

УДК 541.123.4+579.873.088.5

<https://doi.org/10.37827/ntsh.chem.2020.60.007>

*Ілона КАРПЕНКО<sup>1</sup>, Галина МІДЯНА<sup>1</sup>, Олена КАРПЕНКО<sup>1</sup>, Ігор СЕМЕНЮК<sup>1</sup>,  
Степан МІДЯНИЙ<sup>2</sup>, Олена ПАЛЬЧИКОВА<sup>3</sup>*

## **ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ЕКСТРАКЦІЇ ПРИ ВИДІЛЕННІ БІОГЕННИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РАМНОЛІПІДІВ**

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

<sup>2</sup>*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій  
ім. С.З.Гжицького, вул. Пекарська, 50, 79000 Львів, Україна*

<sup>3</sup>*Інститут геології і геохімії горючих копалин Національної академії наук України,  
вул. Наукова, 3а, 79060 Львів, Україна*

*Досліджено процеси екстрагування біодеградабельних поверхнево-активних речовин (ПАР) рамноліпідної природи – продуктів мікробного синтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. Оптиміальні екстрагенти для виділення рамноліпідів із супернатанту культуральної рідини (СКР) обрано серед 13 розчинників різної природи. Для отримання коректних висновків експериментальні результати оброблено за допомогою багатопараметрових рівнянь на основі принципу лінійності вільних енергій з використанням модифікованого рівняння Коппеля-Пальма. З'ясовано, що дані з екстракції рамноліпідів із СКР адекватно узгоджуються з характеристиками розчинників при їх узагальненні за допомогою використання шестипараметрового рівняння лінійності вільних енергій. Основними характеристиками розчинників, які впливають на процес екстракції рамноліпідних ПАР, є поляризованість і мольний об'єм. Доведено, що етери є кращими екстрагентами для рамноліпідів із СКР, що можна пояснити наявністю в них неподіленої пари електронів атома кисню. Отримані результати становлять науковий інтерес для розвитку біотехнології екологічно безпечних біосурфактантів.*

*Ключові слова: біоПАР, рамноліпід, екстракція, багатопараметрові рівняння, розчинники.*

Сьогодні велику увагу привертають поверхнево-активні речовини саме природного походження, тобто біогенні ПАР, а також їхні композиції [1]. Таку зацікавленість до цих препаратів пояснюють їхньою перспективою щодо практичного застосування в різних галузях сучасної економіки. Відомо, що біогенні ПАР мають здатність знижувати поверхневий натяг рідин, володіють цінними біологічними властивостями, тобто впливають на проникність клітинних мембран, активність

ферментів, метаболізм мікроорганізмів [2–4]. БіоПАР ефективні у широкому діапазоні рН, температур і концентрацій солей. Найважливішим є те, що вони біодеградабельні та малотоксичні.

Співробітники Відділення ФХГК ІнФОВ НАН України шляхом мікробного синтезу отримали поверхнево-активні продукти бактерій *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Gordonia* – рамноліпідні, трегалозоліпідні ПАР, полісахариди, їхні комплекси [5–7]. Досліджено фізико-хімічні та біологічні властивості, що стало підґрунтям для визначення практичного потенціалу біоПАР.

Серед продуцентів біоПАР заслуговують на увагу мікроорганізми роду *Pseudomonas*. Важливими продуктами біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 (з колекції ВФХГК ІнФОВ НАН України) є рамноліпідні молекули яких складаються з рамнози і 1- $\beta$ -оксидеканової кислоти [7]. Первинним продуктом біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 є супернатант культуральної рідини (СКР) – природний розчин поверхнево-активних метаболітів і інших компонентів (екзополісахариди, біокомплекс (рамноліпідні+полісахариди), а також жирні кислоти, протеїни, солі тощо) [5, 8]. Дуже важливим і складним питанням є підбір органічних розчинників з оптимальними екстрагуючими властивостями. Доведено, що немає однозначної залежності між екстрагуючою здатністю рідин та їхніми фізико-хімічними властивостями. Враховуючи принцип лінійності вільних енергій (ЛВЕ), дані з розчинності таких речовин, як нітронафталін, фулерен [9, 10] та інші були кількісно пов'язані з властивостями розчинників за допомогою багатопараметрових лінійних рівнянь [11]. Тривалий час такі дослідження проводили тільки для індивідуальних сполук, а також застосовували для вугільних смол [12], але рідко для аналізу результатів екстракції біоПАР [13–15]. У наших дослідженнях ми маємо справу з високомолекулярними речовинами природного походження.

