

Литература

1. Ferris R.M. BW 234U, (cis-9-[3-(3, 5-dimethyl-1-piperazinyl)propyl]carbazole dihydrochloride: a novel antipsychotic agent / Ferris R.M., Harfenist M., McKenzie G.M., Cooper B., Soroko F.E., Maxwell R.A. // Journal of Pharmacy Pharmacology. — 1982. — Vol. 34. — P. 388–390.
2. Мысык Д.Д. Синтез и фармакологическая активность N-замещенных 9-(3-амино-2-оксипропил)-карбазолов / Д.Д. Мысык, А.Т. Долженко, Р.Е. Кононова, О.В. Чарфас, В.Ф. Галат // Химико-фармацевтический журнал. — 1984. — № 4. — С. 449–451.
3. Долженко А.Т., Костенко Л.И., Ларина Т.Ф., Мирошниченко А.А., Мысык Д.Д., Перельман Л.А., Тарнопольская Л.В. Харин Н.А. Производные 1-[(3-хлор-карбазолил-9)-3-(2-оксипропил)]-пиперазина, проявляющие анксиолитическую активность // Авт. свидетельство СССР №1584341. 8.04. 1990 г.
4. Hee-Yoon Lee Structure-activity relationship studies of the chromosome segregation inhibitor, Incentrom A / Hee-Yoon Lee, Yongsik Jung, Wonyeob Kim, Jin Hee Kim, Min Soo Suh, Seung Koo Shin, Hye Joo Yoon // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. — 2008. — Vol. 18. — P. 4670–4674.
5. R.K. Mahajan, Ved Parkach Patial & Pamita Sharma. Juvenile hormone like substances: Part XV – Synthesis and biological activities of some juvenile hormone analogues containing sulphonamide feature // Indian Journal of Chemistry. Section B. Organic chemistry including medicinal chemistry. — 2002. — Vol. 41, N 12. — P. 2635–2641.
6. Budesinsky Z. Synthetic antidiabetics. П. N-Tosylated amino acids and their N-alkil derivatives / Budesinsky Z., Emr Z., Musil V., Svab A., Zikmund E. // CeskoSloveska Farmacie. — 1959. — Vol. 8. — P. 161–166; Chem. Abstr. — 1960. — P. 6563.
7. Cocker W. Hydroxyalkylamino-Acids. Part 1 // Journal of the Chemical Society. — 1943. — P. 373–378.
8. Kirmse W. Zur Umlagerung von Nitrosoalkyl-sulfonamiden durch Alkalien / Kirmse W., Horner L. // Chemische Berichte. — 1956. — B. 89. — S. 1674–1680.
9. Rudinger J. Reduction of Tosylamino Acids and Related Compounds with Sodium in Liquid Ammonia; stoichiometry and products / Rudinger J., Maassen Van Den Brink-Zimmermannová H. // Helvetica Chimica Acta. — 1973. — Vol. 56. — P. 2216–2226.
10. Walther K. Darstellung und diastereoselektive Photocyclisierung von N-(β -Benzoylethyl)-N-tosyl-glycinamiden / Walther K., Kranz U., Henning H.-G. Photochemie von Aminoketonen. X. // Journal fur Praktische Chemie. — 1987. — B. 329, № 5. — S. 859–870.

© Мысык Д. Д., Ветров И. В., Галат В. Ф., 2011

Надійшла до редколегії 28.12.2010 г.

УДК 541.123.4:579.873.088.5

Е. В. Карпенко¹, М. В. Прыстай¹, Р. Г. Макитра¹, Е. Я. Пальчикова²
(¹Отделение физико-химии горючих ископаемых ИнФОУ им. Л.М. Литвиненка Национальной академии наук Украины, ²Институт геологии и геохимии горючих ископаемых Национальной академии наук Украины)

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ БИОСУРФАКТАНТОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCUS*

Установлено, что штамм *Rhodococcus ruber* УКМ Ас-288 является эффективным продуцентом клеточно-связанных биосурфактантов. Изучен процесс экстракции биосурфактантов из клеток бактерий данного штамма с использованием 14 растворителей. Установлено, что зависимость между физико-химическими характеристиками экстрагентов и количеством экстрагируемых биосурфактантов может быть описана посредством многопараметровых линейных уравнений, причем определяющим является влияние полярности и мольного объема экстрагента. Влияние специфической сольватации является малозначимым.

Ключевые слова: биосурфактанты, *Rhodococcus*, экстракция, многопараметровые уравнения.

