Таким образом, анализ результатов расчета и ЯМР спектроскопии показал наличие для изученных соединений двух изомеров и их *а*- и *е*-конформеров. Наиболее энергетически выгодными являются экваториальные формы *цис*- и *транс*-изомеров, количество которых примерно равно, и эти структуры будут рассмотрены при изучении комплексообразования и в реакции сополимеризации, особенно 1-акрилоилоксиметил-3,4-эпоксициклогексана с акцепторными мономерами.

Литература

1. **Зефиров Н.С., Палюлин В.А., Касьян Л.И., Брускин А.Б.** Конформационные исследования в ряду замещенных 7-оксабицикло[4.1.0]гептанов // Журн. орган. химии, 1980. — Т. 16. — Вып. 1. — С. 224–226.

2. **Верещагин А.Н.** Конформации шестичленных углеродных циклов с планарными группировками. // Усп. химии, 1983. — Т. 52. — Вып. 11. — С. 1879–1900.

3. **Конформационный анализ углеводородов и их производных** / А.Н. Верещагин, В.Е. Катаев, А.А. Бредихин, А.П. Тимошева, Г.И. Ковыляева, Э.Х.Казакова. — М.: Наука, 1990. — 296 с.

4. **Батог А.Е., Зайцев С.Ю., Кирюшина Н.П., Зайцева В.В.** Синтез и строение 1-акрилоилоксиметил- и 1-ацетоксиметил-3,4-эпоксициклогексанов // Журн. орган. химии, 1982. — Т. 18. — Вып. 1. — С. 90–94.

5. **Зайцев С.Ю., Батог А.Е., Бондаренко А.В., Зайцева В.В.** Сополимеризация 3,4-эпоксигексагидробензилакрилата с виниловыми мономерами. // Высокомолекул. соедин., 1982. — Т.24 А. — № 4. — С. 778–782.

6. **Зайцева В.В., Нарижная О.Н.** Взаимодействие 1-метоксикарбонил-3-циклогексена и 1-метоксикарбонил-3,4-эпоксициклогексена с третбутоксирадикалом // Журн. орган. химии, 1996. — Т. 32. — № 4. — С. 503–508.

7. **Нарижная О.Н.** Изучение изомерного и конформерного равновесия некоторых замещенных циклогексана: Дисс. … канд. хим. наук: 02.00.04-физическая химия. Защищена 06.01.87.- Утв. 03.06.87, ХМ № 017179. — Донецк, 1987. — 141 с.

8. **Stewart J.J.P.** Molecular orbital program WinMOPAC. User manual. 1998. FUJITSU Ltd. http://www.fujitsu.co.jp/hypertext/.

9. **Илиел Э., Аллинжер Н., Энжиал С., Моррисон Г.** Конформационный анализ. — М.: Мир, 1962. — С. 34.

10. **Наумов В.А., Беззубов В.М.** Электронографическое исследование строения молекул циклогексена и окиси циклогексана // Журн. структур. химии, 1967. — Т. 8. — № 3. — С. 530–532.

11. **Ikeda T., Kowley R., Curl R.F.** Microwave spectra of cyclohexane oxide // J. Mol. Spectr., 1972. — Vol. 44. — № 3. — P. 459.

12. **Жижин Г.Н., Стерин Х.Е.** Спектроскопическое исследование конформационного равновесия метилциклогексана.// Журн.прикл.спектроскопии, 1966. — Т. 5. — Вып.4. — С. 506–513.

© Тюрина Т.Г., 2008

УДК 579.841.222

Єрохін В.А., Покиньброда Т.Я., Карпенко О.В. (Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України)

ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ ПРЕПАРАТИ НА ОСНОВІ ПРОДУКТІВ БІОСИНТЕЗУ ШТАМУ *PSEUDOMONAS SP.* PS-17

Досліджено поверхнево-активні сполуки, синтезовані бактеріальним штамом Pseudomonas sp. PS-17. Доведено їх високу поверхневу активність, стабільність і можливість застосування як ефективних та екологічно безпечних замінників синтетичних ПАР. Розроблено методики одержання

різних форм поверхнево-активних препаратів в залежності від галузі їх застосування.

