

Д. О. Ляскун¹, О. М. Шульга¹, Г. Г. Мідяна¹, Н. Л. Заярнюк², Р. І. Вільданова¹

¹Відділення фізико-хімії горючих копалин
Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка
НАН України

²Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

МЕТОД ВИДІЛЕННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНОГО КОМПЛЕКСУ ШТАМУ *Pseudomonas aeruginosa* JRV-L

© Ляскун Д. О., Шульга О. М., Мідяна Г. Г., Заярнюк Н. Л., Вільданова Р. І., 2016

Для підвищення ефективності осадження рамноліпідного комплексу (РК) з супернатанту культуральної рідини (СКР) штаму *P. aeruginosa* JRV-L застосовували комплексний підхід: бактерії культивували на поживному середовищі з додаванням алюмокалієвих галунів (АГ) та без них, продукт виділяли при різних температурах (20–100 °С) і рН середовища (2,0–4,0). Встановлено, що нагрівання до 90–100 °С та підкислення до рН 2,0 СКР штаму *P. aeruginosa* JRV-L сприяє повнішому осадженню РК, а також, що склад РК, одержаного з СКР без додавання АГ, не змінюється: співвідношення рамноліпід:полісахарид (Р:П) є сталим (4:1). Внесення АГ збільшує вихід на 5–21 %, але змінює співвідношення Р:П до 3:1.

Ключові слова: біогенні поверхнево-активні речовини, рамноліпіди, полісахариди, осадження.

D. O. Lyaskun, O. M. Shulga, G. G. Midyana, N. L. Zayarnyuk, R. I. Vildanova

METHOD OF OBTAINING OF THE SURFACE-ACTIVE COMPLEX OF THE STRAIN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* JRV-L

Lyaskun D. O., Shulga O. M., Midyana G. G., Zayarnyuk N. L., Vildanova R. I., 2016

To improve of the efficiency of precipitation of the rhamnolipid complex (RC) from culture liquid supernatant (CLS) of the strain *P. aeruginosa* JRV-L an integrated approach was used: bacteria were cultivated in a nutrient medium with the addition of alum and without it, and the product was isolated at different temperatures (20–100 °C) and pH (2,0–4,0). It was established that CLS heating to 90–100 °C and acidification to pH 2.0 enhances the precipitation of RC. It was estimated that the composition of RC, obtained from the SCL without alum adding, does not change – the rhamnolipid:polysaccharide (R:P) ratio remains constant (4:1). Also it was founded that the addition of alum promotes the synthesis of RC at 5–21 %. However, the R:P ratio in the complex was changed to 3:1.

Key words: biosurfactants, rhamnolipids, polysaccharids, precipitation.

Постановка проблеми та її зв'язок з важливими науковими завданнями. Мікробні поверхнево-активні речовини (біоПАР) кілька останніх десятиліть є об'єктом інтенсивних фундаментальних і прикладних досліджень завдяки своїм фізико-хімічним і біологічним властивостям, а також екологічній безпечності. БіоПАР мають перспективи практичного застосування у різних галузях промисловості, сільському господарстві й для очищення довкілля. Однак їх широке використання лімітується високою собівартістю. Тому актуальною проблемою залишається досягнення максимального виходу ПАР та розроблення оптимальних методів їх

виділення. Існуючі методи виділення мають низку недоліків: або метод є дуже складним, що вимагає проведення кількох етапів робіт, або процес виділення є неповним, що призводить до втрати частини продукту. Всі ці недоліки у результаті підвищують вартість отриманого продукту. Тому вдосконалення методу виділення є актуальною і нагальною потребою під час розроблення технології отримання біоПАР.

