

УДК 519.237.8:543.395:663

**Галина МІДЯНА<sup>1</sup>, Тетяна ПОКИНЬБРОДА<sup>1</sup>, Олена КАРПЕНКО<sup>1</sup>,  
Ігор СЕМЕНЮК<sup>1</sup>, Олена ПАЛЬЧИКОВА<sup>2</sup>**

**ВПЛИВ РЕАКЦІЙНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ПРОЦЕС  
ЕКСТРАКЦІЇ ГЛІКОЛІПІДІВ БАКТЕРІЙ РОДУ  
*PSEUDOMONAS***

<sup>1</sup>Відділення фізико-хімії горючих копалин  
Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії  
ім. Л. М. Литвиненка НАН України,  
вул. Наукова, 3а, 79060 Львів, Україна  
e-mail: gmidyana@gmail.com

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Кирила і Мефодія, 6, 79005 Львів  
e-mail: dubenskyu@gmail.com

<sup>2</sup>Інститут геології та геохімії горючих копалин НАН України,  
вул. Наукова, 3а, 79060 Львів, Україна

*Вивчено вплив фізико-хімічних характеристик розчинників на процес екстракції гліколіпідів супернатанту культуральної рідини бактерій *Pseudomonas aureofaciens* NB-1 і *Pseudomonas fluorescens* 8573. Дані екстракції гліколіпідів адекватно узгоджуються з властивостями органічних розчинників за допомогою багатопараметрових рівнянь лінійності вільних енергій. З'ясовано, що на процес екстракції в обидвох видах бактерій впливає основність розчинників.*

*Ключові слова:* багатопараметрові рівняння ЛВЕ, розчинники, екстракція, гліколіпіди.

## **Вступ**

Виділення гліколіпідів із супернатанту культуральної рідини бактерій за допомогою екстракції органічними розчинниками має велике значення, причому практичну цінність становить біомаса та супернатант культуральної рідини (СКР) цього штаму. Проте виникає питання підбору органічного розчинника з оптимальними екстрагуючими властивостями. Відомо, що немає однозначної залежності між екстрагуючою здатністю рідин та їхніми фізико-хімічними властивостями. З'ясовано, що, враховуючи принцип лінійності вільних енергій (ЛВЕ), дані з розчинності таких речовин, як фулерен [1], нітронафталін [2] та інших, можуть бути кількісно пов'язані з властивостями розчинників за допомогою лінійних багатопараметрових рівнянь [3]. Таке узагальнення дає змогу провести підбір оптимального екстрагента. Ці підходи вивчені тільки для індивідуальних сполук, а також застосовували для вугільних смол [4], але рідко використовували для аналізу результатів екстракції біоПАР [5, 6], адже в останніх випадках ми маємо справу з високомолекулярними речовинами природного походження.

### Методика експерименту

Об'єкт досліджень – поверхнево-активні речовини – продукти синтезу бактеріальних штамів *Pseudomonas aureofaciens* NB-1 і *Pseudomonas fluorescens* 8573. Культивування бактерій проводили на поживному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 3,0; дріжджовий екстракт – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 2,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5; цитрат натрію – 3,0 (рН 6,8–7,0), джерело вуглецю – гліцерин (3%) у колбах Ерленмейєра (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) за 28–30°C впродовж п'яти діб. Кількість посівного матеріалу – 5%. Отриману культуральну рідину центрифугували при 6000 об/хв, 20 хв, а супернатант культуральної рідини (СКР) використовували для екстракції ліпідів. Поверхнево-активні речовини виділяли шляхом одноразової екстракції подвійними кількостями розчинників: гексан, октан, бензол, толуол, хлороформ, тетраклорметан, ізобутанол, бутанол, пентанол, амілацетат, етилацетат, бутилацетат, діетиловий ефір з подальшим відділенням органічної фази та відгонкою розчинника під вакуумом (3 мм. рт. ст.) до постійної маси кінцевого продукту. Кількість гліколіпідів визначали гравіметрично. Для розрахунків використовували значення маси біоПАР(P) в грамах, які переходять із водної фази в 1 моль екстрагента. Усі розчинники регенерували перегонкою. Якісний аналіз ліпідів виконували методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках Alufolien Kieselgel 60 (Merck, Німеччина), рухома фаза хлороформ–метанол–вода (65:25:4). Візуалізацію хроматограм проводили 5% спиртовим розчином фосфорно-молібденової кислоти (загальні ліпіди), орциновим реагентом (рамноліпіди) та нінгідрином [7]. Повторність експериментів триразова. Експериментальні дані опрацьовували з використанням загальноприйнятих методів обробки даних у хімічній технології [8].

