

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ БИОСУРФАКТАНТОВ: СКРИНИНГ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ТРЕГАЛОЛИПИДОВ

О.Н. Понаморева¹, Мо Лыонг², И.А. Нечаева¹

¹ Тульский государственный университет», Тула, Россия

² Российско-Вьетнамский Тропический Центр, г. Хо Ши Мин, Вьетнам

Живые организмы способны продуцировать поверхностно-активные вещества (ПАВ), из-за их биологического происхождения такие соединения получили название биоПАВ. Самыми эффективными их продуцентами являются микроорганизмы. Эти вещества находят применение в различных отраслях промышленности благодаря преимуществам перед синтетическими ПАВ. Они обладают низкой токсичностью; биоразлагаемостью; высокой поверхностной активностью и могут быть получены биотехнологически из промышленных отходов и побочных продуктов нефтепереработки [1]. БиоПАВ разделяют на два основных класса [2]: низкомолекулярные соединения, называемые биосурфактантами (липopeптиды, гликолипиды, пептиды), и высокомолекулярные полимеры (полисахариды, протеины, липополисахариды, липопротеины или комплекс этих биополимеров), которые называются биоэмульсанами [3] или биоэмульгаторами [4]. В первую группу входят молекулы, которые могут эффективно снижать поверхностное и межфазное натяжение, а ко второй относятся амфифильные и полифилльные полимеры, обладающие высокой и стабильной эмульгирующей активностью в системе «масло-вода», но не высокой поверхностной активностью [5]. По своему строению биоПАВ классифицируются на гликолипиды (рамнолипиды, трегалолипиды, софоролипиды); липopeптиды и липопротеины (сурфактин); жирные кислоты; фосфолипиды; полимерные сурфактанты; связанные биосурфактанты [1]. В настоящее время существует ограниченное предложение коммерчески доступных биосурфактантов, таких как, сурфактины, софоролипиды и рамнолипиды. Трегалоллипиды микроорганизмов менее изучены, но имеют значительный коммерческий потенциал [6]. Разнообразие новых биосурфактантов, в том числе трегалолипидов, и их микробных продуцентов является ключевым вопросом в преодолении экономических препятствий производства биосурфактантов с большой поверхностной / межфазной активностью, низкой критической концентрацией мицеллообразования (ККМ), высокой эмульгирующей способностью, хорошей растворимостью и стабильной активностью в экстремальных условиях (температура, pH, соленость). Помимо перечисляющих физико-химических свойств, коммерческие биосурфактанты должны быть экономически конкурентоспособными, поэтому второй целью скрининга является выделение штаммов бактерий, которые эффективно продуцируют биосурфактанты.

1. Скрининговые методы определения поверхностной и эмульгирующей активности

Биосурфактанты представляют собой структурно разнообразную группу молекул, поэтому большинство методов скрининга основано на их физико-химических свойствах (поверхностное натяжение, эмульгирующая активность, гидрофобная клеточной поверхности, содержание углеводов) [7, 8]. Основные методы скрининга микроорганизмов, продуцирующих биосурфактанты, основаны на характеристике межфазной или поверхностной активности.

Прямое измерение поверхностной / межфазной активности среды является наиболее простым методом исследования и подходит для предварительного скрининга микроорганизмов, которые способны продуцировать биосурфактанты. Этот метод дает четкое указание на способность микроорганизмов продуцировать биосурфактанты. Поверхностное натяжение снижается с увеличением концентрации биосурфактантов до достижения критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Если концентрация биосурфактанта находится выше значения ККМ, то более высокие концентрации невозможно определить. Эта проблема может быть решена путем серийного разбавления до тех пор, пока не будет наблюдаться резкое увеличение поверхностного натяжения. Соответствующее разбавление бесклеточной среды называется *критическим мицеллярным разбавлением* (critical micelle dilution – CMD) и коррелирует с концентрацией биосурфактанта. Для скрининга применяются несколько методов, которые могут быть использованы для измерения поверхностного и межфазного натяжения жидкости. Наибольшее применение нашел простой *метод отрыва кольца* Дю Нуи (Du-Nouy Ring), основанный на измерении силы, необходимой для отсоединения кольца на границе двух жидких фаз или на поверхности раздела фаз «жидкость / воздух». Уменьшение поверхностного натяжения на границе «вода-воздух» до 40 мН/м и ниже, свидетельствует о присутствии биосурфактантов в культуральной среде [9].