Отже, мета нашої праці – дослідити процес екстракції поверхнево-активних рамноліпідів (РЛ) із супернатанту культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. Найліпший метод виділення рамноліпідів із культуральної рідини – це переведення в фазу органічного розчинника з наступним його видаленням. Але враховуючи складну структуру цих речовин, треба провести експериментальний пошук оптимального екстрагента. Тому ми визначили вихід екстракту, одержаного під час виділення цільового продукту з культуральної рідини з використанням екстрагентів різної природи.

**Об'єкт досліджень:** поверхнево-активні речовини – продукти синтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. Культивування бактерій проводили на оптимізованому поживному середовищі, джерело вуглецю гліцерин (2%) у колбах Ерленмейєра (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (WL-2000, JV Electronic, Poland) за 220 об/хв, за температури 28–30 °С впродовж 5 діб. Культуральну рідину відділяли від клітин шляхом центрифугування, до отриманого супернатанту додавали 10% розчин HCl до рН 3.0. Виділення рамноліпідів проводили шляхом одноразової екстракції 25 мл КР відповідним екстрагентом у кількості 25 мл при струшуванні з подальшим випарюванням екстракту під вакуумом (3 мм. рт. ст.). Кількість отриманих рамноліпідів визначали гравіметричним методом. Похибка визначення 0,1 г.

Відомо, що процес екстракції не узагальнюється кількісно окремою властивістю органічного розчинника, а є результатом різних видів сольватаційних взаємодій, сумісний ефект яких можна визначити за допомогою багатопараметрових рівнянь на підставі принципу лінійності вільних енергій. Оскільки сольватаційні процеси,

які відбуваються під час екстракції, молекулярні, то експериментальні дані маси екстрактів, що отримали під час використання однакових кількостей розчинників із однакової маси культуральної рідини в грамах, перераховано в кількість екстракту, одержаного у разі використання 1 моля розчинника.

Для виявлення кількісного зв'язку між властивостями екстрагентів і виходом екстракту найбільш ефективним є узагальнення даних на підставі принципу лінійності вільних енергій за допомогою модифікованого рівняння Коппеля-Пальма [11]

$$\lg G_m = a_0 + a_1 f(n^2 - 1)/(n^2 + 2) + a_2(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1) + a_3 B + a_4 E_T + a_5 \delta^2 + a_6 V_m, \quad (1)$$

де  $n$  і  $\varepsilon$  – показник заломлення та діелектрична постійна розчинників, що визначають їхню поляризованість і полярність, які відповідають за неспецифічну сольватацію. Параметри  $B$  і  $E_T$  – основність за Пальмом [16] і електрофільність за Райхардтом [17], відповідно, які визначають здатність розчинників до кислотно-основної взаємодії, тобто специфічну сольватацію. Величини  $\delta$  і  $V_m$  – параметр розчинності Гільдебрандта, квадрат якого пропорційний енергії когезії середовища, і мольний об'єм розчинників відображають вплив структурних факторів.  $a_0$  – константа швидкості реакції в газовій фазі (приймається, що в газовій фазі  $Y = P = E_T = B = 0$ ). Величини  $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, a_6$  свідчать про вплив кожного з фізико-хімічного параметрів розчинника на константу швидкості реакції і розраховують за лінійною регресією. Характеристики розчинників брали з оглядів [18, 19], розрахунки проводили згідно з рекомендаціями Групи по кореляційному аналізу в хімії при ІОПАК [20].

Згідно з принципом ЛВЕ зміна рівноваги при переході речовини з однієї фази в іншу пропорційна логарифму коефіцієнта розподілу, а не концентрації речовини. Тому формально треба працювати з величинами коефіцієнтів розподілу в молях. Проте, враховуючи, що ми маємо справу з сумішшю рамноліпідів, використовували кількість екстракту, що переходить із водної фази в 1 моль розчинника. Відповідні дані наведено в таблиці.