### Результати експерименту та їхнє обговорення

Ми досліджували процеси екстракції з супернатанту культуральної рідини бактеріальних штамів *Pseudomonas aureofaciens* NB-1 і *Pseudomonas fluorescens* 8573 поверхнево-активних гліколіпідів (ГЛ). Найкращий спосіб виділення гліколіпідів із СКР – переведення їх у фазу органічного розчинника з наступним видаленням його. Проте, враховуючи складну структуру самих гліколіпідів, безпосередній підбір оптимального екстрагента ускладнений. Тому визначено вихід екстракту, отриманого при виділенні цільового продукту зі СКР екстрагентами різної природи. Згідно з принципом лінійності вільних енергій, при переході речовини з однієї фази в іншу, зміна рівноваги пропорційна логарифму коефіцієнту розподілу, а не концентрації самої речовини. Обчислення варто було б проводити у вигляді величин коефіцієнтів розподілу в молях, оскільки ми досліджували біологічні комплекси, то враховували масу гліколіпідів, які переходять із водної фази в 1 моль екстрагента. Відповідні дані обчислення наведено в табл.

Як відомо, процес екстракції є результатом різних видів сольватаційних взаємодій, спільний ефект яких може бути узагальнений багатопараметровими рівняннями на підставі принципу лінійності вільних енергій. Для знаходження залежності кількості екстрагованої речовини із водної фази від основних параметрів розчинника використано відоме рівняння (1), застосоване в працях [3, 9, 10]

$$P = a_0 + a_1 (n^2 - 1)/(n^2 + 2) + a_2 (\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1) + a_3 B + a_4 E_T + a_5 \delta^2 + a_6 V_M. \quad (1)$$

Таблиця

Експериментальні значення кількості ліпідів, екстрагованих із супернатанту культуральної рідини штамів *Pseudomonas*, та розраховані методом багатопараметрових рівнянь (5, 9)

Table

Experimental values of the amount of lipids extracted from the supernatant of the culture liquid of *Pseudomonas* strains and calculated values with the method of multiparameter equations (5, 9)

Розчинник	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> NB-1			<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8573		
	$P_{\text{експ.}}$ г/моль	$P_{\text{розн. за рівнянням (5)}}$ г/моль	$\Delta P$ , г/моль	$P_{\text{експ.}}$ г/моль	$P_{\text{розн. за рівнянням (9)}}$ г/моль	$\Delta P$ , г/моль
Пентанол-2**	0,0932	0,0791	-0,0141	0,0613	0,1333	0,0720
Діетиловий ефір	0,0265	0,0324	0,0059	0,0291	0,0434	0,0143
Октан	0,0239	0,0347	0,0108	0,0166	-0,0001	-0,0167
Бутилацетат	0,0552	0,0494	-0,0058	0,0667	0,0508	-0,0159
Бензол	0,0113	0,0156	0,0043	0,0098	0,0369	0,0271
Толуол	0,0151	0,0246	0,0095	0,0103	0,0292	0,0189
Бутанол	0,0788	0,0815	0,0027	0,1564	0,1772	0,0208
Тетрахлорметан	0,0136	0,0061	-0,0075	0,0097	-0,0015	-0,0112
Гексан	0,0153	0,0103	-0,0050	0,0171	0,0029	-0,0142
Амілацетат	0,0697	0,0640	-0,0057	0,0742	0,0574	-0,0168
ізо-Бутанол	0,0693	0,0795	0,0102	0,1845	0,1549	-0,0296
Етилацетат*	0,2319	0,0362	-0,1957	0,0272	0,0346	0,0074
Хлороформ	0,0114	0,0061	-0,0053	0,0008	0,0167	0,0159

Розчинник, виключений із розрахунків під час розгляду екстракції із супернатанту культуральної рідини *Pseudomonas aureofaciens* NB-1.

