

5. S-етилловий естер 4-(3-толїлуреїдо)-фенїлтіосульфокислоти (5в). До розчину 1.35 г (0.0062 моль) етилтіосульфанїлату (4) в 50 мл сухого бензолу додавали 0.83 г (0.0062 моль) м-толуолїзоціанату (2в) при температурі 20 °С та інтенсивному пермішуванні. Реакційну масу витримували протягом 5 годин при 70 °С, а потім при 20 °С протягом 14 діб. Осад відфільтровували, сушили на повітрі і очищали перекристалізацією з бензолу. Вихід продукту 1.5 г.

6. Ди-[4-етилсульфонїлтіофенїленаміно]-2,4-дикарбонїламіно толуол (5г). До розчину 2.0 г (0.0092 моль) етилтіосульфанїлату (4) в 50 мл бензолу додавали 0.80 г (0.0092 моль) 2,4-толуїлендіїзоціанату (2г) при температурі 20 °С та інтенсивному перемішуванні. Реакційну масу витримували при 60 °С протягом 5.5 годин, а потім при 20 °С протягом 13 діб. Осад відфільтровували і сушили на повітрі. Вихід продукту 3.7 г.

1. *Общая органическая химия / Под ред. Д. Бартона, У.Д. Оллис. – М., 1983. – Т. 5. – 718 с.*
2. Недоля Н.А., Герасимова В.В., Трофимов Б.А. Виниловые эфиры, содержащие изотиоцианатную группу. IX. Нуклеофильное присоединение тиолов // Журн. орг. химии – 1992. – Т. 28. – № 1. – С. 8–13. 3. Пудовик А.Н., Черкасов Р.А., Зимин М.Г., Забиров Н.Г. О взаимодействии дитиоокислот-фосфора с нитрилами карбоновых кислот // Журн. общ. химии. – 1978. – Т. 48. – № 4. – С. 926.

УДК 579.841.222

В.А. Єрохін, Т.Я. Покиньброда*, О.В. Карпенко*, В.П. Новіков

Національний університет “Львівська політехніка”,

кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології,

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

ДОСЛІДЖЕННЯ РОСТУ ТА СИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ ШТАМОМ *PSEUDOMONAS SPECIES* PS-17 – ПРОДУЦЕНТОМ ПОЗАКЛІТИННИХ БІОСУРФАКТАНТІВ

© Єрохін В.А., Покиньброда Т.Я., Карпенко О.В., Новіков В.П., 2006

Вивчено динаміку росту та накопичення поверхнево-активних речовин бактеріальною культурою *Pseudomonas species* PS-17 на мінеральному середовищі з різними джерелами вуглецю.

Dynamics of growing and accumulating biosurfactants produced by bacterial strain *Pseudomonas species* PS-17 on mineral medium with different carbon sources was studied.

Постановка проблеми. Поверхнево-активні речовини (ПАР) широко використовуються в різних галузях народного господарства: нафтовидобувній промисловості; виробництві мийних та косметичних засобів, фармацевтичних препаратів; сільському господарстві; очищенні і відновленні довкілля.

З розвитком біотехнології особлива увага приділяється дослідженню біогенних ПАР (або біосурфактантів) – продуктів мікробного синтезу. Поверхнево-активні речовини біологічного походження мають значні переваги над синтетичними аналогами: вони є високоефективними, але разом з тим нетоксичними, неалергенними та біодеградабельними.

Дослідження умов синтезу біогенних ПАР має важливе значення для їх промислового виробництва та визначення напрямків застосування.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Огляд літературних джерел показав, що в світовій практиці застосування біосурфактантів, на заміну традиційним приходять ПАР. Розробляються нові методи одержання та очищення вже відомих біогенних ПАР [1], ведеться пошук нових, більш ефективних біосурфактантів [2], а разом з тим розширюються і сфери їх використання.

Для біоПАР властиві такі самі характеристики, що й для синтетичних ПАР: зниження поверхневого натягу, стабілізація емульсій, критична концентрація міцелоутворення (ККМ), критичне міцелярне розведення (CMD) [3].

