

БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ПРЕДСТАВНИКАМИ РОДУ *PSEUDOMONAS*

А.В. КУЗЬМЕНКО

Національний авіаційний університет, м. Київ

*Біосурфактанти - поверхнево-активні речовини, які отримують за допомогою мікроорганізмів і широко використовують у різних галузях. У даній статті розглянуто виробництво і характеристику рамноліпідів, що синтезуються представниками роду *Pseudomonas*. Проаналізовано їх застосування у хімічній промисловості, сільському господарстві та в процесах біоремедіації ґрунтів. Підкреслюється вплив зовнішніх умов та вмісту поживних речовин в середовищі культивування на синтез біосурфактантів. Також представлена можливість застосування більш дешевої сировини для промислового виробництва рамноліпідів бактеріями *Pseudomonas*.*

Ключові слова: *біосурфактанти, *Pseudomonas*, рамноліпід, умови культивування, біоремедіація.*

Поверхнево-активні речовини мікробного походження (біосурфактанти) належать до типових амфіфільних сполук, які знижують поверхневий та міжфазний натяг рідин [1]. БіоПАР є не менш ефективними, ніж синтетичні аналоги, оскільки не лише володіють широким спектром функціональної активності, а й мають ряд переваг, таких як біодеградабельність, нетоксичність, стабільність фізико-хімічних властивостей в широкому діапазоні температур, рН і солоності середовища. Важливою перевагою є можливість промислового синтезу біосурфактантів з використанням дешевої сировини, доступної у великих кількостях. Це можуть бути відходи харчової промисловості (олійно-жирові, спиртові, молочні), сільського господарства

(крохмалевмісні відходи) тощо [2]. Завдяки цим корисним властивостям вони стали важливим біотехнологічним продуктом для промислового і медичного застосування. ПАР мікробного походження використовуються в якості емульгаторів, деемульгаторів, змочувальних і піноутворювальних агентів, функціональних харчових інгредієнтів і миючих засобів, а також у деяких випадках антимікробних агентів.

Серед широкого спектру перспективних мікроорганізмів-продуцентів ПАР великої уваги заслуговують представники роду *Pseudomonas*, які синтезують позаклітинні поверхнево-активні гліколіпіди з високою поверхневою, емульгувальною, піноутворювальною активністю [3]. Вперше утворення сурфактантів (рамноліпідів) культурою *Pseudomonas aeruginosa* було показано Джарвісом і Джонсоном ще у 1949 році [4].

Структура і властивості рамноліпідів

Рамноліпіди належать до класу низькомолекулярних поверхнево-активних речовин. Найпоширеніші з них: монорамнодиліпіди і дирамнодиліпіди, які містять відповідно одну і дві молекули рамнози та дві молекули β -гідроксидеканоєнової кислоти (RL1 і RL2 на рис. 1), а також монорамномоноліпіди і дирамномоноліпіди, що складаються з одного або двох залишків рамнози та одного залишку β -гідроксидеканоєнової кислоти (RL3 і RL4 на рис. 1) [5].

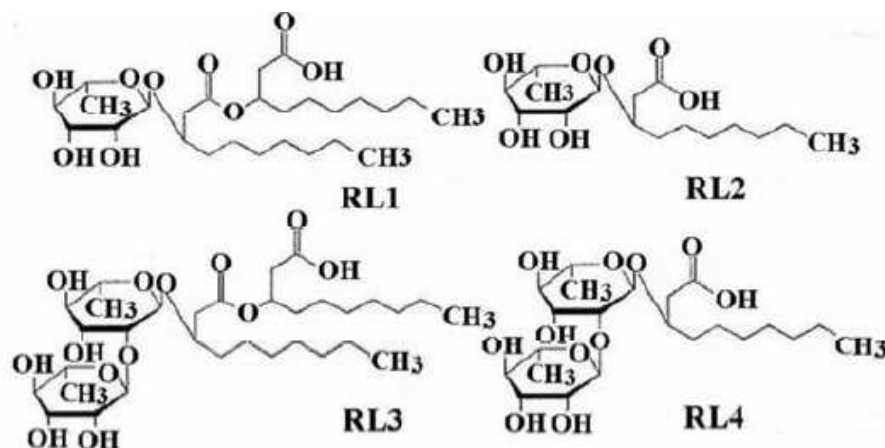


Рис.1. Структура рамноліпідів: RL1 (монорамнодиліпіди), RL2 (дирамнодиліпіди), RL3 (монорамномоноліпіди), RL4 (дирамномоноліпіди)

