

## Anna TRUSEK-HOŁOWNIA, Andrzej NOWORYTA

e-mail: anna.trusek-holownia@pwr.edu.pl

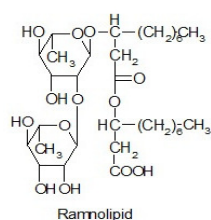
Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

# Otrzymywanie ramnolipidu w bioreaktorze membranowym

## Wstęp

Związki hydrofobowe transportowane są do wnętrza komórek bakterii najczęściej w postaci mikrokropel. Tworzą się one poprzez dyspersję fazy organicznej (substratowej) w obecności biosurfaktantów wytwarzanych przez te mikroorganizmy. Przykładowo alkanyle wyższe dostają się do wnętrza komórek wewnątrz miceli utworzonych z surfaktantu wchłanianych przez hydrofobową powierzchnię ściany komórkowej [Guzik i in. 2010].

(Bio)surfaktanty są związkami chemicznymi, które charakteryzują się budową amfifilową. Do najpowszechniej występujących, w ujęciu strukturalnym, zalicza się glikolipidy, soforolipidy, trehalolipidy, liposacharydy, polipeptydy i fosfolipidy. Najpowszechniejszą i najlepiej zbadaną klasą biosurfaktantów wytwarzanych przez drobnoustroje są ramnolipidy należące do glikolipidów. Hydrofilową część tworzą cząsteczki ramnozy, zaś hydrofobowy „ogon” – kwas  $\beta$ -hydroksydekanowy (Rys. 1). W zależności od liczby cząsteczek ramnozy (1 lub 2) i kwasu (od 1 do 3 cząsteczek) wyróżnia się 6 typów ramnolipidów. Średnia masa cząsteczkowa ramnolipidów wynosi 577 Da. Długość łańcucha kwasów tłuszczowych wpływa na hydrofobowość cząsteczki, natomiast obecność dwóch cząsteczek ramnozy powoduje wzrost hydrofilowości. Różnice w budowie chemicznej mogą mieć wpływ na takie właściwości ramnolipidów, jak aktywność powierzchniowa oraz stabilność w roztworach wodnych [Wei i in., 2008].



Rys. 1. Schemat cząsteczki di-ramnolipidu

Głównym producentem ramnolipidów (różnego typu) są bakterie z gatunku *Pseudomonas*, a w szczególności szczep *Pseudomonas aeruginosa*. W hodowli wykorzystywane są zarówno substraty hydrofobowe, jak i hydrofilowe [Sim i in. 1997, Chayabutra i in. 2001]. Szczególne znaczenie ma produkcja przebiegająca z równoczesną biodegradacją (oczyszczaniem cieczy) np. wyższych alkanów, n-parafin, kwasów tłuszczowych itd. Synteza ramnolipidów jest uzależniona od stężenia komórek w hodowli i jest najbardziej efektywna, gdy mikroorganizmy wejść w stacjonarną fazę wzrostu. Istotny wpływ na produkcję tych związków ma skład pożywki. Ograniczenie składników mineralnych skutkuje zmniejszeniem wzrostu drobnoustrojów oraz zwiększeniem produkcji ramnolipidów [Bednarski i Adamski, 1999].

Analiza znanych sposobów produkcji ramnolipidów była asumptem do podjęcia badań nad określeniem możliwości ich wytwarzania w bioreaktorze membranowym (MBR). Celem badań było porównanie wyników z hodowli okresowej, z hodowli z dozowaniem substratu a następnie z hodowli w MBR. Określono współczynnik retencji ramnolipidu na stosowanej membranie ceramicznej. Przy korzystnym (niskim) współczynniku retencji możliwe jest uzyskanie równoczesnej separacji produktu z zawrotem do bioreaktora komórek mikroorganizmów i nieprzereagowanego substratu. Sprawdzono, czy wysokiej produkcji ramnolipidu w MBR sprzyja wysoka koncentracja biomasy oraz czy w tych warunkach korzystnej zmianie uległy współczynniki wydajności (zmniejszenie współczynnika wydajności biomasy ( $Y_{X/S}$ ) a zwiększenie współczynnika wydajności produktu ( $Y_{P/S}$ ) [Trusek-Holownia, 2011]).

## Materiały i metody

W badaniach wykorzystano szczep *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 (PAN, Wrocław) jako mikroorganizm zdolny do biodegradacji alkanów oraz produkcji biosurfaktantów takich jak ramnolipidy.

Skład pożywki został dobrany na podstawie studiów literaturowych oraz wstępnych badań nad produkcją ramnolipidów. Ostatecznie zdecydowano się na następujący skład na 1 litr:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,8g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,0,  $\text{KNO}_3$  0,3g,  $\text{NaCl}$  0,5g,  $\text{MgSO}_4$  0,5g,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,9g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6,7g,  $\text{CaCl}_2$  1,1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,0g,  $\text{FeCl}_3$  0,023g. Jako źródło węgla stosowano heksadekan.

Hodowle prowadzono w bioreaktorze (*BioFlow*, *New Braunshwick*), w temperaturze 32°C, przy napowietrzaniu na poziomie 1 Lpm oraz maksymalnych (100%) obrotach mieszadła. W celu lepszej emulgacji substratu zastosowano dodatkowe (drugie) mieszadło łopatkowe umieszczone na wysokości granicy międzyfazowej. Hodowle okresowe prowadzono w objętości 1 litra, z czego objętość fazy substratowej (heksadekanu) wynosiła w poszczególnych eksperymentach od 1÷6 % v/v. Na postawie przebiegu ubytku substratu w tych hodowlach zaplanowano hodowle z takim dozowaniem substratu, aby jego ilość utrzymywana była na stałym poziomie od 1÷6% objętości bioreaktora. Hodowle prowadzono przez 24÷26 dni.