У Відділенні фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України створено велику колекцію мікроорганізмів – продуцентів високоефективних біосурфактантів. Одним із найбільш активних і перспективних серед них виявився бактеріальний штам *Pseudomonas species* PS-17, що здатний утилізувати широкий спектр органічних субстратів і синтезувати позаклітинний біосурфактант рамноліпідної природи.

Попередні дослідження довели високу ефективність цього біоПАР та можливість його промислового виробництва. Особливістю штаму PS-17 є те, що в культуральній рідині поверхнево-активні рамноліпіди утворюють активний комплекс з біополімером – полісахаридом альгінатної природи. Цей комплекс має високу поверхневу активність, легко виділяється з культуральної рідини і може використовуватись як цільовий промисловий продукт [4].

Експериментальна частина. Об'єктом досліджень був бактеріальний штам *Pseudomonas species* PS-17 з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України.

Культивування проводили в лабораторних умовах в колбах Ерленмейєра (750 мл), з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) за температури 30 °С на рідкому поживному середовищі такого складу (г/л): NaNO₃ – 3.0; K₂HPO₄×3H₂O – 2.0; KH₂PO₄ – 1.2; MgSO₄×7H₂O – 0.5; цитрат Na – 5.0. Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин (2 % мас.), соняшникову олію (1 % мас.) та суміш олія + гліцерин (1:2) в концентраціях, що відповідають вмісту вуглецю в середовищі у кількості 8 г/л.

Як інокулянт використовували культуру штаму PS-17, що вирощувалася на рідкому поживному середовищі з гліцерином протягом 24 год за температури 30°С. Інокулянт брали в кількості 5 % від об'єму середовища.

Біомасу клітин визначали ваговим методом. Біомасу відділяли центрифугуванням культуральної рідини при 6000 об/хв протягом 20 хв. Отриманий осад клітин висушували за температури 70 °С до постійної маси.

Біокомплекс виділяли з супернатанту підкисленням 10 %-м розчином HCl до рН 3.0, відстоювали і центрифугували при 8000 об/хв протягом 20 хв. Отриманий осад для кількісного визначення комплексу висушували за температури 70 °С до постійної маси.

Виділення ліпідів проводили шляхом екстрагування з супернатанту сумішшю розчинників хлороформ/метанол (2:1) з подальшим упарюванням екстракту під вакуумом. Концентрацію поверхнево-активних рамноліпідів визначали в екстракті спектрофотометричним методом за рамнозою з використанням орцинового реактиву [5].

Емульгуючу активність визначали за індексом емульгування (E₂₄) методом, вказаним у [6].

Поверхневий натяг і критичне міцелярне розведення (CMD) визначали за методом Ребіндера [7].

Якісний аналіз ліпідних екстрактів проводили методом аналітичної тонкошарової хроматографії (ТШХ) з використанням рухомої фази: хлороформ/метанол/ацетон/оцтова кислота (90:10:6:1). Ідентифікацію проводили за маркерним аналізом, проявляли хроматограми 5 %-м спиртовим розчином фосфорно-молібденової кислоти [8].

Результати досліджень. Для визначення здатності штаму PS-17 рости і продукувати поверхнево-активні речовини на різних вуглецевих субстратах було проведено культивування штаму на водорозчинному субстраті – гліцерин (2 % мас.), водонерозчинному – соняшникова олія (1 % мас.) та змішаному – олія + гліцерин (1:2). Час культивування – 5 діб. Результати наведено у таблиці.

З даних, наведених у таблиці, зрозуміло, що найкращий вихід біомаси спостерігається за росту культури на гліцерині як джерелі вуглецю, що також забезпечує високу концентрацію ПАР в культуральній рідині. Під час культивування штаму на олії та суміші субстратів відмічено однаковий вихід комплексу та однакову продуктивність рамноліпідів.

