

Т. Я. Покинсьброда¹, Т. П. Пирог², О. В. Карпенко¹, М. В. Пристай, Л. Д. Болібрех³

¹Відділення фізико-хімії горючих копалин

Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України

²Національний університет харчових технологій

³Національний університет “Львівська політехніка”,

кафедра технології біологічно активних сполук, фармацевції та біотехнології

СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ШТАМОМ *PSEUDOMONAS SP. PS-17* НА ЗМІШАНИХ СУБСТРАТАХ

© Покинсьброда Т. Я., Пирог Т. П., Карпенко О. В., Пристай М. В., Болібрех Л. Д., 2016

Встановлено ефективність застосування змішаних джерел вуглецю – гексадекан з гліцерином у співвідношенні 1:6 для синтезу поверхнево-активних речовин (біоПАР) штамом *Pseudomonas sp. PS-17*, що дало змогу підвищити показники синтезу ПАР та скоротити процес культивування. Доведено, що додавання у середовище росту штаму *Pseudomonas sp. PS-17* рамноліпідів та глауконіту має стимулювальний вплив на синтез ПАР. Показано, що рамноліпідні ПАР є ефективними емульгаторами гідрофобних речовин, тобто можуть використовуватись на заміну синтетичним у екологічно безпечних технологіях.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, рамноліпіди, змішані субстрати, емульгування, глауконіт.

T. Ya. Pokynbroda, T. P. Pirog, A. V. Karpenko, M. V. Prystay, L. D. Bolibrukh

SURFACTANTS SYNTHESIS BY THE STRAIN *PSEUDOMONAS SP. PS-17* ON MIXED SUBSTRATES

© Pokynbroda T. Ya., Pirog T. P., Karpenko A. V., Prystay M. V., Bolibrukh L. D., 2016

Efficiency of using mixed sources of carbon – hexadecane with glycerol in a ratio of 1:6 for a synthesis of surfactants (biosurfactants) by the strain of *Pseudomonas sp. PS-17* was established, thus allowed to improve parameters of surfactant production and to shorten the process of cultivation. It was proved that the addition of rhamnolipids and gluconite to a growth medium of the strain *Pseudomonas sp. PS-17* has a stimulating effect on the synthesis of surfactants. It was shown that rhamnolipid surfactants are effective emulsifiers of hydrophobic substances that can be used to replace synthetic ones in environmentally friendly technologies.

Key words: surfactants, rhamnolipids, mixed substrates, emulsification, gluconite.

Постановка проблеми і її зв'язок з важливими науковими завданнями. Для сучасної біотехнології важливим завданням є розроблення технологій продуктів, найперспективніших для практичного використання. Відомо, що у багатьох галузях економіки значне місце займають різноманітні поверхнево-активні речовини (ПАР), що пояснюється їх особливими властивостями: здатністю до емульгування гідрофобних речовин, зниження поверхневого натягу розчинів, піноутворення, вплив на процеси змочування. Проте синтетичні ПАР негативно діють на природне середовище, через що посилюється попит на безпечні для довкілля продукти. Визнано, що найперспективнішими є ПАР мікробного походження (біоПАР), переваги яких: ефективність дії, а також низька токсичність, деградабельність у природних умовах, стійкість при різних температурах,