Поверхностно-активные вещества (сурфактанты) широко используются во многих отраслях промышленности. Синтетические сурфактанты получают преимущественно из углеводородного сырья, они опасны для окружающей среды, поскольку являются токсичными и трудно биodeградируемыми. Однако с развитием биотехнологии появилась альтернатива химическим сурфактантам, а именно биосурфактанты, которые синтезируются различными микроорганизмами. Биосурфактанты имеют значительные преимущества перед синтетическими сурфактантами: при высокой эффективности они нетоксичны, неаллергенны, полностью разлагаются в природных условиях, а также экологически безопасны. Перспективными отраслями применения биосурфактантов являются сельское хозяйство, косметическая, фармацевтическая, пищевая, целлюлозно-бумажная, текстильная и другие отрасли промышленности [1,2].

Бактерии рода *Rhodococcus* известны как активные продуценты клеточно-связанных биосурфактантов: трегалозолипидов, которые содержат гидрофильную (трегалоза) и гидрофобную (жирные кислоты) составляющие, а также свободных жирных кислот и спиртов и т.д. [3, 4]. Поскольку биосурфактанты являются клеточно-связанными, то их целесообразно экстрагировать из сухой клеточной массы. Однако здесь возникает вопрос подбора органического растворителя с оптимальными экстрагирующими свойствами.

Известно, что нет однозначной зависимости между растворяющей или экстрагирующей способностью жидкостей и их физико-химическими свойствами. В последнее время показано, что исходя из принципа линейности свободных энергий (ЛСЭ), данные по растворимости таких веществ, как фуллерен [5], нитронафталин [6] и других, могут быть количественно связаны со свойствами растворителей посредством линейных многопараметровых уравнений [7]. Такое обобщение позволяет провести подбор оптимального экстрагента. Однако эти подходы изучены только для индивидуальных соединений, а также применялись для угольных смол [8], но не использовались для анализа результатов экстракции биосурфактантов. Поэтому в настоящей работе нами получены данные по извлечению биосурфактантов с использованием 14 органических растворителей различной природы, и осуществлена попытка их количественного обобщения.

Материалы и методы

В работе были использованы: биосурфактанты — продукты биосинтеза бактериального штамма *R. ruber* УКМ Ас-288 из коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины; органические растворители: метанол, ацетон, хлороформ, метилэтилкетон, диэтиловый эфир, бензол, 1,2-дихлорэтан, н-бутанол, н-октанол, этилацетат, н-бутилацетат, ацетонитрил, диметилформаид, гексан. Свойства растворителей соответствовали справочным.

Культивирование микроорганизмов проводили на протяжении 5 суток на жидкой питательной среде следующего состава (г/л): NaNO_3 — 3,0; K_2HPO_4 — 2,0; KH_2PO_4 — 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; цитрат Na — 1,0; дрожжевой экстракт — 1,0; вода — до 1 л; в колбах Эрленмейера (750 мл) с рабочим объемом 150 мл на ротационной качалке (220 об/мин.) при температуре $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Как источник углерода и энергии использовали гексадекан (2% масс).

Полученную культуральную жидкость центрифугировали 20 мин. при 6000 об/мин. Полученную влажную биомассу высушивали при температуре 102°C. Выделение биосурфактантов проводили путем одноразовой экстракции 1 г сухой биомассы 15 мл экстрагента при встряхивании и обработке ультразвуком на протяжении 3 мин. с последующим упариванием экстракта под вакуумом (3 мм. рт. ст.). Количество полученных биосурфактантов определяли весовым методом. Индекс эмульгирования и поверхностное натяжение супернатанта культуральной жидкости определяли по методикам, описанным ранее [9, 10].

Результаты и обсуждение

Штамм *R. ruber* УКМ Ас-288 продуцирует в среднем 5 г биосурфактантов на литр культуральной жидкости. Поверхностное натяжение супернатанта культуральной жидкости составляет 49,16 мН/м, индекс эмульгирования в системе культуральная жидкость – вазелиновое масло – 60 %.

Для анализа данных по экстракции биосурфактантов мы использовали шестипараметровое уравнение, рекомендованное в работах [5, 7, 8]:

$$Q = a_0 + a_1(n^2 - 1)/(n^2 + 2) + a_2(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1) + a_3B + a_4E_T + a_5\delta_H^2 + a_6V_M \quad (1)$$

В данном уравнении n — показатель преломления света и ε — диэлектрическая проницаемость органических растворителей, которые определяют их поляризуемость и полярность, ответственные за неспецифическую сольватацию извлекаемых веществ; B — основность по Пальму [11], E_T — электрофильность по Райхардту [12], которые определяют специфическую сольватацию, т.е. способность к кислотно-основному взаимодействию. Квадрат параметра растворимости Гильдебранда (δ_H^2) и мольный объем V_M характеризуют структурные особенности экстрагента. Соответствующие характеристики растворителей брались из обзоров [13, 14]. Поскольку принцип ЛСЭ исходит из положений химической термодинамики, предпочтительно было бы представлять растворимость Q в мольных долях. Однако, учитывая, что извлекаемые биосурфактанты представляют собой сложную смесь веществ с различной молекулярной массой, то для расчетов использованы значения Q в граммах биосурфактантов, растворившихся в 1 моле растворителя, что не вносит существенных различий. Эти значения приведены в таблице 1.