У 1963 р. Бургер та інші дослідники вивчали процес утворення рамноліпідів за допомогою штаму *P. aeruginosa* ATCC7200 [6]. Вони встановили схему біосинтезу, яка складається з двох послідовних глікозилтрансферазних реакцій, кожна з яких каталізується специфічною рамнозилтрансферазою. Фермент рамнозилтрансфера 1 каталізує синтез монорамноліпідів, тоді як рамнозилтрансфера 2 бере участь в утворенні дирамноліпідів. Процес біосинтезу полягає в серії переносів рамнози на β -гідроксижирну кислоту, в результаті чого утворюються рамноліпіди, що містять вуглеводневий ланцюг різної довжини (C_{10} , C_{8-10} , C_{10-12} , $C_{10-12:1}$) [7].

Рамноліпіди, що синтезуються *P. aeruginosa*, відносяться до найбільш ефективних біосурфактантів, які використовують для видалення гідрофобних речовин із забруднених ґрунтів [8]. Вони характеризуються слабким поверхневим натягом (30-32 мН/м), інтенсивною емульгуючою активністю (10,4-15,5 од / мл фільтрату), низькою величиною ККМ (5 – 65 мг/л) і високою афінністю стосовно гідрофобних органічних молекул [8,9]. Додаткове кільце рамнози збільшує гідрофільність рамноліпідів, а додаткові карбони в ланцюзі жирної кислоти можуть збільшити їх гідрофобність.

Особливості синтезу рамноліпідів у бактерій *Pseudomonas*

Доведено, що утворення позаклітинних рамноліпідів у *Pseudomonas* регулюється на генетичному рівні і залежить від певних факторів навколишнього середовища та джерел живлення. Біосинтез рамноліпідів можливий при використанні багатьох джерел вуглецю. Тим не менш, при використанні бактеріями в якості субстрату глюкози, гліцерину, н-парафінів, а також олій рослинного походження, таких як соєва, кукурудзяна, рапсова, оливкова, забезпечують найвищу продуктивність [5].

Іншим важливим фактором, що впливає на біосинтез ПАР є вміст азоту у поживному середовищі. Так, рядом дослідників було визначено, що утворення рамноліпідів відбувається після видалення із середовища джерела азоту і переходу клітин у стаціонарну фазу росту [10].

Syldatk зі співавторами показали, що лімітування азотом не лише спричинює підвищення синтезу біосурфактантів, а й змінює їх якісний склад [11]. Guerra-Santos і ін. продемонстрували максимальну продуктивність рамноліпідів після додавання азоту у співвідношенні з вуглецем від 16:1 до 18:1 (обмежений вміст N), а при співвідношенні C:N 11:1 і нижче, утворення біосурфактантів взагалі не спостерігалось, оскільки культура не була обмежена в азоті [12].

Синтез деяких біоПАР залежить від специфічних добавок у поживне середовище, наприклад іонів металів, молекул жирних кислот або амінокислот. Значну роль відіграє співвідношення в реакційній суміші різних елементів та вуглецю, наприклад, C:P, C:Fe або C:Mg [13]. Guerra-Santos та ін. виявили, що *P. aeruginosa* DSM2659 може синтезувати велику кількість рамноліпідів в умовах обмеження в середовищі Mg, Ca, K, Na, Fe і мікроелементів. Утворення рамноліпідів також пов'язане з метаболізмом фосфатів [12]. Mulligan і Gibbs виявили пряму залежність між біосинтезом рамноліпідів і активністю глютамінсинтетази в кінці експоненційної фази росту, тобто на початку періоду утворення рамноліпідів [7]. Синтез рамноліпідів інгібується присутністю в середовищі культивування NH_4^+ , глютаміну, аспарагіну і аргініну у якості джерел азоту і активується при наявності NO_3^- , глютамату і аспартату [5].

До факторів, що впливають на утворення біосурфактантів, відносяться рН, температура, аерація, інтенсивність перемішування та ін. [10]. Більшість мікробних сурфактантів, як повідомляється, синтезуються мікроорганізмами у діапазоні температур 25–30°C. Однак, у деяких штамів *Pseudomonas* оптимальна температура знаходиться у межах 30–35°C. У літературі достатньо обмежена кількість праць, присвячених дослідженню температурної залежності біосинтезу рамноліпідів від температури.