Пошук кореляційних залежностей, які зв'язують фізико-хімічні властивості розчинників і кількість екстрагрованої речовини, приводить до шестипараметрового рівняння з низьким значенням множинного коефіцієнта кореляції  $R = 0,8177$ . Згідно з Рекомендаціями ІОПАК проведено послідовне виключення даних для розчинників, які найбільше відхиляються з щоразовим визначенням коефіцієнтів множинної кореляції отриманих рівнянь з меншою кількістю розчинників, які аналізуються. Після виключення даних, отриманих у діетиловому етері, множинний коефіцієнт кореляції зріс до 0,8882. Після виключення даних з екстракції тетра-хлорметаном і хлороформом, для 10 розчинників, які залишилися, отримано шестипараметрове рівняння зі значенням  $R$ , яке дорівнює 0,9845 (тобто більше 0,95).

$$\begin{aligned} \lg G_m = & 0,7429 - (5,5948 \pm 0,9154) f(n^2) + (0,7864 \pm 0,5213) f(\varepsilon) - \\ & -(0,0004 \pm 0,0006) B - (0,0511 \pm 0,0149) E_T + (0,0029 \pm 0,0008) \delta^2 + \\ & + (0,0090 \pm 0,0007) V_m \end{aligned} \quad (2)$$

$$R = 0,9845; s \pm 0,0507.$$

Аналізуючи одержане рівняння, зокрема знаки при його членах, можна зробити висновок, що специфічна сольватація погіршує екстракційні процеси, а полярність середовища – сприяє екстракції.

Таблиця

Експериментальні та розраховані за рівнянням (5) значення  $\lg G_m$ 

Table

The experimental and calculated by equation (5) values of  $\lg G_m$ 

Номер з/п	Розчинник	$G_m$ г/моль	- $\lg G_m$		
			експеримент	розрахунок	$\Delta$
1	Пентан	0,4886	0,3110	0,2187	-0,0923
2	Гексан	0,7370	0,1325	0,1281	-0,0044
3	н-Декан	2,5495	-0,4065	-0,2903	0,1162
4	Толуол	0,2859	0,5438	0,5063	-0,0375
5	Тетрахлорметан*	0,7829	0,1063	0,5254	0,4191
6	Хлороформ*	0,4452	0,3514	0,6452	0,2938
7	Хлорбензен	0,2677	0,5724	0,5987	0,0263
8	н-Бутанол	0,3879	0,4113	0,5553	0,1440
9	Пентанол-2	0,3322	0,4786	0,4181	-0,0605
10	н-Октанол	0,5946	0,2258	0,1042	-0,1216
11	Етилацетат	0,4346	0,3619	0,4028	0,0409
12	н-Амілацетат	0,8211	0,0856	0,0743	-0,0113
13	Діетиловий етер*	1,4540	-0,1626	0,3133	0,4759

\* Розчинники, виключені з розрахунків.

Проте безпосередньо оцінити внесок окремих членів рівняння в сумарний ефект неможливо – величини парних коефіцієнтів кореляції між  $\lg G_m$  і окремими членами рівняння – менше 0,5, а у деяких членах стандартні відхилення навіть більші від їхньої абсолютної величини (у випадку основності). Для оцінки значимості окремих членів рівняння, згідно з Рекомендаціями ІЮПАК, по чергово виключаємо окремі члени рівняння з щоразу визначенням множинного коефіцієнта кореляції для рівняння з меншою кількістю членів. Вплив цього члена вважають незначним, якщо у разі його виключення множинний коефіцієнт отриманого рівняння залишається більше 0,95.

Виключаючи параметр основності, одержуємо п'ятипараметрове рівняння з високим коефіцієнтом кореляції, що свідчить про незначимість цього параметра.

$$\lg G_m = 0,8425 - (5,4407 \pm 0,9057) f(n^2) + (0,5991 \pm 0,4454) f(\varepsilon) - (0,0555 \pm 0,0136) E_T + (0,0031 \pm 0,0008) \delta^2 + (0,0090 \pm 0,0007) V_M \quad (3)$$

$$R = 0,9838; s \pm 0,0519.$$

Множинні коефіцієнти у разі пропуску параметрів  $n - 0,9157$ ;  $\varepsilon - 0,9805$ ;  $E_T - 0,9528$ ;  $\delta^2 - 0,9570$ ;  $V_M - 0,6003$ .

Малозначимим виявився член, який характеризує полярність розчинника, після його виключення отримуємо чотирипараметрове рівняння

$$\lg G_m = 0,6385 - (5,0865 \pm 0,9497) f(n^2) - (0,0452 \pm 0,0123) E_T + (0,0029 \pm 0,0009) \delta^2 + (0,0087 \pm 0,0007) V_M \quad (4)$$

$$R = 0,9805; s \pm 0,0569.$$

Як видно, множинний коефіцієнт кореляції знижується не суттєво. Також з'ясовано незначимість члена квадрата параметра розчинності Гільдебрандта  $\delta$ , який пропорційний енергії когезії розчинника, після його виключення отримано трипараметрове рівняння

$$\lg G_m = 0,2687 - (2,8815 \pm 1,0195) f(n^2) - (0,0053 \pm 0,0040) E_T + (0,0074 \pm 0,0009) V_M \quad (5)$$

$$R = 0,9557; s \pm 0,0851.$$

Висока величина множинного коефіцієнта ( $> 0,95$ ) засвідчує адекватність рівняння.

