

Karakterizacija biosurfaktanta izolovanog iz soja *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterije vrste Pseudomonas aeruginosa proizvode seriju biosurfaktanata među kojima i ramnolipide. Da bi se bliže upoznala priroda i osobine ramnolipida proizvedenih od strane bakterija roda Pseudomonas, u ovom radu su ispitani različiti parametri kojima se karakterišu surfaktanti. Određena je emulzijska sposobnost, površinski napon i CMC vodenog rastvora ramnolipida. U cilju poređenja navedeni parametri su određeni i za komercijalno dostupne detergente SDS i DC. Dobijeni rezultati pokazuju da ramnolipidi snižavaju površinski napon vode 4.8 puta više od SDS-a i DC-a pri istim koncentracijama, dok im je emulzijska sposobnost manja 2.65 puta u odnosu na SDS i DC. Navedeni rezultati upućuju na to da bi ramnolipidi, posle optimizacije postupka proizvodnje, mogli da se koriste kao komercijalni biorazgradivi detergentski.

Uvod

Biosurfaktanti su prirodna površinski aktivna jedinjenja. U njihovoj strukturi se razlikuju dva dela, polarna (hidrofilna) „glava“ i nepolarni (hidrofobni) „rep“. Ovakva struktura omogućava biosurfaktantima da emulguju (sjedinjuju) supstance koje se inače ne bi mešale. U rastvaračima amfofilna priroda biosurfaktanata (imaju hidrofilni i hidrofobni kraj) dovodi do grupisanja molekula u micela. U polarnim rastvaračima monomerni jedinice biosurfaktanta pri grupisanju u micela orijentišu hidrofobne delove ka unutrašnjosti, a hidrofilne delove ka spoljašnjosti micela, dok je orijentacija suprotna kod nepolarnih rastvarača. Micela nastaju kada se dostigne dovoljna

koncentracija monomernih jedinica biosurfaktanta. Koncentracija surfaktanta potrebna za formiranje micela naziva se kritična micelarna koncentracija (CMC). Bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa* proizvode seriju biosurfaktanta među kojima su najzastupljeniji ramnolipidi. Ramnolipidi se sastoje od monosaharida ramnoze i β -hidroksi masne kiseline. Zbog biološke razgradljivosti i netoksičnosti ramnolipidi se primenjuju u mnogim granama savremene industrije (kozmetici, petrohemiji, prehrambenoj industriji).

Cilj ovog istraživanja je delimična karakterizacija biosurfaktanata koje proizvode *P. Aeruginosa*, emulzijska sposobnost, površinski napon vodenog rastvora i vredost CMC-a ramnolipida izolovanog iz soja *P. aeruginosa*. Detaljno upoznavanje prirode biosurfaktanata je značajno radi ispitivanja mogućnosti njihove komercijalne primene kao emulgatora.

Materijali i metode

Materijal.

- Fermentaciona tečnost *Pseudomonas aeruginosa*
- Hemikalije:
- komercijalno dostupni detergentski: natrijum-dodecil sulfata (SDS) i natrijum-dezoksiholata (DC)
 - kerozin
 - hloroform
 - metanol

Nenad Milošević (1990), Beograd, Por. Spasića i Mašere 116, učenik 4. razreda XIII beogradske gimnazije

MENTOR: Nenad Milosavić, IHTM – Centar za hemiju, Beograd

Postupak. Dobijanje fermentacione tečnosti: kultura *Pseudomonas aeruginosa*, aktivirana je pre-sejavanjem na selektivni cetrimid agar, a nakon toga na hranljivi agar. Gajena je 24 sata na 30°C. Predfermentacija se izvodi u Erlenmajerovim bocama na osnovnoj, Lauria Bertani, LB podlozi, 20 časova na temperaturi od 30°C. Fermentacija se izvodi na optimalnoj podlozi (LB podloga sa dodatkom suncokretovog ulja i detergenta), na 30°C.

Sastav optimalne podloge:

- pepton 10 g/L
- ekstrakt kvasca 5 g/L
- NaCl 5 g/L
- 0.7% w/v suncokretovog ulja
- Tween 80 g/L

Fermentacija se izvodi pet dana nakon čega se prekida, fermentaciona tečnost je zatim centrifugirana (20 min na 4000 rcf), u cilju uklanjanja ćelija.