На рис.2 показано вплив температури інкубації на утворення біосурфактантів у *Pseudomonas sp.* Культуру вирощували на мінеральному середовищі при температурі 20-47°C. Максимальний вміст рамноліпиду (9,2 г/л) був отриманий при 35°C. При підвищенні температури продукування біоПАР

зменшувалось. При 45°C пригнічувався ріст самих бактерій, що пов'язано із зниженням активності ферментів, а отже, унеможлилювався синтез біосурфактантів [9].

Різні мікроорганізми мають різні оптимуми рН і зниження або підвищення по обидві сторони від оптимального значення призводить до послаблення росту і синтезу вторинних метаболітів. Деякими вченими було визначено, що найвищий показник синтезу рамноліпідів у *Pseudomonas sp.* спостерігався при рН=7 (8,6 г/л) і різко знижувався при подальшому підвищенні рН (рис. 2) [9].

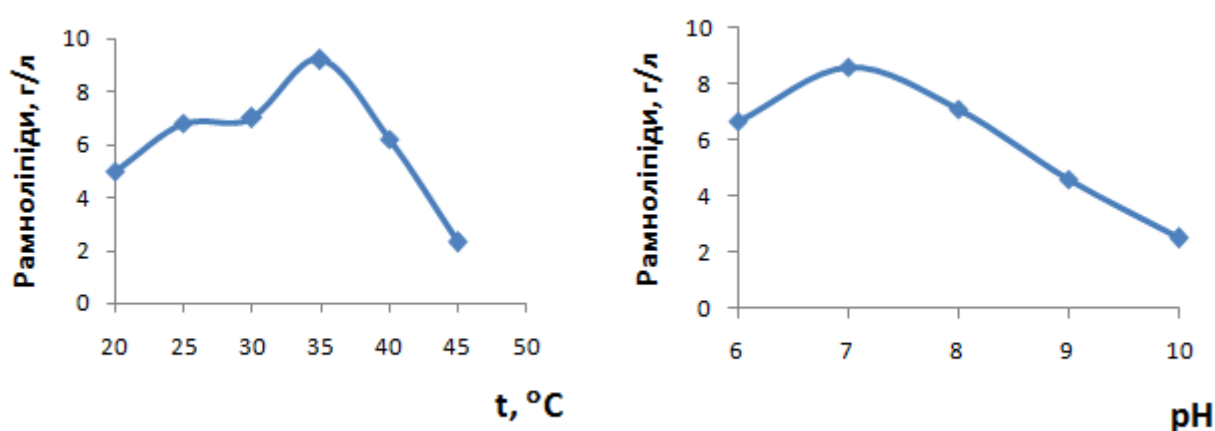


Рис. 2. Вплив температури і рН на синтез біосурфактантів *Pseudomonas sp.*

Таким чином, фактори навколишнього середовища мають вирішальне значення для синтезу рамноліпідів у псевдомонад. Тому, щоб накопичувати необхідну кількість біоПАР, потрібно створити оптимальні умови для росту і життєдіяльності продуцента.

Роль бактерій *Pseudomonas* у біопрепаратах з поверхнево-активними властивостями

Рамноліпіди завдяки своїм поверхнево-активним властивостям знаходять дуже широке застосування у різних галузях промисловості, сільського господарства, а останнім часом привертають все більший інтерес як засіб боротьби із забрудненням стічних вод і ґрунтів різними ксенобіотиками.

Мікробні ПАР використовуються як лікувальні та профілактичні засоби у тваринництві. Препарати на основі культуральної рідини *Pseudomonas* sp. PS-17 є ефективними поліфункціональними фізіологічними регуляторами метаболізму, стимуляторами росту і травлення тварин. Препарат вносили у комбікорм для биків та спостерігали підвищення імунітету та апетиту дослідних тварин, що приводило до збільшення ваги у дослідної групи на 20-30 % [14].

Поверхнево-активні речовини мікробного походження використовуються також для створення товарів побутової хімії. На основі ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 розроблено композиції, які показали високу мийну активність (у тому числі й у жорсткій воді), піноутворення і піностійкість та антиресорбційну активність [15].

Все більшу увагу привертають бактерії *Pseudomonas* як ефективні біодеструктори вуглеводнів і важких металів у процесах біоремедіації ґрунтів.