Бактерії роду *Pseudomonas* є продуцентами ПАР, які можуть успішно застосовуватися у різних сучасних технологіях. У лабораторії біотехнології ВФХГК ІнФОВ НАН України вивчено фізико-хімічні властивості поверхнево-активних метаболітів бактерій *Pseudomonas aeruginosa* JRV-L – рамноліпідів та їх комплексу з позаклітинними полісахаридами.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Бактерії роду *Pseudomonas* є активними продуцентами поверхнево-активних рамноліпідів та полісахаридів [1–3]. Описано в науковій літературі сім гомологічних рамноліпідів – продуктів біосинтезу бактерій роду *P. aeruginosa* AT10 за культивування на відходах після рафінації соєвої олії [4, 5]. Всі гомологічні рамноліпіди складаються із гідрофільної “голови”, яка представлена однією або двома молекулами рамнози, і гідрофобного “хвоста” – одного або двох ланцюгів жирних кислот. Рамноліпіди можуть знизити поверхневий натяг води з 72 до 28–30 мН/м, а критична концентрація міцелоутворення (СМС) становить 5-200 мг/л залежно від типу рамноліпиду [6]. Завдяки своїм поліфункціональним властивостям біоПАР доволі поширені [1]: можуть використовуватися як для отримання нових, так і для вдосконалення існуючих препаратів для сільського господарства, косметики та медицини. У медицині їх використовують також як антимікробні агенти, антибіотики, фунгіциди, гемолітичні агенти [1, 7]. Незважаючи на інтенсивні фундаментальні і прикладні дослідження процесів біосинтезу мікробних ПАР, перспектив застосування у різних сучасних технологіях, широке впровадження цих речовин неможливе без вдосконалення методів їх виділення.

Раніше встановлено, що штам *Pseudomonas aeruginosa* JRV-L синтезує рамноліпіди і полісахарид, які у вигляді поверхнево-активного комплексу легко можна виділити підкисленням. Така концентрована форма біоПАР має низку переваг: тривале зберігання, зручність транспортування і застосування. Виділяють поверхнево-активні продукти різними методами. Так, рамноліпіди виділяють екстракцією різними розчинниками, полісахариди – спиртами, комплекс – осадженням кислотою до певних значень рН. Кожний з методів має певні недоліки, які впливають на якість продукту та на його вартість.

Виділення рамноліпідного комплексу кислотним осадженням при кімнатній температурі часто є неповним, частина комплексу не осаджується і залишається у вигляді суспензії у розчині. На цей процес може впливати температура і рН середовища, а також застосування додаткових речовин – різних неорганічних і органічних високомолекулярних сполук. Так, з підвищенням температури збільшується швидкість формування та відділення твердої фази у гетерофазній системі [8]. Також відомо, що алюмокалієві галуни використовують як хелатоутворюючий агент. Показано, що додавання алюмокалієвих галунів (АГ) у поживне середовище сприяє синтезу біоПАР завдяки стимулюванню “кворум сенсинга” [9]. З літератури відомо, що здатність алюмокалієвих галунів покращувати процеси осадження використовують у технологіях очищення води від різних забруднень.

Отже, розроблення методу отримання концентрованої форми біоПАР – біокомплексу, який складається з рамноліпідів та полісахариду, є актуальним завданням. Підбір оптимальної температури та рН середовища для виділення поверхнево-активного біокомплексу дасть змогу повністю виділяти продукт з супернатанту культуральної рідини штаму *P. aeruginosa* JRV-L.

Метою роботи є розроблення ефективного методу виділення поверхнево-активного комплексу – продукту синтезу штаму *Pseudomonas aeruginosa* JRV-L.

Експериментальна частина. Об'єктом досліджень були поверхнево-активні продукти біосинтезу культури *P. aeruginosa* JRV-L, надані німецькою фірмою “*Biotensidon GmbH*” у Відділення фізико-хімії ГК ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України.

Культивували продуцент у колбах Ерленмейера (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) за температури 30°C на рідкому поживному середовищі (г/л) такого складу: NaNO₃ – 4,0; K₂HPO₄×3H₂O – 2,0; KH₂PO₄ – 1,2; MgSO₄×7H₂O – 0,5; цитрат Na – 2,0. Джерело вуглецю – гліцерин – 20 г/л. Термін культивування – 5 діб.

Поверхнево-активний біокомплекс виділяли з супернатанту культуральної рідини кислотним осадженням (10 % розчином HCl) за рН 3,0. Отриманий осад витримували 12 год при 4 °С, відділяли центрифугуванням (8000 об/хв, 20 хв) і сушили під вакуумом до постійної маси.

Рамноліпіди виділяли екстракцією з біокомплексу сумішшю Фолча (хлороформ:метанол – 2:1) з подальшим упарюванням екстракту під вакуумом [10].

Вміст полісахаридів визначали за методом Дюбої [11].

Поверхневий натяг та критичне міцелярне розведення культуральної рідини визначали за методом [12] з платиновою пластинкою Вільгельмі.