Эффективными продуцентами биосурфактантов являются бактериями, которые способны снижать поверхностное натяжение среды больше чем на 20 мН/м, по сравнению с дистиллированной водой [10].

Определение эмульгирующей активности

Индекс эмульгирования. Метод, основанный на способности биосурфактантов эмульгировать две несмешивающиеся жидкости, разработан Купером и Голденбергом [9]. Для определения индекса эмульгирования к воде добавляют гидрофобный субстрат (керосин, гексадекан или др.), интенсивно встряхивают и измеряют высоту стабильного слоя эмульсии через 24 часа (индекс эмульгирования E24) рассчитывается как отношение высоты слоя эмульсии к общей высоте жидкости. биосурфактантов, но не коррелирует с их поверхностной активностью. С помощью такого простого метода легко проводить скрининг бактерий, способных продуцировать биоэмульгаторы трегалолипидной природы [11].

Гидрофобность клеточной поверхности.

В зависимости от механизма поглощения углеводов микроорганизмы могут обладать высокой и / или низкой поверхностной гидрофобностью. Как правило, те микроорганизмы, которые способны поглощать углеводороды путем прямого контакта, демонстрируют высокую гидрофобность клеточной поверхности. Гидрофобность клеточной поверхности определяют по адгезии микроорганизмов к углеводородам или гидрофобной поверхности полистирола.

Бактериальная адгезия к углеводородам (БАТН). является простым фотометрическим методом для определения гидрофобности клеточной поверхности, который основан на степени сцепления клеток с каплями жидких углеводородов [12]. После перемешивания биомассы микроорганизмов в водной среде с гидрофобным субстратом определяют изменение мутности водной среды. Снижение мутности водной фазы коррелирует с гидрофобностью клеток, которые взаимодействуют с гидрофобным субстратом и поднимаются в верхнюю фазу при расслаивании смеси.

Количественное определение реплик заключается в присоединении бактериальных штаммов к гидрофобному полистиролу, что коррелирует с гидрофобностью клеточной поверхности [26]. На плоский стерильный диск из полистирола вносят агар, содержащий колонии для исследования. Колонии, которые появились на поверхности полистирола, промывают проточной водой для удаления всех клеток, не связанных с гидрофобной поверхностью. Для визуализации прилипших колоний они фиксируются и окрашиваются. Для выделения гидрофобных штаммов реплика может быть перенесена на новую стерильную чашку с агаром [13]. Идентификация и выделение потенциальных штаммов могут быть объединены в один этап исследования.

2 Выделение, характеристика и очистка трегалолипидных биосурфактантов

Для выделения биосурфактантов из водных сред используют метод экстракции полярными органическими растворителями. Наиболее часто используют системы хлороформ–метанол [14–16]. Для выделения гликолипидных биосурфактантов используют также метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ), который менее токсичен по сравнению с хлороформом и метанолом [17]. Трегалоллипиды из бесклеточной среды можно экстрагировать и другими системами полярных органических растворителей (этилацетата–метанола) [18]. Еще одним подходом для выделения биосурфактантов является кислотное осаждение, что продемонстрировано на примере рамнолипидов, сурфактина и моно- и дисукцинилтретгалоллипидов [19]. Содержание гликолипидов в культуральной или бесклеточной среде можно определить косвенно через содержание сахаров с использованием антронового реагента [20]. Принцип колориметрического анализа заключается во взаимодействии антронового или нафтольного реагента с остатками сахаров с образованием окрашенного соединения. Для количественного определения также используют фенольный реагент [21]. Однако, этот метод не является специфичным, так как с этими реагентами взаимодействуют любые сахара, находящиеся в культуральной среде, поэтому для специфического определения трегалолипидов следует применять методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Разделение трегалолипидов обычно проводят с использованием либо тонкослойной хроматографии (ТСХ), либо препаративной колоночной хроматографии. ТСХ – один из наиболее часто используемых методов для качественной характеристики биосурфактантов. В качестве стационарной фазы используют пластины с силикагелем. Для разделения компонентов в смеси гликолипидных биосурфактантов используют системы: хлороформ–метанол–вода (65:15:2), хлороформ–метанол–уксусная кислота–вода [22, 23] и другие полярные системы, в состав которых входит хлороформ как основной компонент, в котором хорошо растворимы гликолипиды.