pH, вмісті солей, здатність до регулювання проникності клітинних мембран, активності різних ферментів тощо.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Мікроорганізми здатні засвоювати широкий спектр джерел вуглецю – як гідрофільних, так і гідрофобних. Проте на середовищах з моносубстратами не завжди вдається досягти бажаного виходу продуктів. Теоретичною основою та обґрунтуванням доцільності досліджень, спрямованих на збільшення показників синтезу біоПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на суміші джерел вуглецю та енергії, є концепція “допоміжного” субстрату Бабеля [1] щодо збільшення синтезу біомаси та роботи Пирог і співавторів [2–5], що засвідчують можливість інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів на прикладі екзополісахариду етаполану, що синтезується *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-724 [3] та мікробних ПАР-продуктів *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 [2]. Також показано, що синтез ПАР *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 збільшується удвічі при використанні як змішаних субстратів технічного гліцерину та м'яса [4]. У роботах іноземних авторів теж багато даних про стимуляцію синтезу поверхнево-активних речовин на сумішах джерел вуглецю та енергії [5]. Так, показано, що культивування дріжджів *Pseudozyma* – продуцентів манозилеритролліпідів – на рослинній олії з додаванням манози, еритролу чи глюкози стимулювало вихід продукту. Синтез ПАР штамом *Rhodococcus* sp. МТСС 2574 на манітолі з гексадеканом збільшувався в 3,4 рази [5]. При культивуванні *Brevibacterium aureum* MSA13 на м'ясі з оливковою олією кількість бревіфактину збільшувалась на 40 %, а при рості *Candida lipolytica* UCP 0988 на олії канола та глюкозі вихід софорозоліпідів становив 8 г/л [5]. Також показано, що при рості *P. aeruginosa* SP4 на пальмовій олії з глюкозою найефективніше синтез ПАР проходив при співвідношенні субстратів 40:1 [5].

Дослідження впливу ПАР на метаболізм мікроорганізмів цікаві як з наукового, так і практичного погляду – для стимуляції процесів біосинтезу, інтенсифікації росту або засвоєння гідрофобних субстратів. Так, при культивуванні *P. aeruginosa* в анаеробних умовах додавання рамноліпідів стимулювало засвоєння пальмітинової та стеаринової кислот [6], також у присутності попередника зросло споживання пересмаженої олії як субстрату штамом *P. aeruginosa* EBN-8 [7]. Також представляє інтерес вплив сорбентів, а саме можливість стимуляції вискодисперсними матеріалами фізіологічної активності бактерій внаслідок просторового зближення клітини з субстратом, стабілізації pH середовища або збільшення масоперенесення кисню у культуральній рідині [8]. У попередніх наших роботах показано стимуляцію ростової активності та синтезу полісахаридів ризобіальними бактеріями при культивуванні на середовищі із глауконітом [9]. Отже, на підставі літературних даних цікаво було дослідити біосинтез ПАР штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 із застосуванням змішаних ростових субстратів, а також у присутності рамноліпідів та глауконіту.

Метою роботи є дослідження синтезу поверхнево-активних речовин (біоПАР) штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на суміші джерел вуглецю та енергії, а також вивчення впливу цих ПАР на біосинтез рамноліпідів та можливості стимуляції вискодисперсними матеріалами фізіологічної активності бактерій.

Експериментальна частина. Для досліджень використовували бактеріальний штам *Pseudomonas* sp. PS-17 – продуцент позаклітинних поверхнево-активних речовин (ПАР) з колекції мікроорганізмів Відділення ФХГК ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України (Реєстраційний номер у Депозитарії IMB ім. Д. К. Заболотного *Pseudomonas* sp. IMB B-7434). Культивування проводили на поживному середовищі (г/л): джерело вуглецю – 2 %, натрій цитрат – 4,0; NaNO₃ – 3,0; K₂HPO₄×3H₂O – 2,0; KH₂PO₄ – 1,2; MgSO₄×7H₂O – 0,5; дистильована вода – до 1 л, pH 6,8-7,0.

Як джерело вуглецю та енергії використовували моносубстрати гексадекан (1 %), гліцерин, олію соняшникову, етанол, глюкозу у концентраціях 2 %, а також суміші гексадекану і гліцерину (1:2, 1:4, 1:6), гексадекану і глюкози (1:1), олії з гліцерином (1:2), етанолу з глюкозою (1:1). Концентрація змішаних субстратів становила 2 %.