Вступ

Як відомо, поверхнево-активні речовини широко використовуються у різних галузях народного господарства: нафтовидобувна промисловість, виробництво мийних та косметичних засобів, фармацевтичних препаратів, парфюмерно-косметична, харчова промисловість, сільське господарство, очистка і відновлення довкілля.

Незважаючи на унікальні фізико-хімічні властивості та перспективи застосування, хімічні ПАР, що традиційно використовуються у народному господарстві, зазвичай є токсичними і забруднюють навколишнє середовище.

З розвитком біотехнології особлива увага приділяється дослідженню біогенних ПАР (біосурфактантів) — продуктів мікробного синтезу. Інтерес до біоПАР постійно підвищується у зв'язку з перспективою їх практичного застосування. Поверхнево-активні та емульгуючі властивості цих речовин визначають їх ефективність у процесах стабілізації емульсій, суспензій, гелеутворенні, піноутворенні, регулюванні змочування, реології, мембранного транспорту. Не поступаючись за своїми властивостями синтетичним ПАР, біосурфактанти мають значні переваги: вони біодеградабельні, нетоксичні, менш чутливі до екстремальних температур, pH, вмісту солей, різноманітні за біологічною активністю. Для синтезу біоПАР можуть бути застосовані дешеві субстрати, в тому числі промислові відходи.

З огляду на широкий спектр галузей використання, надзвичайно важливим є вибір форми готового препарату біоПАР, яка би була оптимальною для відповідного напрямку. Метою даної роботи було дослідження різних форм цільового продукту на основі поверхнево-активних речовин біогенної природи, підбір ефективних методів їх одержання та визначення напрямків їхнього застосування.

Матеріали і методи

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 (750мл), з робочим об’ємом 150мл на ротаційній качалці (220об/хв.) при температурі 30^{o}C на рідкому поживному середовищі наступного складу (г/л): гліцерин — 30 г/л; $NaNO_3$ — 4,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ — 2,0; KH_2PO_4 — 1,2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,5; цитрат Na — 4,0.

Як інокулят використовували культуру, що вирощувалася протягом 24 год. при 30^{o}C, на рідкому поживному середовищі наступного складу (г/л): гліцерин — 30 г/л; $NaNO_3$ — 5,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ — 2,0; KH_2PO_4 — 1,2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,5; цитрат Na — 5,0. Інокулят брали в кількості 5% від об’єму середовища.

Поверхнево-активний біокомплекс виділяли з супернатанту культуральної рідини при підкисленні (10%-ний розчин HCl) при різних значеннях pH, в діапазоні від 1 до 5. Отриманий осад відділяли центрифугуванням при 8000 об/хв. протягом 20 хв., висушували при 70^{o}C до постійної маси.

Ліпіди виділяли шляхом екстракції з подальшим упарюванням екстракту під вакуумом. В якості екстрагента використовували такі розчинники: гексан, хлористий метилен, етилацетат, розчин Фолча (хлороформ/метанол 2:1).

Концентрацію рамноліпідах ПАР в екстракті визначали спектрофотометричним методом за концентрацією рамнози з використанням орцинового реактиву [1].

Концентрацію полісахариду визначали після його осадження ізопропанолом з супернатанту культуральної рідини за методом [2].

Емульгуючу активність визначали за індексом емульгування (E_{24}) методом [3].

Поверхневий натяг та критичне міцелярне розведення (CMD) визначали за методом [4] з платиновою пластинкою Вільгельмі.

Якісний аналіз ліпідних екстрактів проводили методом аналітичної тонкошарової хроматографії (ТШХ) з використанням пластинок Silufol (Kavalier, Chechoslovakia). В якості рухомої фази застосовувалася система розчинників: хлороформ/метанол/ацетон/оцтова кислота (90:10:6:1). Візуалізацію хроматограм проводили 5%-ним спиртовим розчином фосфорно-молібденової кислоти (загальні ліпіди) та орциновим реагентом (для виявлення рамноліпідів) [5]. Ідентифікацію ліпідів проводили з використанням маркерного аналізу.