Якісний аналіз ліпідів здійснювали за методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) з використанням пластинок Silufol (Kavalier, Чехія), рухома фаза хлороформ:метанол:ацетон:оцтова кислота (90:10:6:1). Візуалізацію хроматограм проводили 5 % спиртовим розчином фосфорномолібденової кислоти (загальні ліпіди) та орціновим реагентом (рамноліпіди) [13].

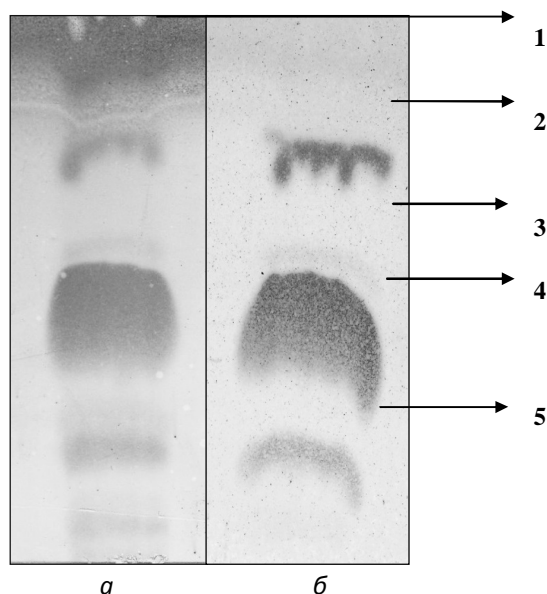
Для статистичного аналізу достовірності експериментальних даних використовували методи варіаційної статистики [14].

Результати досліджень та їх обговорення. Культура *P. aeruginosa* JRV-L є ефективним продуцентом поверхнево-активних рамноліпідних речовин.

Аналіз органічного екстракту супернатанту культуральної рідини *P. aeruginosa* JRV-L методом ТШХ показав наявність жирних кислот, моно-, ди-, тригліцеридів, полярних гліколіпідів. Відносний вміст гліколіпідів (рамноліпідів *RL-1* і *RL-2*) значно перевищує кількість інших компонентів ліпідного екстракту (до 80–90 % від загальної кількості ліпідів). У процесі росту штаму *P. aeruginosa* JRV-L у культуральній рідині накопичується також позаклітинний біополімер – полісахарид альгінатної природи.

На рисунку зображено хроматограми ліпідних екстрактів супернатантів культуральної рідини штаму *P. aeruginosa* JRV-L, отриманих при культивуванні в колбах. Наявність у цих екстрактах гліколіпідів (рамноліпідів) підтверджується специфічним забарвленням хроматограм орціновим реактивом (Б).

Хроматограми препаратів рамноліпідів штаму *P. aeruginosa* JRV-L при культивуванні на колбах: А – забарвлення загальних ліпідів фосфорномолібденовим реагентом; Б – забарвлення гліколіпідів орціновим реактивом. Система розчинників: хлороформ: метанол: оцтова кислота (65: 15: 4); 1 – жирні кислоти; 2, 3, 4, 5 – різні форми рамноліпідів



Загальний вміст гліколіпідів штаму *P. aeruginosa* JRV-L (різні форми рамноліпідів – зони 2, 3, 4, 5 на хроматограмах) становить понад 90 % від загального вмісту ліпідів. У ліпідному екстракті переважає дирамноліпід (зона 4). Дирамноліпід становить до 80 % від усіх рамноліпідів штаму *P. aeruginosa* JRV-L. Він є найактивнішою сполукою як щодо фізико-хімічних властивостей (низькі значення поверхневого і міжфазного натягу, низьке значення ККМ, висока емульгуюча активність), так і біологічних властивостей порівняно з іншими рамноліпідами.

Нами раніше встановлено, що рамноліпіди і полісахарид у культуральній рідині утворюють поверхнево-активний комплекс, який легко можна виділити підкисленням [9].

Цей біокомплекс проявляє високу поверхневу активність. Його концентрована форма, можливість тривалого зберігання, зручність у транспортуванні і застосуванні надає переваги саме для такого виду поверхнево-активного продукту.

Рамноліпідний біокомплекс також можна використовувати для одержання рамноліпідів - високоефективних ПАР, які знайдуть застосування у біомедицині, фармації, косметичі, ветеринарних препаратах тощо.