Izolovanje ramnolipida iz fermentacione tečnosti je izvedeno taloženjem na pH 2.0 dodavanjem HCl (0.1 mol/L) u 100 mL fermentacione smeše. Zatim je talog koji sadrži ramnolipide odvojen centrifugiranjem (Harrier 15/30) na 3000 rcf tokom 15 minuta i ekstrahovan sa 150 mL smeše hloroform-metanol (2/1, vol/vol). Iz dobijene suspenzije su centrifugiranjem na 3000 rcf tokom 15:00 minuta istaložene nečistoće. Supernatant je uparen na vakuum uparivaču (Heidolph, Laborota 4001), do suva i rastvoren u vodi (Cirigliano i Carman 1985). Napravljene su rastvori ramnolipida koncentracija 1 i 0/1 g/L

Površinski napon rastvora ramnolipida je određen stalagometrijskom metodom merenja mase kapi (Holclajtner Antunović 2000). U cilju povećanja tačnosti rezultata i poređenja, na istovetan način određen je i površinski napon dva komercijalno dostupna detergenta, natrijum-dodecil sulfata (SDS) i natrijum-dezoksiholata (DC).

Emulzionna sposobnost je određena metodom kerozinske probe. U seriju epruveta iste geometrije sipano je po 1.5mL kerozina, dodato je 0.1 mL rastvora ramnolipida (0.1 g.L-1) zatim je dodato 1.5 mL vode. Smeša je vorteksovana dva minuta. Ramnolipidi su emulgovali deo kerozina i vode i nastao je međusloj. Nakon dva časa izmerena je visina emulgovanog sloja. Emulzionna sposobnost je izražena odnosom visine emulgovanog sloja i ukupne visine smeše u epruveti. Pored emulzione sposobnosti ramnolipida određene su i emulzione sposobnosti SDS-a i DC-a u cilju poređenja.

Radi određivanja CMC-a ramnolipida i SDS-a merena je električna provodljivost njihovih vodenih rastvora različitih koncentracija konduktometrom (MA5966 Iskra). Pripremljeno je 30 mL rastvora ramnolipida koncentracije 1 g/L koji je postepeno razblaživan destilovanom vodom. Elektroprovodnost je merena pri svakoj koncentraciji. Prilikom svakog razblaživanja iz rastvora je uzeto 5 mL, a dodato je 5 mL vode da bi se održala konstantna zapremina. Rastvor je mešan na magnetnoj mešalici. CMC je određena pomoću grafika zavisnosti provodljivosti datog rastvora od koncentracije površinski aktivne supstance kao tačka u kojoj se menja koeficijent pravca prave. Istim postupkom je određena CMC SDS-a (Domingues *et al.* 1997).

Rezultati

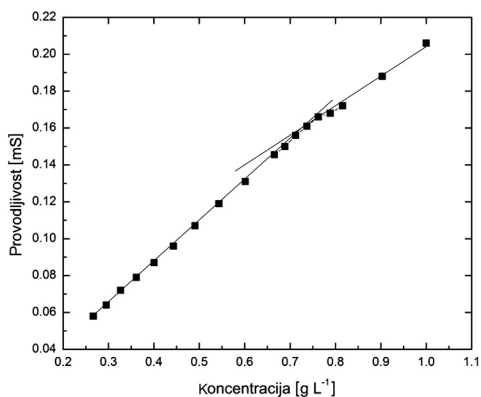
Ramnolipidi smanjuju površinski napon vode sa 72 na 26 mN/m (smanjenje od 46 mN/m) pri koncentraciji od 1 g/L i sa 72 na 42 mN/m (smanjenje od 30 mN/m) pri koncentraciji od 0.1 g/L. Rezultati su prikazani u tabeli 1.