Таблица 1. Экспериментальные и рассчитанные по уравнению (3) значения Q (грамм биосурфактантов, растворившихся в 1 моле растворителя)

№	Растворитель	г биосурфактантов/ г сухой биомассы	Растворимость в 1 моле растворителя,		
			$Q_{\text{экспер}}$	$Q_{\text{расчет}}$	ΔQ
1	Метанол	0,1922	0,3929	-0,0308	-0,4237
2	Ацетон	0,2458	1,1291	1,3791	0,2500
3	Хлороформ	0,2438	0,2089	0,1020	-0,1069
4	Метилэтилкетон	0,3019	2,3922	2,0366	-0,3556
5	Диэтиловый эфир	0,2860	1,6554	1,9456	0,2902
6	Бензол	0,2665	1,8680	-1,0259	-2,8939
7	1,2-Дихлорэтан	0,2005	1,0764	0,7492	-0,3272
8	н-Бутанол	0,2969	1,8951	1,9576	0,0625
9	н-Октанол	0,2977	4,9273	5,0362	0,1089
10	Этилацетат	0,2833	1,7960	1,8555	0,0595
11	н-Бутилацетат	0,3372	3,8434	3,3120	-0,5314
12	Ацетонитрил	0,4580	0,2282	0,4912	0,2630
13	Диметилформамид	0,2910	0,5800	1,1442	0,5642
14	Гексан	0,2488	1,6414	1,7877	0,1463

Адекватность уравнений проверялась в соответствии с критерием Фишера при степени достоверности $\alpha=0,95$. Расчеты проводились согласно рекомендациям Секции по корреляционному анализу в химии при ИЮПАК (САС IUPAC) [15].

Обобщение данных таблицы для всех четырнадцати органических растворителей приводит к уравнению с нежелательно низким значением множественного коэффициента корреляции: $R=0,924$. Однако исключение из расчетов (согласно рекомендациям [15]) наиболее отклоняющихся данных только для одного растворителя – неполярного бензола – позволяет получить выражение (2) с приемлемой степенью связи ($R > 0,95$):

$$Q = -3,806 - (20,428 \pm 5,210)f(n^2) + (10,559 \pm 2,841)f(\varepsilon) - (2,676 \pm 1,523) \times 10^3 \times B + (3,469 \pm 4,480) \times 10^{-2} \times E_T - (0,770 \pm 1,535) \times 10^{-3} \times \delta^2 + (5,709 \pm 0,600) \times 10^{-2} \times V_M \quad (2)$$

$N=13$, $R=0,982$, среднеквадратичное отклонение $s \pm 0,203$.

Несмотря на адекватность уравнения, нельзя определить значимость отдельных его членов на основании соответствующих величин парных коэффициентов r . За исключением значения r для зависимости Q от V_M , которое равно 0,862, все остальные значения r крайне низкие. Можно только предполагать незначимость тех членов уравнения, в которых стандартные отклонения коэффициентов регрессии близки или даже выше их соответствующих абсолютных значений (E_T , δ^2 , B). Поэтому значимость отдельных членов уравнения определяли, согласно рекомендациям [15], посредством поочередного исключения отдельных его членов и вычисления значений R результирующих уравнений с меньшим числом членов. В случае, когда определяемое значение R существенно не отличается от первоначального его значения, исключаемый член считается незначимым.

Таким образом, подтверждена незначимость членов с δ_H^2 и E_T :

$$Q = -3,285 - (21,866 \pm 5,091)f(n^2) + (12,473 \pm 1,865)f(\varepsilon) - (3,187 \pm 1,375) \times 10^3 \times B + (5,980 \pm 0,405) \times 10^{-2} \times V_M \quad (3)$$

$R=0,981$, $s \pm 0,272$

Влияние основности экстрагентов также является относительно малозначимым, исключение этого фактора несущественно снижает R :

$$Q = -3,536 - (15,002 \pm 4,382)f(n^2) + (9,100 \pm 1,404)f(\varepsilon) - (5,412 \pm 0,389) \times 10^{-2} \times V_M \quad (4)$$

$R=0,972$, $s \pm 0,327$

Таким образом, количество извлекаемых из биомассы биосурфактантов определяется, в основном, способностью растворителей к неспецифической сольватации, т.е. зависит от их полярности, а также от мольных объемов, т.е. реально возрастает с увеличением их молекулярной массы. Фактор поляризуемости является относительно малозначимым, при его исключении R получаемого двухпараметрового уравнения снижается до 0,951, но все еще находится в допустимых пределах. Значения Q , рассчитанные по уравнению (4), также приведены в таблице. Их отклонения от экспериментальных значений, за некоторыми исключениями (ДМФА, метанол и, конечно, бензол), не превышают значений $s \pm 0,327$. Обращает на себя внимание незначимость в процессе экстракции возможных специфических взаимодействий.