Отриманий розчин – гетерофазна система, в якій вода є дисперсним середовищем, а маса утвореного та розподіленого у воді біокомплексу у вигляді невеликих кристалів – дисперсною фазою. Завдяки великій питомій поверхні ці частинки володіють значною поверхневою енергією і відповідно високою адсорбційною здатністю. Ці характеристики мають велике значення для процесу коагуляції, що відбувається при виділенні отриманого біокомплексу. Для інтенсифікації цього процесу застосовують різні речовини – флокулянти – неорганічні і органічні високомолекулярні сполуки [15, 16]. Відомо, що алюмокалієві галуни використовують як хелатор-утворюючий агент [16, 17]. Нами раніше показано, що додавання алюмокалієвих галунів (АГ) у поживне середовище стимулює синтез біоПАР за рахунок стимулювання “кворум сенсинга” [9].

На процес коагуляції впливає рН середовища і співвідношення полімер-ПАР, а також температура, з підвищенням якої збільшується швидкість формування та відділення твердої фази [18]. Тому з метою підвищення ефективності осадження рамноліпідного комплексу застосовували комплексний підхід: бактерії культивували на поживному середовищі з додаванням АГ та без них, а також виділяли поверхнево-активний продукт при різних температурах (20–100 °С) і рН середовища (2,0–4,0). Дані експерименту наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Вплив температури та рН середовища на процес виділення біокомплексу штаму *P. aeruginosa* JRV-L

Температура, °С	рН середовища	Кількість біокомплексу, г/л	
		Поживне середовище без АГ	Поживне середовище з АГ
1	2	3	4
20	2,0	8,76	9,50
	2,5	8,13	9,25
	3,0	8,38	8,98
	3,5	6,93	8,05
	4,0	6,56	7,15
30	2,0	8,83	9,86
	2,5	8,67	9,65
	3,0	7,04	9,13
	3,5	6,47	9,04
	4,0	6,09	8,99
40	2,0	8,98	10,93
	2,5	8,86	10,69
	3,0	7,74	9,94
	3,5	7,67	9,16
	4,0	7,60	8,64

Продовження табл. 1

1	2	3	4
50	2,0	9,14	10,91
	2,5	8,71	10,47
	3,0	8,50	10,27
	3,5	8,40	9,29
	4,0	6,60	9,32
60	2,0	9,21	10,98
	2,5	9,18	10,79
	3,0	8,93	10,28
	3,5	8,12	10,18
	4,0	7,67	9,81
70	2,0	9,47	11,47
	2,5	9,03	11,22
	3,0	8,88	11,15
	3,5	8,82	10,63
	4,0	6,76	9,64
80	2,0	10,30	11,51
	2,5	9,73	11,43
	3,0	9,20	10,67
	3,5	8,63	9,54
	4,0	6,78	9,02
90	2,0	10,50	11,63
	2,5	9,54	11,61
	3,0	8,66	11,20
	3,5	6,81	9,68
	4,0	6,59	9,24
100	2,0	11,00	11,60
	2,5	10,23	11,57
	3,0	9,53	10,59
	3,5	8,82	10,35
	4,0	6,68	9,64

Встановлено, що нагрівання супернатанту культуральної рідини штаму *P. aeruginosa* JRV-L до 90–100 °С сприяє більш повному осадженню біокомплексу: на 26 % більше при культивуванні на поживному середовищі без АГ, та на 21 % більше – на поживному середовищі з АГ порівняно з температурою 20 °С. Також встановлено, що підкислення СКР рідини штаму *P. aeruginosa* JRV-L до рН 2,0 сприяє більш повному виділенню біокомплексу, ніж при інших досліджуваних значеннях рН середовища.

Встановлено, що склад рамноліпідного біокомплексу, отриманого з СКР без додавання АГ, не змінюється при нагріванні супернатантів культуральних рідин штаму *P. aeruginosa* JRV-L від 20 °С до 100 °С: співвідношення рамноліпід:полісахарид залишається сталим 75–80:25–20 % (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив температури та рН середовища на співвідношення рамноліпід:полісахарид у біокомплексі штаму *P. aeruginosa* JRV-L

Температура, °С	рН середовища	Співвідношення рамноліпід:полісахарид	
		Поживне середовище без АГ	Поживне середовище з АГ
20	2,0	4:1	6:1
30	2,0	4:1	6:1
40	2,0	4:1	6:1
50	2,0	4:1	5:1
60	2,0	4:1	5:1
70	2,0	4:1	4:1
80	2,0	4:1	3:1
90	2,0	4:1	3:1
100	2,0	4:1	3:1

Також встановлено, що внесення АГ у поживне середовище сприяє синтезу біокомплексу та його виділенню на 5–21 % більше, ніж за культивування без АК.