Розділення рамноліпідних фракцій здійснювали шляхом адсорбційної хроматографії на колонці з силікагелем [10]. В якості носія використовували силікагель Silicagel 60 (0,015–0,040 мм), Merck, в якості елюенту— систему розчинників хлороформ/метанол у різних співвідношеннях. Елюент проходив крізь колонку під надлишковим тиском 0,13МПа. Аналіз одержаних фракцій здійснювали за допомогою тонкошарової хроматографії.

Результати досліджень

Кінцевим продуктом культивування продуценту є культуральна рідина, що містить біомасу, компоненти поживного середовища та продукти біосинтезу. Культуральна рідина виявляє поверхнево-активні властивості і вже сама по собі може бути цільовим продуктом біосинтезу. Собівартість такого продукту є низькою, оскільки процес включає ферментацію і не потребує додаткових методів переробки та очищення. Це важливо у тих випадках, коли передбачається застосування продукту у великому об’ємі, наприклад, в процесах нафтовидобутку, очистки грунтів та пісків від нафтових забруднень і пестицидів, очистки стічних вод, у сільському господарстві в комплексних засобах захисту і живлення рослин.

Для визначення термічної стабільності препарату культуральну рідину витримували при різних температурах протягом різного часу, а також стерилізували при температурі 110° та 125°С . Результати наведені в таблиці 1.

Аналіз впливу підвищеної температури на функціональну активність продукту вказує на його високу термостабільність, у той час як активність синтетичних ПАР (Твін 60, Тритон Х-100) при цьому знижується [6]. Крім того підвищена температура (80–100°С) сприяє додатковому виходу поверхнево-активних продуктів з клітин.

Одержані результати дають підстави рекомендувати термічну обробку культуральної рідини даного штаму-продуценту при температурі 100°С протягом 5 хв. з метою одержання поверхнево-активного продукту з високими показниками поверхневої активності.

При подальшій переробці біомасу відділяють від культуральної рідини шляхом центрифугування. Одержаний супернатант може бути використаний як готовий продукт, наприклад, при виробництві мийних засобів, домішок до кормів сільськогосподарських тварин тощо. Порівняльні характеристики обох поверхнево-активних препаратів на основі культуральної рідини наведені в таблиці 2.

Таблиця 1. Характеристики культуральної рідини Pseudomonas sp. PS-17 після термічної обробки

t, °C	τ, хв.	Рамноліпіди, г/л	Комплекс, г/л	Полісахарид, г/л	E_{24}, %	CMD	σ, мН/м
20		3,32±0,05	5,88±0,17	0,90±0,03	80±2	64	27,8± 0,3
60	5	3,30±0,10	5,92±0,10	0,89±0,04	79±3	64	28,4± 0,2
60	15	3,44±0,09	6,12±0,18	1,25±0,03	78±3	64	28,3± 0,2
60	30	3,90±0,12	5,58±0,15	1,48±0,04	82±1	64	28,1± 0,3
80	5	3,34±0,08	5,98±0,09	0,92±0,05	84±2	64	28,0± 0,4
80	15	3,82±0,11	6,52±0,11	1,30±0,04	80±3	64	27,9± 0,1
80	30	4,02±0,14	6,71±0,30	1,68±0,07	83±2	64	27,7± 0,2
100	5	3,82±0,09	6,64±0,14	1,53±0,02	83±3	64	27,9± 0,2
100	15	3,16±0,13	6,44±0,19	1,51±0,04	82±1	64	28,2± 0,3
110	20	3,26±0,11	6,14±0,21	1,12±0,03	80±2	64	28,1± 0,1
125	20	3,04±0,16	6,02±0,13	1,08±0,06	79±2	42	28,4± 0,2

Таблиця 2. Характеристики поверхнево-активних препаратів на основі культуральної рідини

Поверхнево-активний препарат	Рамноліпіди, г/л	Комплекс, г/л	Полісахарид, г/л	E_{24}, %	CMD	σ, мН/м
Прогріта культуральна рідина	3,82±0,09	6,64±0,14	1,53±0,02	83±3	64	27,9± 0,2
Супернатант	3,44±0,05	5,92±0,11	1,34±0,02	81±2	64	27,5± 0,1

Особливістю штаму PS-17 є те, що в культуральній рідині рамноліпіди утворюють активний комплекс з біополімером — полісахаридом. Даний комплекс проявляє високу поверхневу активність і може використовуватися як цільовий промисловий продукт [7]. Перевагами такої форми продукту є його концентрована форма, можливість тривалого зберігання, зручність у застосуванні. З огляду на це, доцільно було визначити оптимальні умови виділення поверхнево-активного біокомплексу. Найбільш ефективним є метод кислотного осадження. Були проведені кількісні та якісні дослідження біокомплексу, осадженого при різних значеннях pH. Результати наведені на рис.1.