Подальше виключення з розрахунків членів  $f(n^2)$ ,  $E_T$  і  $V_M$  практично руйнує кореляцію, множинний коефіцієнт кореляції менше  $0,95$ .

Отже, вивчено процес екстрагування біодеградабельних поверхнево-активних речовин рамноліпідної природи з культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. Дані з екстракції рамноліпідів адекватно узгоджуються із властивостями розчинників за допомогою шестипараметрового рівняння лінійності вільних енергій. Основні характеристики розчинників, які впливають на процес екстракції, – поляризованість і мольний об'єм. Одержані результати становлять інтерес для біотехнологій екологічно безпечних поверхнево-активних речовин.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Banat M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T., Marchant R. Microbial Biosurfactants Production, Applications and Future Potential. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010. Vol. 87(2). P. 427–444. (<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>).
2. Kim H. S., Jeon J. W., Kim S. B., Oh H. M., Kwon T. J. and Yoon B. D. Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, from *Candida antarctica*. Biotechnol. Lett. 2002. Vol. b24. P.1637–1641. (<https://doi.org/10.1023/A:1020309816545>).
3. Pacwa-Plociniczak M., Plaza G. A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. Int. J. Mol. Sci. 2011/ Vol. 12. P. 633–654. (<https://doi.org/10.3390/ijms12010633>).
4. Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Kochupappu R.T., Sivachidambaram P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Current Science 2008. Vol. 94(6). P. 736–747.
5. Karpenko O. V., Makitra R. G., Pal'chikova O. Ya. Optimization of the extraction process of biosurfactants synthesized by bacteria of the genus *Rhodococcus*. Nauch. Tr. Donetsk. Nats. Univ., Ser. Khim and Khim. Tekhnol. 2011. Vol. 17(187). P. 124–128.
6. Karpenko O. V., Martinyuk N. V., Shul'ga O. N., Pokin'broda T. Ya., Vil'danova R. I., Shcheglova N. S. Surface active biopreparation. Ukraine Patent N 71792 A.15. 2004. Bull. Izobret., 2004. N12. P.4.31.
7. Karpenko O., Prystay M., Datsko B., Gafijchuk G., Nogina T. Optimization of biosynthesis of surfactants and exopolysaccharides by strain *Gordonia rubripertincta* UKM Ac-122 using mathematical methods. Biotechnology. 2011. Vol. 4(5). P. 39–44.
8. Erokhin V. A., Pokin'broda T. Ya., Karpenko O. V. Surfactants based on the biosynthesis products of the strain *Pseudomonas* sp. PS-17. Nauch. Tr. Donetsk. Nats. Univ., Ser. Khim and Khim. Tekhnol. 2008. Vol 134(10). P. 111–117.
9. Hoover R. R., Acree W. E., Abraham B. H. Correlation of the solubility behavior of crystalline 1-Nitronaphtalene in organic solvent with the Abraham solution parameter model. J. Solut. Chem. 2005. Vol. 34(10). P. 1121–1133. (<https://doi.org/10.1007/s10953-005-7691-2>).