Проте встановлено, що склад рамноліпідного біокомплексу, який виділяли з СКР з АГ, змінюється при нагріванні від 20 до 100 °С. Дані наведено у табл. 2.

Показано, що внесення АГ до поживного середовища, на якому культивували штам *P. aeruginosa* JRV-L, змінює співвідношення рамноліпід:полісахарид у біокомплексі – полісахариду виділяється більше, ніж рамноліпідів. Можливо, АГ сприяють виділенню полісахариду, зв'язуються з ним та конкурують з рамноліпідами і не дають їм осідати при виділенні з полісахаридами.

Отже, для отримання біокомплексу штаму *P. aeruginosa* JRV-L необхідно вирощувати штам без АГ, а процес виділення проводити при температурі 90 °С і рН 2,0–3,0.

Висновки. Встановлено, що внесення алюмокалієвих галунів до поживного середовища сприяє синтезу рамноліпідного комплексу досліджуваним штамом. Підібрано оптимальні умови виділення поверхнево-активного біокомплексу з супернатанту культуральної рідини штаму *P. aeruginosa* JRV-L: температура – 90°С та рН 2,0-3,0.

1. Desai J. D., Banat I. M. *Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 1997. – Vol. 61, No. 1. – P. 47–64.
2. Banat I. M., Makkar R. S., Cameotra S. S. *Potential commercial applications of microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 53. – P. 495–508.
3. Sim L., Ward O. P., Li Zy. *Production and characterization of a biosurfactant isolated from Pseudomonas aeruginosa UW-1 // J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – Vol. 19. – P. 232–238.
4. Wagner F. *Strategies for biosurfactant production // Fat. Sci. Technol.* – 1987. – P. 586–591.
5. Abalos A., Pinazo A., Infante M. R. et al. *Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipid produced by Pseudomonas aeruginosa AT10 from soybean oil refinery wastes // Langmuir.* – 2001. – Vol. 17, No. 5. – P. 1367–1371.
6. Finnerty, W.R., *Biosurfactants in environmental biotechnology. Current Opinion in Biotechnology* 1994. 5, 291–295.
7. Gutnick D. L., Minas W. *Perspectives on microbial surfactants // Biochemical Society Transactions.* – 1987. – Vol. 15. – P. 22S–35S.
8. Запольский А. К. *Коагулянты и флокулянты в процессах очистки воды: Свойства. Получение. Применение / Запольский А. К., Баран А. А. – П.: Химия, 1987. – 208 с.*
9. Шульга О. М., Пристай М. В., Карпенко І. В., Щеглова Н. С., Вільданова Р. І. *Вплив алюмокалієвих галунів на синтез мікробних поверхнево-активних сполук. Мікробіологія і біотехнологія.* 2014. – № 1. – С. 85–93.
10. Sutherland I. W. *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework // Microbiology.* – 2001. – Vol. 147. – P. 3–9.
11. M. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith. *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances // Anal. Chem.*, 1956, 28 (3), P. 350–356.
12. Абрамзон А. А., Зайченко Л. П., Райнгольд С. И. *Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение. – Л.: Химия, 1987. – 200 с.*
13. Ando S., Saito M. *Chromatography lipid, biomedical research and chemical diagnostic. – Elsevier.: Amsterdames, 1987. – P. 266–310.*
14. Лакин А. Н. *Курс вариационной статистики. / А. Н. Лакин. – К.: Вища шк., 1990. – 116 с.*
15. Запольский А.К., Баран А. А. *Коагулянты и флокулянты в процессах очистки воды. – Л.: Химия, 1987. – 208 с.*
16. Драгинский В. Л. *Коагуляция в технологии очистки природных вод / В. Л. Драгинский, Л. П. Алексеева, С. В. Гетманцев. – М., 2005. – 576 с.*
17. Драгинский В. Л. *Особенности применения коагулянтов для очистки природных цветных вод / В. Л. Драгинский, Л. П. Алексеева // Водоснабжение и санитарная техника. – 2008. – № 1. – С. 9–15.*
18. Стерман Л. С., Покровский В. Н. *Физические и химические методы обработки воды на ТЭС / под ред. Н. Н. Сошникова. – М.: Энергоатомиздат, 1991. – С. 37–53. – 328 с.*