Культивування проводили у колбах Ерленмейера (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (WL-2000, JV Electronic, Poland), 180 об/хв, за температури 30°C. Як інокулянт використовували 24-годинну культуру (титр клітин 2×10^8 кл/мл) у кількості 10 % від об'єму поживного середовища такого ж складу з гліцирином як джерелом вуглецю та енергії.

Для визначення впливу ПАР на синтез біомаси та продуктів у поживне середовище додавали 0,1 або 0,05 г/л рамноліпідів. Глауконіт додавали у кількості 0,5 г/л. Інгібуючу концентрацію рамноліпідів вивчали методом заливки блоку в агаровій пластинці [10]. Рамноліпідний біокомплекс (РБК) виділяли із супернатанту культуральної рідини (СКР) осадженням 10 % розчином HCl за рН 3,0, осад витримували 12 год при 4°C, відділяли центрифугуванням (8000 об/хв, 20 хв). Поверхневий натяг (ПН) визначали методом Дю–Нуї за допомогою платинового кільця на тензіометрі KRÜSS K6 (“KRÜSS” GmbH, Germany) [11]. Індекс емульгування СКР (E_{24}) визначали з вазеліновою оливою та іншими модельними вуглеводнями [12]. Концентрацію рамноліпідів (РЛ) у СКР визначали після їх екстракції сумішшю хлороформ-ізопропанол (2:1) орциновим методом на спектрофотометрі Shimadzu-1250UV (Shimadzu, Japan) за рамнозним еквівалентом (РЕ) [13].

Виклад основного матеріалу і обговорення результатів. Проаналізовано синтез ПАР штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищах з різними джерелами вуглецю та їх сумішами: гексадекан з гліцирином, гексадекан з глюкозою, олія з гліцирином, етанол з глюкозою (табл. 1).

Таблиця 1

Показники синтезу ПАР за умов росту *Pseudomonas* sp. PS-17 на моносубстратах і змішаних субстратах

Субстрат	АСБ, г/л	РБК, г/л	РЕ, г/л	E_{24} , %	ПН, σ, мН/м	Синтезувальна здатність, г РЕ/г АСБ
Гліцерин	3,5	5,1	4,1	55	28,4	1,17
Гексадекан	1,8	2,2	0,7	50	31,2	0,38
Олія	1,8	4,8	3,05	56	29,3	1,25
Глюкоза	2,3	3,5	2,8	50	31,7	1,21
Спирт етиловий	1,1	1,7	1,3	30	35,0	1,18
Гексадекан+ глюкоза (1:1)	3,2	2,8	3,5	44	31,2	1,10
Олія+гліцерин (1:2)	2,5	4,8	4,2	30	29,8	1,65
етанол+глюкоза (1:1)	1,5	1,6	0,5	32	39,7	0,33
Гексадекан+ гліцерин (1:2)	3,5	4,7	4,05	50	30,3	1,15
Гексадекан+ гліцерин (1:4)	3,0	5,9	3,3	45	30,3	1,10
Гексадекан+ гліцерин (1:6)	1,7	8,8	5,3	51	29,3	3,12

Синтезувальна здатність культури на середовищах з моносубстратами коливалася від 0,38 г/г при рості на гексадекані до 1,25 г/г – на олії як джерелах вуглецю, а при використанні дисубстратів – від 0,33 г/г (етанол з глюкозою) до 3,12 г/г (гексадекан з гліцирином 1:6), отже, середня продуктивність на середовищах із сумішами субстратів була у 1,4 рази вищою порівняно з відповідними моносубстратами.