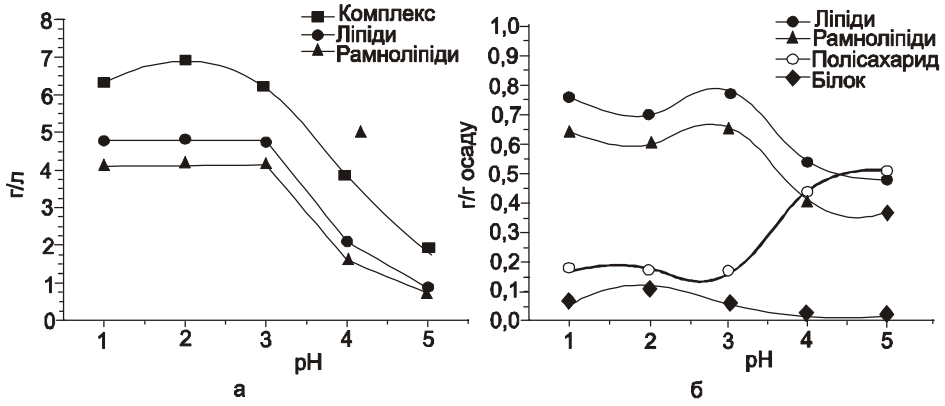


Рис.1. Залежність виходу осаду біокомплексу (а) та його кількісного складу (б) від величини pH при осадженні

Як свідчать наведені дані, найбільший вихід продукту досягався при підкисленні супернатанту культуральної рідини до pH 2.0. У той же час, вміст

поверхнево-активних рамноліпідів у комплексі був максимальним при pH 3.0 і при подальшому підкисленні не змінювався.

До складу одержаного осаду входять ліпіди (рамноліпіди та жирні кислоти), полісахариди та білок. Як видно з графіку 1б, кількісне співвідношення компонентів залежить від величини pH при осадженні. При значенні pH менше 3.0 співвідношення ліпідів до полісахариду залишається сталим, а зміна виходу продукту відбувається за рахунок осадження білку.

Попередні дослідження показали, що вихід біокомплексу в процесі культивування зростає протягом перших п'яти діб культивування і в подальшому не змінюється [8]. Динаміку зміни складу комплексу в залежноті від часу культивування продуцента наведено на рисунку 2.

Як видно з одержаних результатів максимальне співвідношення вмісту рамноліпідів до полісахариду в комплексі спостерігається на п'яту добу культивування (120 год.) і становить 4,5:1 відповідно. При цьому відсотковий склад осаду складає: 78% — ліпіди серед яких 67% — рамноліпіди, решта — жирні кислоти, 15% — полісахарид-альгінат та 7% — білок. Таким чином, для одержання поверхнево-активного біокомплексу можна рекомендувати метод кислотного осадження при pH 3,0.

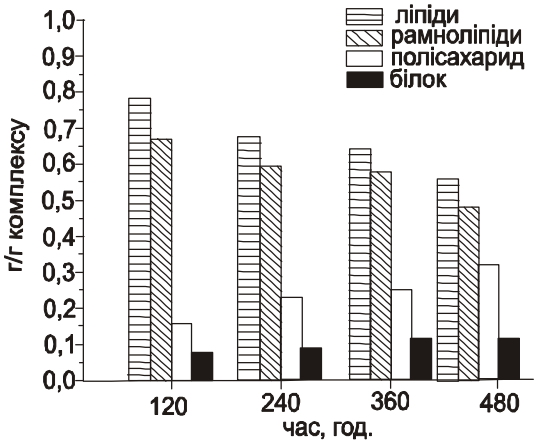


Рис.2. Динаміка зміни складу комплексу в часі

Вищезгаданий біокомплекс може бути джерелом для одержання рамноліпідів, які є високоефективними ПАР і можуть бути використані у біомедицині, фармації, косметиці, ветеринарних препаратах, тощо.