10. Makitra R. G., Prystanskyi R. Ye., Flyunt R. I. The effect of solvent properties on the solubility of fullerene C60. *J. Org. Chem.* 2003. Vol. 73(8). P. 1299–1304 (in Russian) (<https://doi.org/10.1023/B:Rugc.0000007645.77987.b4>).
11. Makitra R. G., Turovsky A. A., Zaikov G. E. *Correlation Analysis in Chemistry of Solutions*, Utrecht: Boston VSP. 2004. 320 p. (ISBN-13:9789067644068) (<https://doi.org/10.1201/b12185>).
12. Bryck D. V., Makitra R. G., Pal'chikova O. Ya. Application of the regression analysis method to generalize data on solubility of pitch. *Chemistry of solid fuel.* 2006. Vol. 6. P. 26–36 (in Russian).
13. Karpenko I. V., Pokin'broda T. Ya., Makitra R. G., Pal'chikova O. Ya. Optimal methods of isolation of biogenic rhamnolipid surfactants. *J. Gen. Chem.* 2009. Vol. 79(12). P. 2637 – 2640. (<https://doi.org/10.1134/S1070363209120135>).
14. Karpenko I. V., Midyana G. G., Karpenko O. V., Makitra R. G., Pal'chikova O. Ya. Extraction of Biogenic Rhamnolipid Surfactants. *J. Gen. Chem.* 2014. Vol. 84(7). P. 1172 – 1175 (in Russian). (<https://doi.org/10.1134/S1070363214070202>).
15. Koretska N. I., Midyana G. G., Karpenko O. V. Optimization of Trehalose Lipids Extraction – Metabolites of *Rhodococcus erythropolis* AU-1. *Innov.Biosyst Bioeng.* 2018. Vol. 2(4). P. 246–251. (<https://doi.org/10.20535/ibb.2018.2.4.148935>).
16. 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). ([https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8660-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8660-9_5)).
17. Reichardt C. *Solvent and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH. 2003. P. 199. ISBN:9783527324736.
18. Abboud J. L. M., Notario R. Critical compilation of scales of solvent parameters. I. Pure, non-hydrogen bond donor solvents. *Pure Appl. Chem.* 1999. Vol. 71(4). P. 645. (<https://doi.org/10.1351/pac199971040645>).
19. Makitra R. G., Pirig Ya. N., Kyveluk R. B. The most important characteristics of solvents used in the LFE equations. Available from VINITI.Moscow. 1986. No 628-B86.
20. Recommendations for reporting the results of correlation analysis in chemistry using regression analysis. *Quant. Struct. Act. Relat.* 1985. Vol. 4(1). P. 29.

#### SUMMARY

*Iлона KARPENKO<sup>1</sup>, Галина MIDYANA<sup>1</sup>, Олена KARPENKO<sup>1</sup>, Ігор SEMENIUK<sup>1</sup>,  
Stepan MIDYANYI<sup>2</sup>, Олена PAL'CHIKOVA<sup>3</sup>*

#### APPLICATION OF EXTRACTION METHOD FOR ISOLATION OF BIOGENIC SURFACE-ACTIVE RHAMNOLIPIDS

<sup>1</sup>*Department of Physical Chemistry of Fossil Fuels  
of the Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry  
named after L. M. Lytvynenko of the National Academy of Sciences of Ukraine,  
Naukova St. 3a, 79060 Lviv, Ukraine  
e-mail: gmidyana@gmail.com.*

<sup>2</sup>*Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies  
Pekarska St. 50, 79000 Lviv, Ukraine*

<sup>3</sup>*Institute of Geology and Geochemistry of Fossil Fuels of the National Academy of Sciences of Ukraine,  
Naukova St. 3a, 79060 Lviv, Ukraine*

The priority task of modern biotechnology is development of the rational technologies for the microbial synthesis of practically important products. Among these products, a significant place belongs to surfactants

(biosurfactants), which are widely used in many sectors of the economy. The most problematic stage of the biosurfactants production is isolation from the post fermentative cultural liquid of bacteria-producers. Improving the efficiency of the biosurfactants production is highly dependent on rational approaches to the target products isolation. In this regard, there is an increasing need for rational, scientifically substantiated methods for their isolation and purification. Therefore, the aim of the presented work was to determine the optimal extractants for the isolation of rhamnolipid surfactants – metabolites of bacteria of *Pseudomonas* sp. PS-17 strain. For this purpose, the extraction process of rhamnolipids from the post fermentative cultural liquid supernatant has been investigated. The optimal extractants were selected among 13 organic solvents of different nature. Processing of the obtained experimental data by the method of multi-parameter equations of linearity of free energies (modified Koppel-Palm equation) made it possible to establish the relationship between the physicochemical properties of the extractants and amounts of the biosurfactants which were isolated from cultural liquid supernatant. It was shown that the data on the rhamnolipids extraction are adequately associated with the physicochemical characteristics of the solvents using a six-parameter linear equation. It was determined that the polarizability and molar volume are the main properties of solvents that affect the extraction process. The best extractants for the rhamnolipids isolation from cultural liquid supernatant of the *Pseudomonas* sp. PS-17 strain are the ethers. It can be explained by the presence of a lone pair of the electrons of oxygen in its molecule. The obtained results of the study are of scientific interest for isolation of the important and perspective biotechnological products – surface-active substances.

*Keywords:* biosurfactants, rhamnolipids, extraction, multiparameter equations, solvents.

Стаття надійшла 25.01.2020.  
Після доопрацювання 13.02.2020.  
Прийнята до друку 25.02.2020.