Найкращий ефект від застосування змішаних субстратів помічено на поживних середовищах з гексадеканом і гліцирином. Так, при співвідношенні гексадекан – гліцерин 1:4 вміст рамноліпідного біокомплексу зростав у 1,16 разу порівняно з самим гліцирином та у 2,7 разу щодо гексадекану. При співвідношенні субстратів 1:6 кількість РБК збільшувалась у 1,74 разу порівняно з гліцирином та практично у 4 рази – з гексадеканом. На середовищах із дисубстратами гексадекан-глюкоза вміст

рамноліпідів збільшувався в 1,25 разу порівняно з глюкозою та в у 5 разів – з гексадеканом, а при використанні гексадекану з гліцерином (1:6) цей показник зростав у 1,3 разу порівняно з гліцерином та у 7,5 разу – з гексадеканом. У інших варіантах експерименту із застосуванням дисубстратів ефект збільшення синтезу ПАР був відсутній, а у деяких варіантах їх кількість навіть дещо зменшувалася (олія – гліцерин (1:2) та етанол – глюкоза (1:1)).

При культивуванні *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищах із сумішами олії з гліцерином та етанолу з глюкозою кількості синтезованого РБК суттєво не змінювалися порівняно з монособстратами; показники індексу емульгування супернатанту культуральної рідини практично у всіх варіантах були в межах 50 %, окрім вирощених на етанолі та сумішах олії з гліцерином й етанолу з глюкозою. Ефективне зниження поверхневого натягу СКР зазначено у більшості варіантів, окрім етанолу та етанолу з глюкозою як джерел вуглецю.

Це узгоджується з літературними даними про те, що ефективність синтезу поверхнево-активних речовин на змішаних субстратах залежить не тільки від обраних джерел вуглецю, але й від їх співвідношення у середовищі росту [5].

Отже, застосування змішаних субстратів є перспективним підходом для інтенсифікації синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17, причому найефективнішим є застосування сумішей гексадекану з гліцерином у співвідношенні 1:6.

Проаналізовано динаміку росту та синтезу ПАР при вирощуванні на середовищах із сумішами гексадекану та гліцерину у співвідношеннях 1:2, 1:4 та 1:6 у порівнянні відповідними монособстратами (рис. 1, 2). Як свідчать результати, показники синтезу рамноліпідного біокомплексу досягали максимуму через 96 год ферментації в усіх експериментальних варіантах (крім середовища з гексадеканом), причому на гексадекані з гліцерином (1:6) вміст синтезованого РБК був найбільшим і становив 8,8 г/л (рис. 1).

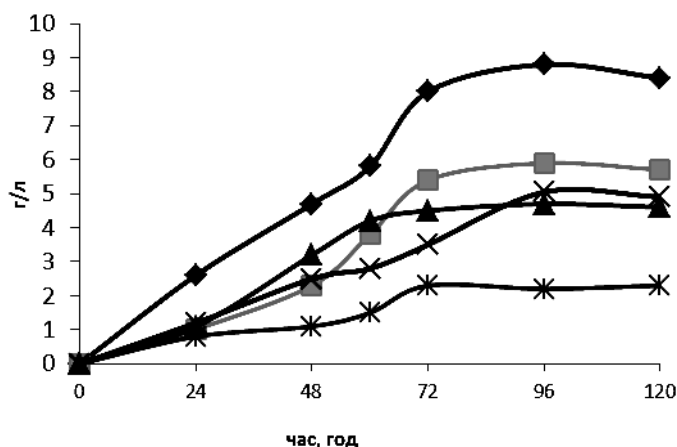


Рис. 1. Синтез РБК штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищах з різними джерелами вуглецю (◆ – гексадекан та гліцерин 1:6, ■ – гексадекан та гліцерин 1:4, ▲ – гексадекан та гліцерин 1:2, × – гліцерин, * – гексадекан)

Показано, що синтез рамноліпідів (рис. 2) розпочинався із лог-фази, найбільшу їх кількість (за показником рамноліпідного еквіваленту) було зазначено на 4 добу процесу культивування при використанні як гексадекану, так і гексадекану з гліцерином (1:6): було отримано 5,3 г/л рамноліпідів (за РЕ).