Поверхнево-активні рамноліпіди виділяли з біокомплексу шляхом екстракції. З метою вибору ефективного розчинника для екстракції досліджувалися такі екстрагенти [9]: гексан, хлористий метилен, етилацетат, суміш Фолча (хлороформ-метанол 2:1). Результати екстракції ліпідів з комплексу даними розчинниками наведені в таблиці 3.

Таблиця 3. Екстракція ліпідів з комплексу різними розчинниками

№	Екстрагент	Ліпіди, г/г комплексу
1	Гексан	0,28 ± 0,02
2	Хлористий метилен	0,40 ± 0,02
3	Етилацетат	0,58 ± 0,02
4	Розчин Фолча	0,79 ± 0,02

Як видно з наведених результатів, екстракцію рамноліпідів з біокомплексу найкраще проводити розчином Фолча.

Такий двостадійний процес виділення рамноліпідів з супернатанту є доцільним з економічної точки зору, оскільки при цьому робочі об'єми екстрагенту зменшується в 40 разів у порівнянні з процесом прямої екстракції ліпідів розчинником з супернатанту культуральної рідини.

Для біохімічних та медичних наукових досліджень необхідні високоочищені поверхнево-активні препарати. З метою отримання таких продуктів було знайдено оптимальний метод очищення моно- та

дирамноліпідних фракцій, що є основними поверхнево-активними продуктами біосинтезу штаму PS-17.

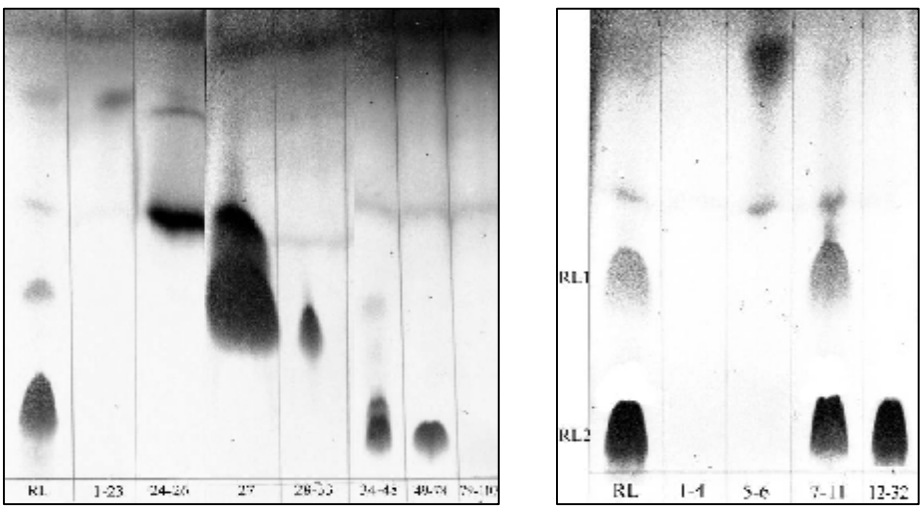
За основу було взято методику розділення рамноліпідних фракцій шляхом адсорбційної хроматографії на колонці з силікагелем [10]. Дану методику було оптимізовано у процесі експериментів. Для видалення жирних кислот та інших неполярних домішок спочатку колонку елюювали хлороформом (фракції 1–23), а далі, поступово збільшуючи полярність, системою хлороформ/метанол у співвідношеннях 50:3 (фракції 24–48), 50:5 (фракції 49–62), 50:10 (фракції 63–78), 2:1 (фракції 79–84) та 1:1 (фракції 85–107).

Як видно з хроматограм, зображених на рис. 3а, в результаті було одержано очищені фракції монорамноліпіду RL1 (фракції 28–33) та дирамноліпіду RL2 (фракції 49–78). Вихід продукту становив 6,1 г/100 г ліпідів для монорамноліпіду і 37,6 г/100 г ліпідів для дирамноліпіду.

Отже монорамноліпід практично повністю елююється при співвідношенні розчинників 50:3, а дирамноліпід при співвідношеннях 50:5 і 50:10, більш полярні системи (50:25 та 50:50) не є ефективними.