Tabela 1. Izmereni površinski napon tečnosti na 25°C

Supstanca	Koncentracija (g/L)	Površinski napon (mN/m)
Ramnolipidi	1	25.70
Ramnolipidi	0.1	42.08
SDS	0.1	65.67
DC	0.1	65.93
Voda	–	71.97

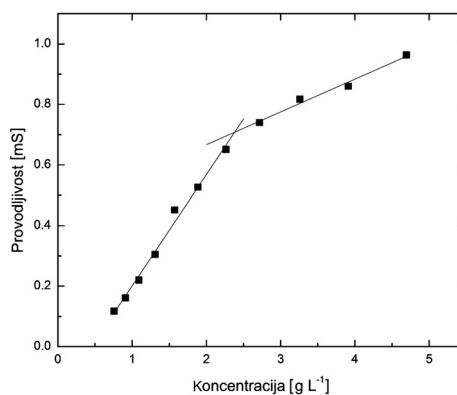
Ukoliko dobijene rezultate uporedimo sa rezultatima dobijenim za SDS i DC (tabela 1) ramnolipidi su pokazali izraženiju površinsku aktivnost. Rastvori ramnolipida su smanjivali površinski napon 4,8 puta više od rastvora SDS-a i DC-a istih koncentracija.

Rezultati merenja emulzione sposobnosti su pokazali da ramnolipidi poseduju manju emulzionu sposobnost od komercijalno dostupnih detergenata (SDS i DC) (tabela 2). Ramnolipidi su pokazali 2,65 puta manju emulzionu sposobnost od rastvora SDS-a i DC-a pri jednakim koncentracijama.



Slika 1. Zavisnost provodljivosti od koncentracije rastvora rhamnolipida

Figure 1. Conductivity against rhamnolipid concentration



Slika 2. Zavisnost provodljivosti od koncentracije rastvora SDS-a

Figure 2. Conductivity against SDS concentration

Tabela 2. Emulziona sposobnost rhamnolipida, SDS-a i DC-a

Supstanca	Emulziona sposobnost (%)
SDS	25.17
DC	21.77
Rhamnolipidi	8.84

Rezultati određivanja CMC (merjenjem električne provodljivosti rhamnolipida i SDS-a) prikazani su na slikama 1 i 2. Krična micelarna koncentracija je određena sa grafika. Za rhamnolipide iznosi 0.72, a za SDS 2.38 g/L.

Zaključak

Rhamnolipidi snižavaju površinski napon vode 4.8 puta više od SDS-a i DC-a. Emulziona sposobnost rhamnolipida je 2.65 puta manja u odnosu na SDS i DC.

Navedeni rezultati upućuju na to da bi rhamnolipidi, posle optimizacije postupka proizvodnje, mogli da se koriste kao komercijalni detergentsi. Dalja istraživanja treba sprovesti da bi se utvrdilo kakva surfaktantska svojstva poseduje fermentaciona tečnost i da li je moguće njeno korišćenje bez izdvajanja rhamnolipida. U industrijskim procesima u kojima se koriste surfaktanti uslovi (temperatura, pH) variraju.

Zbog toga bi bilo značajno ispitati uticaj promene uslova na CMC rhamnolipida.

Zahvalnost. Dugujem zahvalnost dr. Nenadu Milosaviću, sposobnom i oštrom mentoru koji me je majstorski vodio; Prof. Vesni Kuntić na podršci i opremi; mlađim i stručnim saradnicima iz ISP na strpljenju i savetima. Takođe zahvaljujem Istraživačkoj stanici Petnica i rukovodiocima programa hemije, Ljubici Perić i Nini Jevtić, što su me uveli u svet nauke.

Literatura

- Holclajtner Antunović I. D. 2000. *Opšti kurs fizičke hemije*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva
- Dominguez A., Fernandez A., Gonzalez N., Iglesias E., Montenegro L. 1997. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education*, **74**: 1227.
- Cirigliano M. C., Carman G. M. 1984. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, **50**: 846.
- Maier R. M., Soberon-Chavez G. 2000. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **54**: 625

Nenad Milošević

Characterization of Biosurfactants Isolated from *Pseudomonas aeruginosa*

Bacterial species of *Pseudomonas aeruginosa* produce series of biosurfactants, among them rhamnolipids. Different parameters were examined to establish whether rhamnolipids are convenient for commercial application: emulsification activity, surface tension and CMC of a rhamnolipid aqua solution. For comparison, the same parameters were determined for commercial detergents SDS and DC. Results have shown that rhamnolipids decrease surface tension of water 4.8 times more than SDS and DC at the same concentration, while their emulsification activity is 2.65 times lower than SDS and DC. Gathered results show that rhamnolipids, after their production is improved, could be used as commercial detergents. 