Наведені результати свідчать, що використання змішаних ростових субстратів є перспективним напрямком для розроблення технології синтезу рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, причому оптимальні показники отримано на суміші гексадекану з гліцерином (1:6). Технологічними й економічними перевагами такого підходу є скорочення тривалості процесу мікробного синтезу, високими показниками вмісту продуктів – 4,9 г/л рамнози (РЕ) та 8 г/л рамноліпідного біокомплексу – до 4 доби.

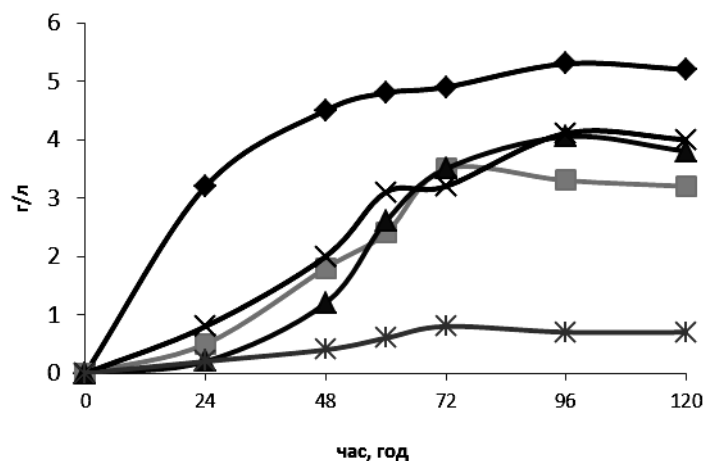


Рис. 2. Синтез рамноліпідів (за РЕ) штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищах з різними джерелами вуглецю (◆ – гексадекан та гліцерин у співвідношенні 1:6, ■ – гексадекан та гліцерин у співвідношенні 1:4, ▲ – гексадекан та гліцерин у співвідношенні 1:2, × – гліцерин, * – гексадекан)

Досліджено також ефективність додавання рамноліпідів та мінералу глауконіту у поживне середовище при культивуванні *Pseudomonas* sp. PS-17 на кількість ПАР, що представляє інтерес як з наукового, так і практичного аспектів для можливої стимуляції біосинтезу різних сполук. Попередньо було визначено інгібувальну концентрацію рамноліпідів на ріст дослідного штаму, оскільки відомо, що поверхнево-активним речовинам (у певних кількостях) притаманні протимікробні властивості. Показано, що РЛ у діапазоні концентрацій 0,001–1 г/л не інгібують ріст цього штаму, отже, було використано їх концентрації 0,1 і 0,05 г/л, як джерела вуглецю застосовано гексадекан, гліцерин, суміш гексадекану з гліцерином (1:6, 1:4, 1:2). Визначено, що для культури *Pseudomonas* sp. PS-17 показники синтезу ПАР практично не залежать від кількості доданих РЛ. Індокси емульгування у всіх варіантах, крім гексадекану з РЛ, коливались в межах 38–55 %. Збільшення кількості ПАР при додаванні РЛ у 1,15 рази зафіксовано на середовищі з гексадеканом і гліцерином 1:4, проте вміст РБК підвищувався у 1,8–2,5 рази майже у всіх варіантах з додаванням РЛ, окрім середовища з гексадеканом (рис. 3).