Таким чином, для зменшення витрати розчинника розділення рамноліпідів даним методом доцільно проводити такими елюентами: хлороформ (фракції 1–23), хлороформ/метанол у співвідношеннях 50:3 (фракції 24–48) та 50:10 (фракції 49–78). Вихід очищених продуктів: для монорамноліпіду 6 г/100 г ліпідів, для дирамноліпіду 36 г/100 г ліпідів. Незначне зниження виходу продукту можна пояснити втратами при зміні полярності елюента та концентруванні рамноліпідних розчинів.

Оскільки вихід дирамноліпіду RL2 набагато більший ніж RL1, то було модифіковано даний метод з метою одержання лише дирамноліпіду як єдиного очищеного продукту. Для цього силікагелеву хроматографічну колонку промивали тільки одним елюентом (системою хлороформ/метанол 50:10) до повного виходу дирамноліпіду. Результати хроматографічного аналізу наведені на рис.3б. В даному випадку значна частка рамноліпідів виходить нерозділеними (фракції 7–11), а вихід дирамноліпіду RL2 становить 19 г/100 г ліпідів. При цьому досягається подвійна економія екстрагенту.



а б

Рис.3. Тонкошарова хроматограма рамноліпідних фракцій з колонкової хроматографії на силікагелі з індикатором фосфорномолібденовою кислотою

Такий модифікований метод виділення очищеного дирамноліпіду доцільно використовувати в промисловому виробництві, оскільки він має ряд переваг: використовується тільки одна система розчинників, малі витрати екстрагенту, відпрацьований розчинник регенерується, нерозділені фракції можна повертати на повторне розділення, досягається високий вихід продукту.

Висновки

1. Біогенні поверхнево-активні речовини, що продукуються бактеріальним штамом *Pseudomonas species* PS-17, проявляють високу функціональну активність та стабільність і можуть застосовуватися як ефективні та екологічно безпечні замінники синтетичних ПАР.

2. На основі культуральної рідини даного штаму можна одержати п'ять різних цільових продуктів для відповідних напрямків застосування, а саме: термічно оброблена культуральна рідина, супернатант культуральної рідини, біокомплекс, суміш ліпідів та високоочищені рамноліпіди.

3. В результаті досліджень були розроблені оптимальні методики одержання відповідних форм цільового продукту та досліджено їх склад і поверхнево-активні властивості.

Література

1. **Ando S., Saito M.** Chromatography lipid, biomedical research and chemical diagnostic // Elsevier.: Amsterdames, 1987. — P. 266–310.

2. **Методы общей бактериологии** / Под. ред. Ф. Герхарда. — М.:Мир, 1983. — Т. 1. — 535 с.

3. **Кучер Р.В., Лесик О.Ю., Карпенко О.В.** Емульгування вуглеводнів — нова властивість культури дріжджів Phaffia rhodozyma // Доп. АН УРСР, 1990. — Сер. Б. Геол., хім. та біол. науки. — № 8. — С. 49–53.

4. **Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии** // Под ред. К. Миттела. — М.:Мир, 1980. — 597 с.

5. **Виноградова Р.П., Храпунов С.Н.** Физико-химические методы в биохимии // К.: Вища школа, 1983. — 287 с.

6. **Philip J.C., Kuyukina M.S., Ivshina I.V., Lang S.** Alkanotrophic *Rhodococcus rubber* as a biosurfactant producer // Appl. Microbiol. Biotechnol, 2002. — V. 59. — P. 318–324.

7. **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.

8. **Єрохін В.А., Покиньброда Т.Я., Карпенко О.В., Новіков В.П.** Дослідження росту та синтезу цільового продукту штамом *Pseudomonas species* PS-17 – продуцентом позаклітинних біосурфактантів // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Львів: НУ «ЛП». — 2006 р.

9. **Vater P.J.** Biosurfactants: production, properties, applications // New York, Marcel Dekker Inc., 1986. — P. 419–446.

10. **Sim L.** Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa UW-1* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 1997. — Vol. 19. — P. 232–238.

Ó Єрохін В.А., Покиньброда Т.Я., Карпенко О.В., 2008