**Синтез біомаси та біоПАР на мінеральному середовищі
з різними джерелами вуглецю**

Субстрат	Біомаса, г/л	Комплекс		Рамноліпіди		E ₂₄ , %	σ, мН/м	CMD
		г/л	г/г АСБ	г/л	г/г АСБ			
гліцерин (2 % мас.)	3,5	5,1	1,5	4,1	1,2	55	28,39	128
олія (1 % мас.)	1,8	4,8	2,7	3,1	1,7	56	29,33	128
олія + гліцерин (1:2)	2,5	4,8	1,9	4,2	1,7	30	29,80	256

Результати тонкошарової хроматографії показано на рис. 1. Поверхневу активність проявляють два основні ліпідні компоненти – менш полярний монорамноліпід RL1 та більш полярний дирамноліпід RL2.

З метою встановлення закономірностей росту та накопичення біоПАР було досліджено динаміку росту штаму PS-17 на середовищі з гліцерином (2 % мас.) та олією (1 % мас.). Результати показано на рис. 2.

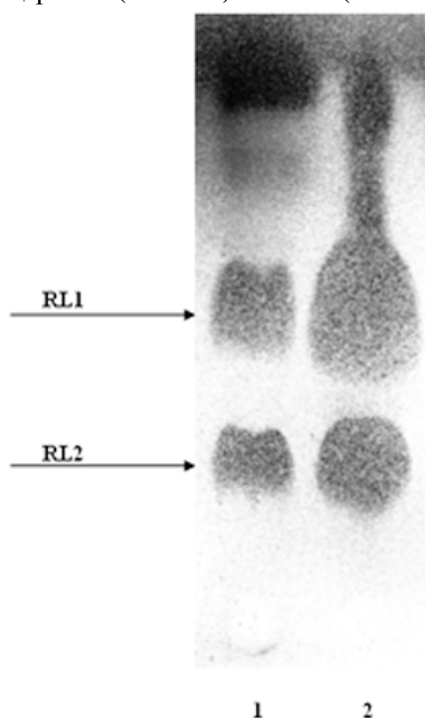


Рис. 1. Тонкошарова хроматограма ліпідного екстракту з супернатанту штаму *Pseudomonas species PS-17*, вирощеного: 1 – на гліцерині; 2 – на олії

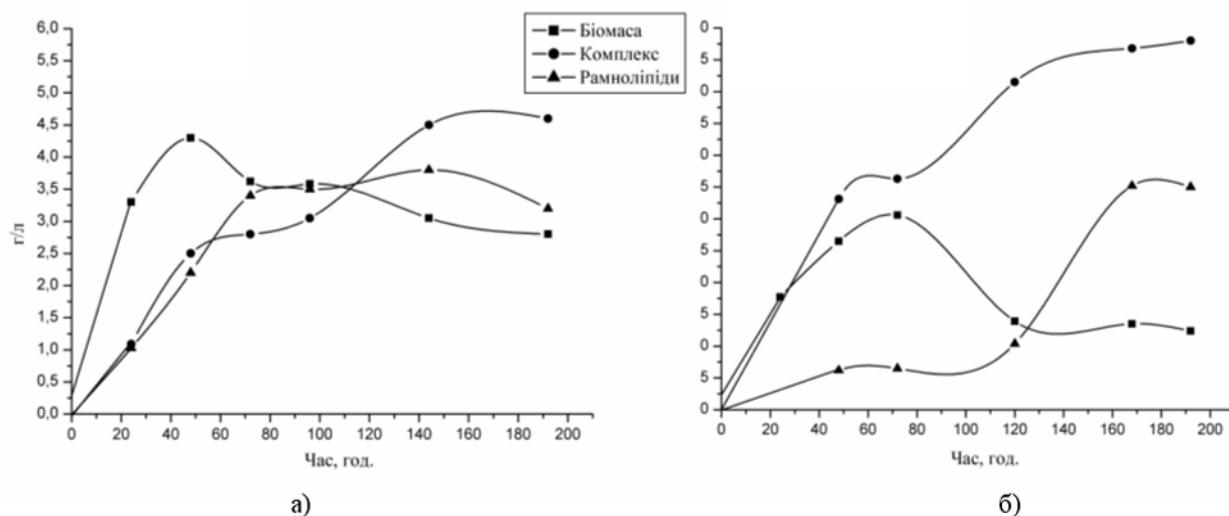


Рис. 2. Динаміка росту штаму *Pseudomonas sp. PS-17* на мінеральному середовищі з джерелом вуглецю: а – гліцерин (2 % мас.); б – олія (1 % мас.)