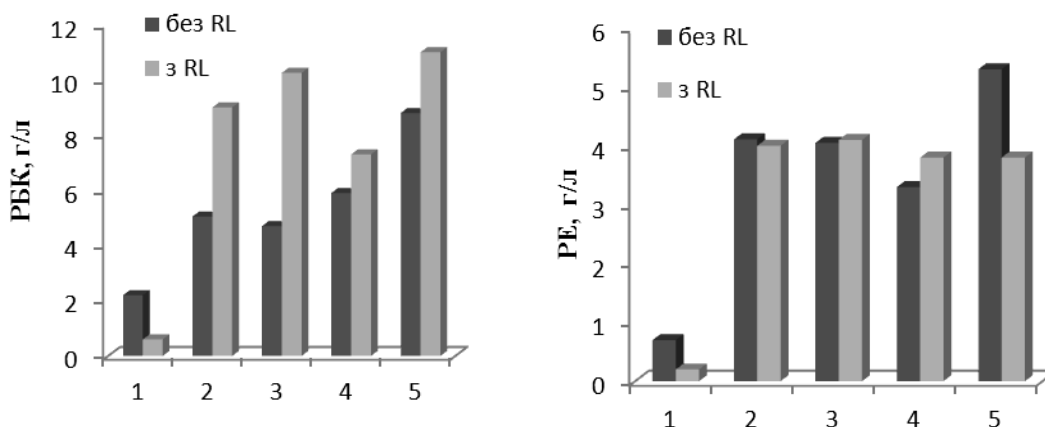


Рис. 3. Вплив рамноліпідів на синтез РБК (а) та рамноліпідів (за РЕ) (б) (1 – середовище з гексадеканом, 2 – з гліцерином, 3 – гексадекан і гліцерин (1:2), 4 – гексадекан і гліцерин (1:4), 5 – гексадекан і гліцерин (1:6))

Показано, що додавання РЛ ефективно стимулювало синтез рамноліпідного біокомплексу, особливо при культивуванні *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищі з гексадеканом і гліцерином (1:6) з внесенням РЛ (0,05 г/л) у середовище – одержано 12,1 г/л РБК (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив рамноліпідів та глауконіту на синтез поверхнево-активних продуктів *Pseudomonas* sp. PS-17 на суміші гексадекану з гліцерином у співвідношенні 1:6

Варіант	Біомаса, г/л	РБК, г/л	РЕ, г/л	Індекс емульгування, E ₂₄	Поверхневий натяг, σ, мН/м	ПАР-синтезувальна здатність, г рамнози /г біомаси
Контроль	1,7	8,80	5,30	51	29,3	3,12
+0,005 % RL	2,0	12,10	4,18	46	33,5	2,10
+0,01 % RL	2,7	10,30	3,50	45	32,6	1,30
+0,05 % глауконіту	2,6	0,70	0,13	52	32,6	0,05
+0,005 % RL+ 0,05 % глауконіту	2,9	0,90	0,13	55	32,6	0,05
+0,01 % RL+ 0,05 % глауконіту	2,7	0,8	0,13	54	32,64	0,05

Ймовірно, що внесення рамноліпідів на початку культивування продуценту сприяє підвищенню активності ферментної системи, кращому засвоєнню субстрату та активізує утворення РБК, а також рамноліпіди, можуть стимулювати ріст мікроорганізмів, збільшуючи біодоступність гідрофобних субстратів шляхом утворення міцел й транспорту їх у клітини [14].

При дослідженні впливу сорбенту глауконіту (0,05 %) було зазначено незначне підвищення емульгувальної активності отриманих супернатантів культуральної рідини, а кількість біомаси збільшувалась на 50–70 % порівняно з контролем (табл. 2). Це можна пояснити тим, що глауконіт здатний сорбувати метаболіти, що інгібують ріст клітин (біомасу), але, ймовірно, частково сорбує й поверхнево-активні продукти – рамноліпіди, які теж є вторинними метаболітами [15].

Встановлено здатність СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 до емульгування цілої низки гідрофобних речовин: мастила А1, бензолу, гексадекану, циклогексанолу, вазелінової оливи, нафти та соняшникової олії. Найбільш стабільними в часі були емульсії бензол-СКР (2 місяці) та соняшникова олія-СКР (3 тижні).