\*Розчинник, виключений із розрахунків під час розгляду екстракції із супернатанту культуральної рідини *Pseudomonas fluorescens* 8573.

У рівнянні (1)  $n$  і  $\epsilon$  – показник заломлення та діелектрична постійна розчинників, які визначають їхню поляризованість і полярність, відповідальних за неспецифічну сольватацію. Параметри  $B$  і  $E_t$  основність за Пальмом [11] і електрофільність за Райхардтом [12], відповідно, які визначають здатність розчинників до кислотно-основної взаємодії, тобто специфічну сольватацію. Величина  $\delta$  – параметр розчинності Гільдебрандта, квадрат якого пропорційний енергії когезії середовища, а  $V_m$  – мольний об'єм розчинників. Величини  $\delta$  і  $V_m$  відображають вплив структурних чинників. Характеристики розчинників брали з [13, 14], а методика розрахунків – відповідно, рекомендації Групи з кореляційного аналізу в хімії при ІЮПАК [15].

Узагальнюючи дані з екстракції гліколіпідів із водної суспензії бактерій *Pseudomonas aureofaciens* NB-1 13-а органічними розчинниками, одержали шести-параметрове рівняння з досить низьким коефіцієнтом множинної кореляції  $R = 0.8735$  і тільки після виключення даних для етилацетату (згідно з Рекомендацій ІЮПАК проведено почергове виключення даних, які найбільше відхиляються і в кожному окремому випадку визначаємо множинний коефіцієнт кореляції) отримуюмо адекватне рівняння з  $R = 0.9725$

$$P = -0,1717 + (0,0842 \pm 0,2128)f(n^2) + (0,0707 \pm 0,1680)f(\epsilon) + (0,0001 \pm 0,0000)B + (0,0013 \pm 0,0050)E_t + (0,0001 \pm 0,0002)\delta^2 + (0,0006 \pm 0,0001)V_m \quad (2)$$

$$N = 12; R = 0,9725; S = \pm 0,00071.$$

Варто звернути увагу на позитивний знак електрофільності, що свідчить про можливу електрофільну сольватацію карбонільного кисню гліколіпідів. Також результати аналізів засвідчують, що екстракція спиртами характеризується більшими значеннями  $R$  порівняно з іншими розчинниками. Величини парних коефіцієнтів кореляції окремих членів досить високі, тому можливо оцінити вклад окремих членів рівняння. Проте у деяких членів рівняння стандартні відхилення більші від абсолютних значень, очевидно в зв'язку зі складністю біологічної системи. Тому для оцінки значущості окремих членів рівняння ми використовували згадану методику ЮПАК. Отож, визначили незначимість параметра  $E_t$ , величина  $R$  отриманого рівняння (3) становить 0,9723

$$P = -0,1427 + (0,0410 \pm 0,1384)f(n^2) + (0,1125 \pm 0,0612)f(\epsilon) + (0,0001 \pm 0,0000)V_b + (0,0001 \pm 0,0000)\delta^2 + (0,0007 \pm 0,0001)V_m \quad (3)$$

$N = 12$ ;  $R = 0,9723$ ;  $S = \pm 0,0072$ .

Досить низька значущість і поляризованості, після виключення цього члена отримуємо чотирипараметрове рівняння (4):

$$P = -0,1300 + (0,1059 \pm 0,0572)f(\epsilon) + (0,0001 \pm 0,0000)V_b + (0,0002 \pm 0,0000)\delta^2 + (0,0007 \pm 0,0001)V_m \quad (4)$$

$N = 12$ ;  $R = 0,9721$ ;  $S = \pm 0,0072$ .