Були запропоновані два можливих механізми взаємодії між гідрофобними субстратами, мікроорганізмами, водною фазою і ПАР, завдяки яким біосурфактанти посилюють біодеградацію слабозчинних органічних компонентів [6, 16]. Згідно першому механізму, рамноліпіди розчиняють гідрофобні компоненти всередині міцелярних структур, посилюючи розчинність у воді органічних речовин та їх доступність для поглинання клітинами. Другий механізм пов'язують зі здатністю рамноліпідів збільшувати гідрофобність клітинної мембрани, посилюючи таким чином прямий контакт між клітинами і слабозчинним субстратом. Як показали Zhang і Miller, додавання рамноліпідів модифікує клітинну поверхню мікроорганізмів, приводячи до посилення її гідрофобності [7].

Аналіз патентної літератури свідчить про те, що для очищення ґрунтів від нафти і нафтопродуктів найбільш часто використовуються актинобактерії родів *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Arthrobacter*, а також бактерії родів *Pseudomonas* і *Acinetobacter*. Дослідженнями багатьох авторів встановлено, що ці мікроорганізми найбільш широко поширені в забруднених нафтою

екосистемах, в яких провідну роль відіграють актинобактерії. Це пояснюється метаболічними особливостями даних бактерій і їх стійкістю до несприятливих умов існування [17]. У таблиці 1 наведені мікробіологічні препарати із застосуванням *Pseudomonas* у якості активних компонентів.

Таблиця 1

Препарати-біодеструктори нафтових забруднень з використанням бактерій *Pseudomonas*

Назва препарату	Активні компоненти	Умови дії
Путидойл (Росія, 1990)	<i>Pseudomonas putida</i> 36	t°C +10 – +35, концентрація забруднень у ґрунті не більше 10% при глибині проникнення не більше 15 см; у воді не вище 20 г/л, товщина плівки нафти до 10 мм.
Деворойл (Росія, 1992)	<i>Candida</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Pseudomonas</i>	t°C 5 – 40, рН 4,5-9,5; забруднення до 20 кг/м ² поверхні ґрунту; окислюють н-алкани C ₉ -C ₃₀ , ароматичні сполуки: фенол, крезол, пірокатехін та ін.
Еконадин (Росія, 1994)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	t°C +5 - +32; вологість торфу не більше 10%
Екойл (Росія, 1994)	<i>Mycobacterium flavescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Acinetobacter sp.</i>	t°C не нижче +5, забрудненість до 25 г/кг.
Лестан (Україна, 1996)	Нафтоокиснюючі мікроорганізми <i>Rhodococcus</i> , <i>Gordonia</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	Стійкий до заморожування і нагрівання. При обробці поверхонь препарат наноситься у вигляді біопіни. Розкладає до 90% нафти за 30 – 40 днів.

Біопрепарат «Лестан» є вітчизняною розробкою Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного. Він має ряд корисних властивостей, а саме: підвищена гідрофобність поверхні клітин бактерій, що забезпечує їх

знаходження на межі розподілу нафта-вода; підвищена термо- та холодорезистентність клітин або спор, що забезпечить високу виживаємість клітин при виробництві, зберіганні і застосуванні препарату. "Лестан" позитивно відрізняється від інших препаратів стабільністю в екстремальних температурних умовах, а також емульгувальними та піноутворювальними властивостями [18].

Застосування біосурфактантів для очищення ґрунтів, забруднених важкими металами, було запропоновано порівняно недавно. Перші дослідження, присвячені такому використанню біосурфактантів, проведені Miller-Hurting і Finnerty. У ряді робіт показана здатність рамноліпідів до утворення комплексів з іонами Zn^{2+} і Cd^{2+} [7]. У літературі описано формування стійкого комплексу важких металів (кадмій, свинець, цинк, ртуть) з біосурфактантами монорамноліпідами, синтезованими *P. aeruginosa* ЛТСС 9072 та *P. aeruginosa* RL-1 [14]. Утворення такого комплексу дає змогу легко видалити його з води та ґрунту. Крім того доведено, що рамноліпіди суттєво зменшують токсичність кадмію за рахунок утворення комплексу з цим металом та взаємодії рамноліпідів з поверхнею клітини, що приводить до зміни її поглинаючих властивостей [19]. Десорбція та видалення металів при внесенні біосурфактантів відбувалася за рахунок зниження міжфазового натягу та міцелярного комплексоутворення.

Альтернативні субстрати для синтезу мікробних ПАР бактеріями

Pseudomonas

На сьогоднішній день в літературі є порівняно невелика кількість досліджень, присвячених виробництву біосурфактантів з використанням дешевої промислової сировини (наприклад, рослинних олій), відходів харчової промисловості (масложирової, спиртової, молочної) та сільськогосподарського сектору (крохмалевмісні речовини) [20].