ТСХ широко используется для обнаружения гликолипидов в липидном экстракте, а также для получения информации о типе биосурфактантов (гликолипиды, липопептиды, фосфолипиды и т. д.). Наиболее часто гликолипиды обнаруживают с использованием нафтольного реагента в виде сине-фиолетовых полос.

Крупномасштабную очистку гликолипидов проводят с использованием колоночной хроматографии. Однако это является трудоемкой задачей, так как трегалолипиды, обычно, являются минорным компонентом в липидном экстракте. Присутствие в смеси различных структурных типов трегалолипидов, других соединений липидной природы и избытка *n*-алкана, используемого в качестве субстрата, еще усложняет процесс очистки. Для оптимизации метода очистки целевых трегалолипидов колоночной хроматографией была предложена предварительная стадия флэш-хроматографии для удаления избытка углеводородов гексаном перед колоночной хроматографией [22], что было успешно использовано при выделении трегалолипидов родоккоков, продуцируемых при пониженной температуре на гексадекане [16].

3 Определение структуры трегалолипидов

Идентификация структуры трегалолипидов может быть проведена с использованием комплекса методов, некоторые из которых основаны на изучении структуры самой молекулы, а в других необходимо разрушить молекулу на составные компоненты (углеводную часть, жирные кислоты и т. д.). Масс-спектрометрия и C^{13} -ЯМР являются наилучшими методами для структурной характеристики интактных молекул. Анализ полного масс-спектра трегалолипидов позволяет определить молекулярную массу присутствующих гликолипидных биосурфактантов [23]. Для определения структуры используют метод tandemной масс-спектрометрии с различными методами ионизации: бомбардировка быстрыми атомами (FAB/MS) [24], метод электроспрея (ESI-MS) [14, 25–27] и ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы (МАЛДИ, MALDI) [28]. Наиболее часто используемый метод – масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением. Однако в этом методе при изучении гликолипидов применяют режим положительной ионизации, который может осложнить интерпретацию результатов из-за наличия как протонированных ионов, так и натриевых или калиевых аддуктов. Поэтому ESI-MS в режиме отрицательных ионов может быть лучшей альтернативой, что было продемонстрировано в исследовании с использованием ВЭЖХ-МС [29].

ЯМР можно также использовать для характеристики трегалолипидов, либо после их гидролиза. ЯМР-анализ полной молекулы относительно трудно интерпретировать, поэтому анализ трегалозной части является более предпочтительным, предоставляя информацию, которая помогает охарактеризовать положение, в котором жирные кислоты присоединяются к углеводной структуре [14, 19, 25].

Газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором (ГХ/МС) широко используется для характеристики остатков жирных кислот, входящих в состав трегалолипидов. После преестерификации с метанолом липидная часть трегалолипидов превращается в метиловые эфиры жирных кислот, что обеспечивает возможности их идентификации методом ГХ или ГХ/МС. Жирнокислотный состав трегалолипидов важен для подтверждения структуры трегалолипидов [26, 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для выявления способности бактерий продуцировать биосурфактанты наиболее простым в исполнении и достоверным является метод определения поверхностного натяжения на границе раздела «вода-воздух». Гликолипиды можно обнаружить качественными реакциями с фенолами. Для их выделения и очистки используют метод экстракции полярными растворителями и адсорбционную хроматографию на силикагеле. Для выделения индивидуальных компонентов используют методы высокоэффективной хроматографии. Химическую структуру гликолипидов определяют с помощью комплекса методов физико-химического анализа.

Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки России (проект FEWG-2020–008)

ЛИТЕРАТУРА

1. Desai J.D. and Banat I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential // *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997. V. 61. № 1. P. 47–64.
2. Neu T.R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces // *Microbiol Rev.* 1996. V. 60. № 1. P. 151–166.
3. Ron E.Z. and Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants // *Environ Microbiol.* 2001. V. 3. № 4. P. 229–236.
4. Smyth T.J.P., et al. Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants in Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Timmis K.N. (ed). – Springer Berlin Heidelberg: Berlin. – 2010. P. 3687–3704.
5. Smyth T.J.P., et al. Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids in Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols / McGenity T.J. (ed.) – Springer Berlin Heidelberg: Berlin. 2014. P. 32.
6. Лыонг Т.М., et al. Бактерии-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus* – потенциальные продуценты биосурфактантов // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2016. № 1. С. 50–60.
7. Biosurfactants. Advances in experimental medicine and biology / Sen R. (ed). – Springer Science. New York. 2010. – 361p
8. Лыонг Т.М., et al. Изучение эмульгирующих свойств бактерий-деструкторов углеводов нефти // *Актуальная биотехнология.* 2014. № 3(10). С. 108–110.
9. Cooper D.G. et al. Surface-active agents from two *Bacillus* species // *Appl Environ Microbiol.* 1987. V. 53. № 2. P. 7.
10. Willumsen P.A. and Karlson U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers // *Biodegradation.* 1996. V. 7. № 5. P. 415–423.
11. Лыонг Т.М., et al. Влияние температуры на биодеградацию гексадекана бактериями-нефтедеструкторами *Rhodococcus* sp. X5 – эффективными продуцентами гликолипидных биосурфактантов // *Биотехнология.* 2017. Т.33. № 6. С. 49–56.
12. Rosenberg M. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity // *Appl Environ Microbiol.* 1981. V. 42. № 2. P. 375–377.
13. Pruthi V. and Cameotra S.S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique // *Biotechnology Techniques.* 1997. V. 11. № 9. P. 671–674.
14. Niescher S., et al. Identification and structural characterization of novel trehalose dinocardiomycolates from n – alkane – grown *Rhodococcus opacus* 1CP // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006. V. 70. P. 605–611.
15. Лыонг Т.М., et al. Структура и физико-химические свойства гликолипидных биосурфактантов, продуцируемых бактериями-нефтедеструкторами *Rhodococcus* sp. X5 // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2017. Т.7. № 2. С. 72–79.
16. Luong T.M., et al. Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at low temperature // *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2018. V.34. P.20–29.
17. Kuyukina M.S., et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // *J Microbiol Methods.* 2001. V. 46. № 2. P. 149–56.
18. Marques A.M., et al. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7 // *Chem Phys Lipids.* 2009. V. 158. № 2. P. 110–7.
19. Uchida Y., T.R., Chino M., Hirano J., Tabuchi T. Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // *Agric Biol Chem.* 1989. V. 53. № 3. P. 6.
20. Hodge J.E. and Hofreiter B.T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R.L. and Wolfrom, M.L. (ed). – Academic Press. New York. 1962. P. 380–394.
21. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal Chem.* 1956. V. 28. № 3. P. 350–356.
22. Smyth T.J.P., Rudden M., Tsoulos K., Marchant R., Banat I.M. Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids in Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols / McGenity T.J. (ed.) – Springer Berlin Heidelberg: Berlin. 2014. P. 32.
23. White D.A., Hird L.C., Ali S.T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026 // *J Appl Microbiol.* – 2013. V. 115. № 3. P. 744–55.
24. Ueda S.F., Naka N., Sakaguchi T., Ozeki I., Yano Y., Kasama I., Kobayashi T. Structure-activity relationship of mycoloyl glycolipids derived from *Rhodococcus* sp. 4306 // *Microb Pathog.* 2001. V. 30. № 2. P. 91–9
25. Tuleva B., Cohen R., Stoev G., Stoinea I. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain // *J Appl Microbiol.* 2008. V. 104. № 6. P.1703–10.
26. Rapp P. and Gabriel-Jurgens L.H. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase // *Microbiology.* 2003. V. 149. № 10. P. 2879–90.
27. Petrikov K., et al. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure. *Process Biochemistry.* 2013. V.48. P.931–935.
28. Kai M., et al. Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae* // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. № 18. P. 3345–50.
29. Marques A.M., et al. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7 // *Chem Phys Lipids.* 2009. V. 158. № 2. P. 110–7.
30. Peng F., L.Z., Wang L., Shao Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants // *J Appl Microbiol.* 2007. V. 102. № 6. P.1603–11.