Таким образом, оптимальными экстрагентами для биосурфактантов штамма *R. ruber* УКМ Ас-288 являются полярные растворители с относительно высокой молекулярной массой – высшие спирты, высшие кетоны и, вероятно, карбоновые кислоты.

Выводы

1. Бактериальный штамм *Rhodococcus ruber* УКМ Ас-288 является активным продуцентом клеточно-связанных биосурфактантов.

2. Зависимость количества экстрагируемых биосурфактантов от свойств растворителя может быть описана посредством трех- или четырехпараметровых линейных уравнений, причем определяющими факторами являются полярность и мольный объем экстрагента.

3. Оптимальными экстрагентами для биосурфактантов штамма *R. ruber* УКМ Ас-288 являются полярные растворители с относительно высокой молекулярной массой – высшие спирты, высшие кетоны и, вероятно, карбоновые кислоты.

Литература

1. Banat I.M. Microbial biosurfactants production, applications and future potential / I.M. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi [et. al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — Vol. 87. — P. 427–444.
2. Rodrigues L. Biosurfactants: potential applications in medicine / L. Rodrigues, I.M. Banat, S.Teixeira [et. al.] // J. Antim. Chemother. — 2006. — Vol. 57. — P. 609–618.
3. Lang S. Surface-active lipids in Rhodococci / S. Lang, J.C. Philp // Antonie van Leeuwenhoek. — 1998. — Vol. 74. — P. 59–70.
4. Kuyukina M.S. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction / M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina, J.C. Philp [et. al.] // J. Microbiol. Meth. — 2001. — Vol. 46. — P. 149–156.
5. Макитра Р.Г. Влияние свойств растворителей на растворимость фуллерена C60 / Р.Г. Макитра, Р.Е. Пристанский, Р.И. Флунт // ЖОХ. — 2003. — Т. 73, вип. 8. — С. 1299–1304
6. Hoover R.R. Correlation of the solubility behavior of crystalline 1-Nitronaphtalene in organic solvents with the Abraham solution parameter model / R.R. Hoover, W.E. Acree, B.H. Abraham // J. Solut. Chem. — 2005. — Vol. 34, N 10. — P. 1121–1132.
7. Makitra R.G. Correlation Analysis in Chemistry of Solutions / R.G. Makitra, A.A. Turovsky, G.E. Zaikov // Utrecht; Boston: Ed. VSP. — 2004. — 320 p.
8. Брык Д.В. Применение метода регрессионного анализа для обобщения данных по растворимости пеков / Д.В. Брык, Р.Г. Макитра, Е.Я. Пальчикова // Химия твердого топлива. — 2006. — № 6. — С. 26–36.
9. Кучер Р.В. Емульгування вуглеводнів – нова властивість культури дріжджів *Phaffia rhodozyma* / Р.В. Кучер, О.Ю. Лесик, С.А. Єлісєєв [та ін.] // Доп. АН УРСР. Сер.Б. Геол., хім. та біол. науки. — 1990. — № 8. — С. 49–53.
10. Методы общей бактериологии / [под ред. Ф. Герхардта и др.]. — М.: Мир, 1983. — Т. 1. — 535 с.
11. Коппель И.А. Параметры общей активности растворителей / И.А. Коппель, А.И. Паю // Реакц. Способн. Органич. Соед. — 1974. — Т. 11, № 1. — С. 121–138.
12. Reichardt Ch. // Solvent and Solvent Effects in Organic Chemistry, 3-th ed. Wiley VCH Verl; Weinheim. — 2003. — P. 630.
13. Макитра Р.Г. Важнейшие характеристики растворителей, применяемые в уравнениях ЛСЭ / Р.Г. Макитра, Я.Н. Пириг, Р.Б. Кивелюк // Деп. ВИНТИ. N.628-B86. — Львов, 1986. — С. 33.
14. Abboud J.L.M. Critical compilation of scales of solvent parameters. I. Pure, non-hydrogen bond donor solvents / J.L.M. Abboud, R. Notario // J. Appl. Chem. — 1999. — Vol. 71, N 4. — P. 645–718.
15. Recommendation for reporting the results of correlation analysis in chemistry using regression analysis / Quant. Struct.- Act. Relat. — 1985. — Vol. 4, N 1. — P. 29–39.

© Карпенко Е.В., Прыстай М.В., Макитра Р.Г., Пальчикова Е.Я., 2011

Надійшла до редколегії 5.03.2011 з.