У ряді праць показано, що жири рослинного походження можуть використовуватись як ефективна та дешева альтернативна сировина для

синтезу ПАР. Так, соняшникова, оливкова, соєва, кукурудзяна олії можуть слугувати субстратами для синтезу рамноліпідів у *Pseudomonas* (табл. 2).

Таблиця 2

Використання альтернативних субстратів для культивування псевдомонад при промисловому отриманні ПАР

Субстрат	Штам-продуцент	Синтезовані ПАР, г/л
Рапсова олія	<i>Pseudomonas species</i> DSM 2874	45,0
Оливкова олія	<i>P. aeruginosa</i> DAUPE 614	5,4
Соняшникова олія	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	4,3
	<i>P. aeruginosa</i> DAUPE 614	5,0
Соєва олія	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	3,0
Сирна сироватка	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2	0,9
	<i>Pseudomonas sp</i>	4,4
Сік яблука кеш'ю	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MSIC02	5,0
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9,4

З дешевих рослинних нехарчових олій потенційними субстратами для синтезу ПАР є, наприклад, касторова олія та олія жожоба. Крім різних рослинних олій субстратами для одержання ПАР можуть бути побічні продукти їхнього виробництва. Показано можливість використання відходів виробництва соняшnikової та соєвої олій для синтезу рамноліпідів штамми *Pseudomonas aeruginosa* AT10 і *P. aeruginosa* LB1. Промислові жиромісні відходи інших галузей, зокрема стічні води м'ясопереробної промисловості, відходи миловарного виробництва, можуть також слугувати потенційними субстратами для синтезу ПАР. Варто зауважити, що такі субстрати є доступними у необхідних кількостях і дешевими, що повністю виключає залежність виробництва ПАР від сировинної бази [20].

Цікавим є дослідження, у якому в якості субстрату використовували сік яблука кеш'ю. У Бразилії яблука кеш'ю використовуються у виробництві

напоїв та десертів, але 20% плодів ідуть у відходи, або взагалі залишаються гнити в ґрунті. Цей факт, а також багатий вміст поживних речовин соку яблук кеш'ю, зробили його перспективним і недорогим субстратом [21].

У літературі є повідомлення про використання для синтезу ПАР відходів молочної промисловості, зокрема сироватки. Вона утворюється у великих кількостях при виробництві сиру і, в більшості випадків, скидається без попередньої очистки в річки або стоки [9].

Отже, поєднання виробництва біоПАР з процесами утилізації відходів різних галузей промисловості дасть змогу зменшити забруднюючий вплив на навколишнє середовище та збалансувати загальні витрати.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Okoliegbe I.N. Application of microbial surfactant / I.N. Okoliegbe, O.O. Agarry // *Scholarly Journals of Biotechnology*. – 2012. – Vol.1 (1). – P. 5–6.
2. Пирог Т.П. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва / Т.П. Пирог, С.В. Ігнатенко // *Біотехнологія*. – 2008. – Т. 1, № 4. – С. 29-38.
3. Abdel-Mawgoud A.M. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate BS20 / A.M. Abdel-Mawgoud, M.M. Aboulwafa, N.A.H. Hassouna // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 157. – P. 329–345.
4. Ron E.Z. Natural role of biosurfactants / E.Z. Ron., E. Rozenberg // *Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 3. – P. 229-236.
5. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai / [M.G. Ricalovic, G. Gojgic-Cvigovic, M.M. Vrvic, I. Karadzic] // *J. Serb. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 77(1). – P. 27–42.
6. Смирнов В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / Смирнов В.В., Киприанова Е.А.; Отв. ред. Айзенман Б.Е. // АН УССР, Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного. – К.: Наук. думка. – 1990. – 264 с.

7. Картель Н.А. Рамнолипиды: перспективы их использования для фиторемедиации / Н.А. Картель, Г.Г. Бричкова // Биотехнология. – 2007. – N 4. – С. 47-60.

8. Pattanathu K.S.M. Rahman Production, characterization and application of biosurfactant / Pattanathu K.S.M. Rahman, Edward Gakpe // Biotechnology. – 2008. – Vol. 7 (2). – P. 360–370.

9. Biosurfactant Production by *Pseudomonas* Sp from Soil Using Whey as Carbon Source / [Praveesh B.V., Soniyamby A.R., Mariappan C. et al.] // New York Science Journal. – 2011. – Vol. 4(4). – P. 99–103.