Незначно зменшується множинний коефіцієнт кореляції у разі виключення полярності і у цьому випадку отримуємо трипараметрове рівняння

$$P = -0,1182 + (0,0001 \pm 0,0000)V_b + (0,0002 \pm 0,0000)\delta^2 + (0,0006 \pm 0,0001)V_m \quad (5)$$

$N = 12$ ;  $R = 0,9632$ ;  $S = \pm 0,0082$ .

На підставі проведеного аналізу можна зробити висновок про те, що на екстракцію гліколіпідів позитивно впливає основність, енергія когезії середовища і мольний об'єм.

Аналогічні дослідження проведені для екстракції гліколіпідів органічними розчинниками з водної суспензії бактерій *Pseudomonas fluorescens* 8573. Узагальнення впливу розчинників на процес екстракції за допомогою шестипараметрового рівняння дало негативний результат, тобто множинний коефіцієнт кореляції менше 0,95, а саме  $R = 0,9178$ . Після виключення з розрахунків пентанолу – 2 отримуємо шестипараметрове рівняння з  $R$ , яке дорівнює 0,9763

$$P = -0,2214 - (0,4035 \pm 0,2750)f(n^2) - (0,4001 \pm 0,1937)f(\epsilon) + (0,0002 \pm 0,0001)V_b + (0,0084 \pm 0,0055)E_t + (0,0003 \pm 0,0002)\delta^2 + (0,0006 \pm 0,0002)V_m \quad (6)$$

$N = 12$ ;  $R = 0,9763$ ;  $S = \pm 0,0131$ .

Для оцінки значущості окремих членів рівняння, як і в попередньому випадку, використовували методику, запропоновану ЮПАК [15], яка полягає в поєднанні виключення окремих членів з кожноразовим визначенням множинного коефіцієнта кореляції для рівнянь з меншою кількістю членів. Якщо зниження  $R$  незначне, то вплив виключеного члена вважається також незначним. Так ми визначили незначущість густини енергії когезії, й отримуємо п'ятипараметрове рівняння

$$P = -0,3399 - (0,2254 \pm 0,2438)f(n^2) - (0,5493 \pm 0,1556)f(\epsilon) + (0,0002 \pm 0,0001)V_b + (0,0145 \pm 0,0018)E_t + (0,0004 \pm 0,0002)V_m \quad (7)$$

$N = 12; R = 0,9733; S = \pm 0,0140$ .

Також малозначимим виявився і член рівняння, який відповідає поляризованості розчинників, виключивши його з розрахунків, множинний коефіцієнт кореляції зменшується незначно, а відповідне рівняння набуває вигляду

$$P = -0,4062 - (0,4998 \pm 0,1517)f(\epsilon) + (0,0003 \pm 0,0001)B + (0,0140 \pm 0,0018)E_T + (0,0006 \pm 0,0002)V_M \quad (8)$$

$N = 12; R = 0,9712; S = \pm 0,0145$ .

Зауважимо, що виключення з розрахунків параметра мольного об'єму приводить до рівняння з множинним коефіцієнтом не суттєво нижчим від рекомендованого значення  $R \geq 0,95$

$$P = -0,3084 - (0,5828 \pm 0,1974)f(\epsilon) + (0,0003 \pm 0,0001)B + (0,0135 \pm 0,0024)E_T \quad (9)$$

$N = 12; R = 0,9489; S = \pm 0,0192$ .

У табл. подано відповідні розраховані й експериментальні значення  $P$ , а також їхні відхилення.

Як видно з обчислень, у цьому випадку на екстракцію гліколіпідів із водної суспензії бактерій *Pseudomonas fluorescens* 8573 впливають основність, електрофільність і полярність розчинників.

Варто зазначити, що і в першому, і в другому випадках позитивно на екстракцію гліколіпідів впливає основність розчинників.