Аналіз наведених графіків показує, що максимальний ріст біомаси – лог-фаза; в обох випадках спостерігається протягом першої доби від початку ферментації, а найбільший вихід біомаси під час культивування на гліцерині досягається на другу добу, тоді як на олії – на третю, причому на гліцерині показник біомаси більший.

Під час культивування штаму PS-17 на гліцерині максимальний вихід поверхнево-активних рамноліпідів досягається на третю добу, а на олії – на сьому.

Це можна пояснити тим, що олія як гідрофобна речовина є важкодоступним субстратом для бактерій і вимагає додаткового часу на її емульгування за допомогою біоПАР.

Накопичення комплексу, як бачимо з графіків, в обох випадках відбувається однаково і досягає максимуму через 144 год (6 діб) від початку ферментації.

Отже, для швидкого накопичення біомаси доцільно використовувати середовище з гліцерином, наприклад для одержання інокуляту. У той самий час, враховуючи, що згідно з даними, показаними на рис. 1 і 2, вихід поверхнево-активних рамноліпідів під час культивування на обох середовищах приблизно однаковий (3,5 г/л), для накопичення продукту в промисловості досить перспективним є застосування середовища з олією. Це зумовлено економічною вигодою, оскільки олія є набагато дешевшим субстратом, ніж гліцерин. Крім того, можливе застосування технічних (неочищених) олій, а також відходів жирової промисловості (фузу масляного тощо).

Ця робота входить до комплексу робіт з одержання, вивчення та використання біогенних поверхнево-активних речовин, що здійснюється за підтримки УНТЦ (проект 3200) у Відділенні фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України.

Висновки:

1. Бактеріальний штаму *Pseudomonas species* PS-17 здатний рости на водорозчинних (гліцерин) та водонерозчинних (олія) субстратах.

2. Накопичення біоПАР у вигляді поверхнево-активних рамноліпідів та біокомплексу штаму PS-17 відбувається однаково ефективно на обох субстратах, але з різною швидкістю.

3. Для промислової ферментації культури з метою одержання біосурфактанту можна рекомендувати застосування дешевого субстрату – олії та відходів олійного виробництва.

1. Wagner F. *Strategies for biosurfactant production*. // *Fat. Sci. Technol.* – 1987. – P. 586–591.
2. Ron E., Rosenberg E. *Natural roles of biosurfactants* // *Environmental Microbiology*. – 2001. – V.3 – P. 229–236.
3. Parkinson M. *Biosurfactants* // *Biotech. Adv.* – 1985. – V.3. – P. 65–83.
4. Карпенко Е.В., Шульга А.Н., Туровский А.А. *Поверхностно-активные соединения культуры Pseudomonas sp. PS-17* // *Мікробіол. журн.* – 1996. – Т. 58, № 5. – С. 18–24.
5. Ando S., Saito M. *Chromatography lipid, biomedical research and chemical diagnostic* // Elsevier.: Amsterdames. – 1987. – P. 266–310.
6. Кучер Р.В., Лесик О.Ю., Карпенко О.В. *Емульгування вуглеводнів – нова властивість культури дріжджів Phaffia rhodozyma* // *Доп. АН УРСР. Сер. Б. Геол., хім. та біол. науки.* – 1990. – № 8 – С. 49–53.
7. *Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии* // Под ред. К. Миттела. – М., 1980.
8. Виноградова Р.П., Храпунов С.Н. *Физико-химические методы в биохимии.* – К., 1983.