10. Saharan B.S. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives / B.S. Saharan, R.K. Sahu, D. Sharma // Genetic Engineering and Biotechnology Journal. – 2011. – Vol. 2 (1). – P. 1–14.

11. Production of four interfacial active rhamnolipids from *n*-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* sp. DSM2874 / [Syldatk C. S., Lang S., Matulovic U., Wagner F.] // Zeitschrift für Naturforschung. – 1985. – N40. – P. 61-67.

12. Guerra-Santos L. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors / Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1986. – N 24. – P. 443-448.

13. Maqsood M.I. Factors Affecting Rhamnolipid Biosurfactant Production / M. Irfan Maqsood, Asif Jamal // Pak. J. Biotechnol. – 2011. – Vol. 8 (1). – P. 1- 5.

14. Волошина І.М. Практичне застосування мікробних поверхнево-активних речовин / Волошина І.М., Пирог Т.П.// Наукові праці НУХТ. – 2009. – №49. – С.11-13.

15. Пирог Т.П. Використання мікробних поверхнево-активних речовин у біології і медицині / Пирог Т.П., Конон А.Д., Скочко А.Б. // Біотехнологія. – 2011. – Т.4, №2. – С. 24–35.

16. Georgiou G. Surface-active compounds from microorganisms / G. Georgiou, S.C. Lin, M.M. Sharma // Biol. Technol. – 1992. – Vol. 10 – P. 60-65.

17. Водянова М.А. Анализ существующих микробиологических препаратов, используемых для биodeградации нефти в почве / М.А. Водянова, Е.И. Хабарова, Л.Г. Донерьян // Горный информационно-аналитический бюллетень. – 2010. – № 7. – С. 253-258.

18. Стабникова О.В. Біотехнологія очищення ґрунтів та водою, забруднених нафтопродуктами / О.В. Стабнікова, А.І. Салюк, Н.М. Грегірчак // Київ, УДУХТ. – 1995. – С. 105–106.

19. Georgiou G. Surface-active compounds from microorganisms / G. Georgiou, S.C. Lin, M.M. Sharma // Biol. Technol. – 1992. – Vol. 10 – P. 60-65.

20. Биосурфактанты: продуценты, свойства и практическое использование / [Гоготов И.Н., Белоножкин С.В., Ходаков Р.С., Шкидченко А.Н.] // Материалы 3-й Межд. конф. “Международное сотрудничество в биотехнологии: ожидания и реальность”. – Пущино: ИЦ “Биоресурсы и экология”. – 2006. – С. 104–111.

21. Підгорський В.С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог. – К.: «Наукова думка» НАН України. – 2010. – 328 с.

22. Karadia Sanket G. Current Trend and Potential for Microbial Biosurfactants / Karadia Sanket G., Yagnik B. N. // Asian J. Exp. Biol. Sci. – 2013. – Vol. 4 (1). – P. 1–8.

Биосинтез поверхностно-активных веществ представителями рода

Pseudomonas

А.В. КУЗЬМЕНКО

Национальный авиационный университет, г. Киев

Биосурфактанты – поверхностно-активные вещества, которые получают с помощью микроорганизмов и широко применяют в разных отраслях. В данной статье рассмотрены производство и характеристика рамнолипидов, синтезированных представителями рода Pseudomonas. Проанализировано их применение в химической промышленности, сельском

хозяйстве и в процессах биоремедиации почв. Подчеркивается влияние внешних условий и содержания питательных веществ в среде культивирования на синтез биосурфактантов. Также представлена возможность применения более дешевого сырья для промышленного производства рамнолипидов бактериями *Pseudomonas*.

Ключевые слова: биосурфактанты, *Pseudomonas*, рамнолипиды, условия культивирования, биоремедиация.

Biosynthesis of surface-active compounds by *Pseudomonas* representatives

A.V. KUZMENKO

National Aviation University, Kyiv

*Biosurfactants are surface active biomolecules obtained by microorganisms and have a wide-range of applications. In this article the production and characterization of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas* representatives are described. Applications of rhamnolipid in the chemical industry, agriculture and bioremediation are evaluated. This review emphasizes the effect of nutritional and environmental factors on the biosurfactants synthesis. Also the use of cheaper raw materials for commercial production of rhamnolipid by *Pseudomonas* species are introduced.*

Key words: *Biosurfactant, *Pseudomonas*, rhamnolipid, culture condition, bioremediation.*