### Висновки

Отож, з'ясовано, що дані з екстракції гліколіпідів із супернатанту культуральної рідини бактерій *Pseudomonas aureofaciens* NB-1 і *Pseudomonas fluorescens* 8573 адекватно узгоджуються з властивостями органічних розчинників за допомогою багатопараметрових рівнянь лінійності вільних енергій. За допомогою обчислень виявили, що основною характеристикою розчинників, яка впливає на процес екстракції гліколіпідів з СКР обох штамів, є основність. Добрими екстрагентами є спирти й естери, що можна пояснити сольватацією складноєфірної групи (у випадку естерів) та утворенням водневих зв'язків у випадку спиртів. Можливо, такий вплив пояснюється і паралельним розташуванням алкільних ланцюгів спирту і  $\beta$ -оксидеканової кислоти молекул гліколіпідів. Отримані дані логічно вписуються в ланцюг проведених нами досліджень [5, 6, 16]. Результати проведених досліджень важливі для правильного вибору оптимальних екстрагентів для одержання нових біотехнологічних продуктів.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Makitra R. G., Prystansky R. Ye., Flyunt R. I. The effect of solvent properties on the solubility of fullerene C60 // J. Org. Chem. 2003. 73, Vol. 8. P. 1299 – 1304 (in Russian) (DOI:10.1023/B:RUGC.0000007645.77987.b4).
2. Hoover R. R., Acree W. E., Abraham B. H. Correlation of the solubility behavior of crystalline 1-Nitronaphtalene in organic solvents with the Abraham solution parameter model // J. Solut. Chem. 2005. 34, N 10. P. 1121–1132. (<https://doi.org/10.1007/s10953-005-7691-2>).
3. Makitra R. G., Turovsky A. A., Zaikov G. E. Correlation Analysis in Chemistry of Solutions. VSP. Utrecht. Boston. 2004. 320 p. (ISBN-13: 978-9067644068).

4. *Bryck D.V., Makitra R.G., Palchikova E.Ya.* Application of the regression analysis method to generalize data on solubility of pitch // *Solid Fuel Chemistry*. 2006. № 6. P. 26–36 (in Russian).
5. *Karpenko O.V., Pokynbroda T.Ya., Makitra R.G.* Optimal methods for the isolation of biogenic surface-active rhamnolipids. // *J. Gen. Chem.* 2009. 79, №12. P. 2011 – 2014 (in Russian) (DOI: 10.1134/S1070363209120135).
6. *Karpenko I.V., Midyana G.G., Karpenko O.V., Makitra R.G., Palchikova E.Ya.* Isolation by extraction of biogenic surface-active rhamnolipids. // *J. Gen. Chem.* 2014. 84. № 7. P. 1172 – 1175 (in Russian) (<https://doi.org/10.20535/ibb.2019.3.2.165838>).
7. *Ando S., Saito M.* Chromatography lipid, biomedical research and chemical diagnostic // Amsterdam: Elsevier. 1987. P. 266 – 310 (ISBN: 9780080858401).
8. *Adler Y.P. et al.* Experiment planning in the search for optimal conditions // SU: Nauka. 1976. 380 p. (in Russian).
9. *Makitra R. G., Pirig Ya .N.* Quantitative study of the influence of medium properties on the kinetics of the oxidation of olefins with oxygen // *J. Org. Chem.* 1996. 32, N 10. P. 1468 – 1472 (in Russian) (Accession Number: WOS:A1996WL72900003).
10. *Makitra R.G., Pirig Y.N., Yatchishin I.I.* Effect of solvents on the kinetics of tetralin and cumene oxidation // *J. Org. Chem.* 1999. 35, Vol. 7. P. 1073 – 1079 (in Russian) (Accession Number: WOS: 000083411200011).
11. *Koppel I. A., Palm V. A.* Advances in Linear Free Energy Relationships. London; New York: Plenum Press. 1972. P. 203. (ISBN 978-1-4615-8660-9).
12. *Reichardt C.* Solvent and Solvent Effects in Organic Chemistry. Weinheim: Wiley- VCH. 2003. P. 199 (ISBN:9783527324736).
13. *Abboud J. L. M., Notario R.* Critical compilation of scales of solvent parameters. I. Pure, non-hydrogen bond donor solvents // *Pure Appl. Chem.* 1999. 71, N 4. P. 645. (DOI: 10.1351/pac199971040645).
14. *Makitra R.G., Pyrih Ya.N., Kyveluk R.B.* The most important characteristics of solvents used in the LFE equations. // *Dep. VINITI. Lviv*. 1986; №628. V86: p. 33 (in Ukrainian).
15. Recommendations for reporting the results of correlation analysis in chemistry using regression analysis // *Quant. Struc. Acta Relat.* 1985. 4, N. 1. – P. 29.
16. *Pokynbroda T.Ya., Karpenko O.V., Makitra R.G., Palchikova O. Ya., Rogovyk N. V., Rogovyk V. I.* Selection of optimal extractants of biologically active compounds based on the principle of free energy linearity // *Bulletin of the National University "Lviv Polytechnic"*. 2008. №622. P. 103 – 106 (in Ukrainian).

