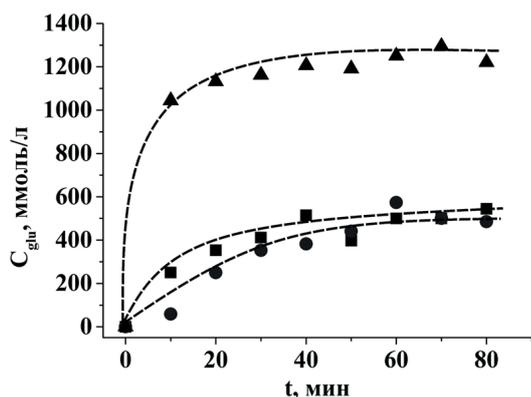


Рис. 1. Изменение концентрации глюкозы при инверсии сахарозы: ■ – нативными клетками *S. cerevisiae*; ● – клетками, модифицированными Fe_3O_4 -TMAN; ▲ – клетками, модифицированными Fe_3O_4 -Cit

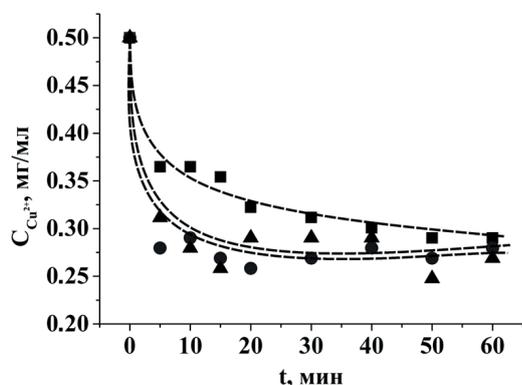


Рис. 2. Изменение концентрации ионов Cu^{2+} за счёт их сорбции: ■ – нативными клетками *S. cerevisiae*; ● – клетками, модифицированными Fe_3O_4 -TMAN; ▲ – клетками, модифицированными Fe_3O_4 -Cit

Исходя из результатов статистической обработки данных, можно говорить о том, что нет достоверно значимых различий в динамике связывания ионов меди между нативными и магнитомаркированными дрожжевыми клетками. При этом характер зависимостей свидетельствует о том, что в начальном интервале времени оба типа магнитных клеток более интенсивно сорбируют

медь. Этот факт можно объяснить тем, что магнитные наночастицы сами по себе также являются адсорбентами и способны к извлечению катионов Cu^{2+} [8]. Однако с дальнейшим протеканием процесса значения концентрации Cu^{2+} выходят на относительно одинаковый уровень для всех исследуемых типов адсорбентов.

Значения эффективности адсорбции после 60 мин контактирования для исследуемых типов клеток составили: для нативных клеток – 42 %, для дрожжей, модифицированных наночастицами Fe_3O_4 -TMAN и Fe_3O_4 -Cit – 44 % и 46 % соответственно. Представленные значения указывают на то, что магнитомаркированные клетки в некоторой мере более эффективно связывают катионы Cu^{2+} по сравнению с немодифицированными клетками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пекарские дрожжи за счёт широкой доступности и простоты в культивировании выступают в качестве привлекательных объектов магнитомаркирования, которые могут использоваться в ферментационном производстве и очистительных сооружениях.

В нашем исследовании было показано, что процедура магнитной модификации не угнетает каталитические и сорбционные свойства дрожжевых клеток. Динамика разложения сахарозы нативными и покрытыми наночастицами Fe_3O_4 -TMAN клетками не имеет статистически значимых различий. Адсорбция ионов металлов (на примере Cu^{2+}) может эффективно осуществляться, как модифицированными, так и немодифицированными дрожжевыми клетками. Ожидается, что результаты данной работы найдут применение в разработке новых методов очистки вод от ксенобиотиков и ферментационном производстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brady D. Biosorption of heavy metal cations by nonviable yeast biomass / D. Brady, A. Stoll, J.R. Duncan // *Environmental Technology*. — 1994. — №15. — P. 429–438.
2. New magnetically responsive yeast-based biosorbent for the efficient removal of water-soluble dyes / I. Safarik [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. — 2007. — №40. — P. 1551-1556.
3. Safarikova M. Ferrofluid modified *Saccharomyces cerevisiae* cells for biocatalysis / M. Safarikova, Z. Maderova, I. Safarik // *Food Research International*. — 2009. — №42. — P. 521-524.

4. Safarik I. Hydrogen peroxide removal with magnetically responsive *Saccharomyces cerevisiae* cells / I. Safarik, Z. Sabatkova, M. Safarikova // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2008. — №56. — P. 7925-7928.

5. Горобець С.В. Інтенсифікація сорбційної здатності дріжджів *S. cerevisiae* за допомогою багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування / С.В.Горобець, Ю.В.Карпенко // Электроника и связь – Тематический выпуск «Электроника и нанотехнологии». — 2009. — № 2-3. — С.191-195.

6. Effect of tetramethylammonium hydroxide on nucleation, surface modification and growth of magnetic nanoparticles / Â.L.Andrade [etal.] // Journal of Nanomaterials. — 2012. — № 2012. — P. 1-10.

7. Nigam S. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for the therapeutic applications / S. Nigam, K.C. Barick, D. Bahadur // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. — 2011. — № 323. — P. 237-243.

8. Синтез, свойства и применение магнитоуправляемых адсорбентов / С.П. Туранская [и др.] // Поверхность. — 2012. — №4 (19). — С. 266-292

Донецкий Национальный Университет

Беспалова С.В., доктор физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой биофизики

E-mail: donnu.rector@mail.ru

Тел.: +38(062)3020722

Donetsk National University

Bespalova S.V., Doctor of Physics and Mathematics), Full professor, head of Biophysics department

E-mail: donnu.rector@mail.ru

Ph.: +38(062)3020722

Легенький Ю.А., старший преподаватель кафедры биофизики

E-mail: yu-legen@mail.ru

Тел.: +38(066)1118761

Legenky Yu. A., Senior lecturer of Biophysics department

E-mail: yu-legen@mail.ru

Ph.: +38(066)1118761

Солопов М.В., студент кафедры биофизики

E-mail: mxsolopov@yandex.ru

Тел.: +38(095)6480663

Solopov M. V., student of Biophysics department

E-mail: mxsolopov@yandex.ru

Ph.: +38(095)6480663

Воронежский Государственный Университет

Холявка М.Г., кандидат биол. наук, доцент кафедры биофизики и биотехнологии

E-mail: holyavka@rambler.ru

Тел.: +7(473)2208586

Voronezh State University

Holyavka M. G., PhD (Biology), docent of Biophysics and biotechnology department

E-mail: holyavka@rambler.ru

Ph.: +7(473)2208586