Висновки. Встановлено ефективність застосування змішаних субстратів гліцерин з гексадеканом у співвідношенні 1:6 для інтенсифікації синтезу ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. Доведено також можливість стимулювання мікробного синтезу рамноліпідного біокомплексу при додаванні рамноліпідів за концентрації 0,05 г/л у середовище росту при культивуванні цього штаму. При введенні у поживне середовищі глинистого мінералу глауконіту біомаса зростала на 50–70 %. Показано, що отримані супернатанти культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 – природні розчини ПАР – є ефективними емульгаторами низки гідрофобних речовин; вони утворюють стабільні емульсії типу “олія у воді”, що свідчить про перспективу їх використання як екологічно безпечних ПАР у промисловості, сільському господарстві, медицині, очищення довкілля.

1. Babel W. Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics / W Babel, M. H. Muller // J. Gen. Microbiol. – 1985. – 131.#1. – P. 39–45. 2. Кудря Н. Особливості синтезу ПАР *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на суміші ростових субстратів / Н. Кудря, Т. Пирог // Ukrainian food journal. – 2013. – № 2. – С. 203–209. 3. Пирог Т. П. Інтенсифікація синтезу ПАВ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-724 на суміші гексадекана і глюкози / Т. П. Пирог, А. Д. Конон,

Т. А. Шевчук, И. В. Билец // Микробиология. – 2012. – 8. – № 5. – С. 611–618. 4. Пирог Т. П. Биоконверсия смеси технического глицерина и мелассы в ПАР *Nocardia vaccinii* ИМВ-7405 / Т. П. Пирог, Н. В. Кудря, Т. А. Шевчук, К. А. Береговая, Г. А. Иутинская // Микробиол. Журнал. – 2015. – Т.77 – № 3. – С. 28–35. 5. Пирог Т. П. Змішані субстрати у природних умовах і біотехнологічних процесах / Т. П. Пирог, М. О. Шуляков, Т. А. Шевчук // *Biotechnologia acta*. – Vol. 6. – № 6. – 2013. – С. 28–44.6. Chayabutra С. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. / С. Chayabutra, J. Wu, L. K. Ju // *Biotechnol Bioeng* – 2001 Jan 5–72 (1) – P. 25–33. 7. Koch. А. К. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. / А К Koch, О Käppeli, А Fiechter, J Reiser // *J Bacteriol*. – 1991 Jul – 173 – P. 4212–9. 8. Патент 14654 А Украина, МКИ 4 С12 N 1/02. Спосіб одержання сухих бактеріальних препаратів/ Курдиш І. К., Криснобрижсий М. Я., Гордієнко А. С. Опубл. 20.02.1997. 9. Щеглова Н. С. Вплив біогенних поверхнево-активних речовин на формування симбіозу *Synorhizobium meliloti* з люцерною / Н. С. Щеглова, О. В. Карпенко, Р. І. Вільданова, М. В. Пристай, Н. Ю. Лісова, Т. М. Ногіна // Микробиологія і біотехнологія. – 2011. – № 1. – С.48–56. 10. Сеги Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сеги. – М.: Колос, 1983. – 296 с. 11. Абрамзон А. А. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение. А. А. Абрамзон, Л. П. Зайченко, С. И. Райнгольд – Л.: Химия, 1988. – 200 с. 12. Кучер Р. В. Емульгування вуглеводнів – нова властивість культури дріжджів *Phaffia rhodozута*. / Р. В. Кучер, О. Ю Лесик, О. В. Карпенко // Доп. АН УРСР. Сер.Б. Геол., хім. та біол. науки. – 1990 – № 8 – С.49–53. 13. Ando S. Chromatography lipid, biomedical research and chemical diagnostic. / S. Ando, M. Saito//Elsevier.: Amsterdames, 1987. – P. 266–310.14. Van Hamme J. D. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology / J. D. Van Hamme, A. Singh, O. P. Ward // *Biotechnology Advances*. – 2006. – Vol. 24. – P. 604 – 620. 15. Курдиш И. К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства / И. К. Курдиш. – К.: Наука и практика, 2001. – 142 с.