## SUMMARY

*Galyna MIDYANA<sup>1</sup>, Tetyana POKYNBRODA<sup>1</sup>, Olena KARPENKO<sup>1</sup>,  
Ihor SEMENIUK<sup>1</sup>, Olena PAL'CHIKOVA<sup>2</sup>*

**THE INFLUENCE OF THE REACTION MEDIUM ON THE EXTRACTION PROCESS OF  
GLYCOLIPIDS OF THE *PSEUDOMONAS* BACTERIA**

*<sup>1</sup>Department of the Physical Chemistry of Fossil Fuels,  
Litvinenko Institute of Physical Organic Chemistry and Coal Chemistry of  
National Academy of Sciences of Ukraine,  
Naukova St. 3a, 79060 Lviv, Ukraine  
gmidyana@gmail.com*

*<sup>2</sup>Institute of Geology and Geochemistry of Combustible Minerals of  
National Academy of Sciences of Ukraine,  
Naukova St. 3a, 79060 Lviv, Ukraine*

Optimization of the technology of isolation of biogenic surface-active products of microbial synthesis is an actual problem of modern chemistry and biotechnology. In this work, the processes of extraction of surface-active glycolipids from the cultural liquid supernatant of bacterial strains *Pseudomonas aureofaciens* NB-1 and *Pseudomonas fluorescens* 8573 were investigated.

The most problematic stage in the production of biosurfactants is their isolation from the culture liquid. Even with optimized biosynthesis, the production efficiency depends heavily on rational methods of isolation of the target products. In this connection, there is a growing need for the optimization of the processes of isolation of biosurfactants.

It is known that the main method to isolate glycolipid biosurfactants from the supernatant is to transfer them to the phase of an organic solvent. However, glycolipid biosurfactants have a complex structure; therefore, selection of the optimal solvents for their extraction is important and difficult task. It has been established, that data on the extraction of glycolipids from the cultural liquids of *Pseudomonas aureofaciens* NB-1 and *Pseudomonas fluorescens* 8573 strains adequately conform to the properties of organic solvents by means of the multiparameter linear energy equations. Using the calculations it was established that the basicity of the solvents is the main characteristic, that effects on the process extraction of glycolipids from cultural liquids of both strains. It was shown that alcohols and esters are rational extracting agents for the glycolipids, which can be explained, in the case of esters, by the solvation of the ester group and, in the case of alcohols, due to the formation of hydrogen bonds. This effect is related to the parallel position of the alkyl chains of alcohol and  $\beta$ -oxidodecanoic acid of the glycolipid molecule. The obtained results of carried out research have a great importance for the correct selection of the optimal extracting agents for obtaining of new perspective biotechnological products.

**Keywords:** multiparameter equation of LWE, solvents, extraction, glycolipids.

Стаття надійшла 03.05.2019.  
Після доопрацювання 27.06.2019.  
Прийнята до друку 28.08.2019.