W przypadku MBR do bioreaktora zawierającego 1,8 litra medium podłączono moduł zewnętrzny zawierający jednokanałową membranę ceramiczną Filtanium (TAMI),  $A=0,005 \text{ m}^2$ , o punkcie odcięcia 150 kDa. Przy stosowanym stałym ciśnieniu transmembrańowym równym 0,21 MPa przez pierwszą dobę strumień spadał od 0,91 do 0,36 L/h. Następnie utrzymanie strumienia na poziomie 0,36-0,38 L/h było możliwe przez czas trwania procesu (19 dni). Nie stosowano strumienia upustu biomasy, w związku z tym układ pracował w stanie nieustalonym. Strumień opuszczający instalację równał się co do wielkości dwóm strumieniom wprowadzonym: głównemu strumieniowi zawierającemu pożywkę oraz strumieniowi substratu dozowanemu raz na godzinę ( $Q=0,3 \text{ mL/h}$ ). Stężenie startowe substratu w reaktorze wynosiło 2% v/v. Moduł membranowy podłączono po dobie pracy bioreaktora działającego w trybie okresowym.

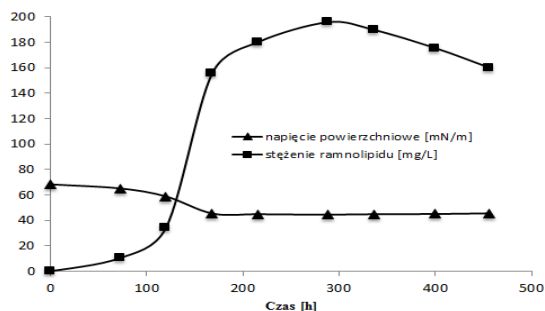
W trakcie procesu monitorowano stężenie komórek w fazie wodnej, napięcie powierzchniowe oraz stężenie ramnolipidu. OD biomasy oznaczano przy 550 nm. Wykorzystując krzywą standardową przygotowaną metodą suchej masy  $A_{550} = 3,56 \cdot C \text{ [g/L]}$  określono stężenie komórek. Wyniki te należy traktować jedynie orientacyjnie, gdyż znaczna część komórek pozostawała w fazie zemułgowanej w górnej warstwie bioreaktora, co wpływało na zaniżenie wartości oznaczanej w fazie wodnej.

Przed wykonaniem pomiarów napięcia powierzchniowego i testu na stężenie ramnolipidu, bakterie oraz fazę organiczną z próbki pobranej z reaktora 2-krotnie odwirowywano w wirówce o obrotach 6000 rpm oraz przefiltrowywano przez filtr o porach 20µm. Pomiaru napięcia dokonano przy użyciu tensjometru *Krüess K100*. W celu określenia stężenia ramnolipidu w mieszaninie hodowlanej zastosowano metodę kolorymetryczną opisaną w literaturze [Chandrasekaran i BeMiller, 1980]. Polega ona na hydrolizie ramnolipidu w obecności stężonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , a następnie reakcji otrzymanej ramnozy z orcyzną, w wyniku której powstaje barwny produkt. Z absorbancji przy  $\lambda = 505 \text{ nm}$  wobec ślepej próby, przy wykorzystaniu krzywej standardowej  $A_{505} = 0,698 \cdot C \text{ [g/L]}$  oznaczano stężenie ramnolipidu w poszczególnych próbach z reaktora.

## Wyniki i dyskusja

Przykładowe wyniki z hodowli okresowej, prowadzonej przy 2% v/v heksadekanu przedstawiono na rys. 2.

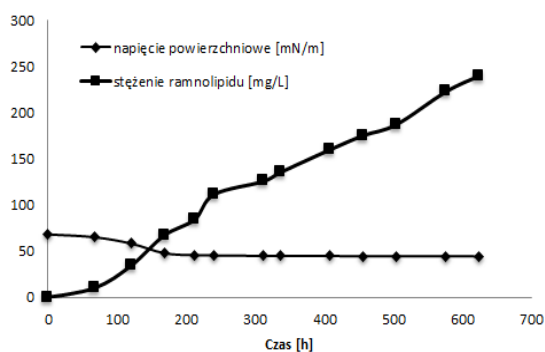
Wraz ze wzrostem ilości wprowadzonego do reaktora substratu wzrastało maksymalne stężenie biomasy w fazie wodnej od 0,22 g/L (przy 1% v/v) do 0,44 g/L (przy 6% v/v). Równocześnie wzrastało maksymalne stężenie ramnolipidu od wartości 154 mg/L (przy 1% v/v) do 220 mg/L (przy 6% v/v).



Rys. 2. Zmiana napięcia powierzchniowego oraz stężenia ramnolipidu w trakcie hodowli okresowej (2% v/v heksadekanu)

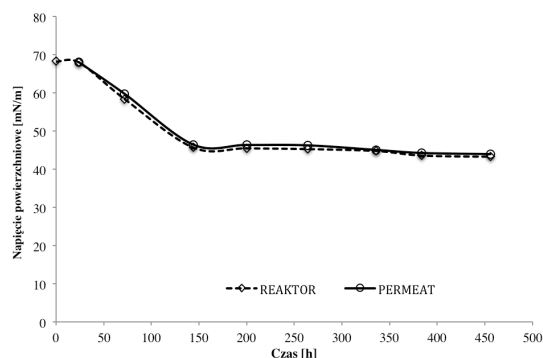
Wartości te wskazują, że nie jest zachowana stała wartość współczynnika wydajności biomasy oraz współczynnika wydajności produktu. Obecność biosurfaktantu skutkowałą obniżeniem napięcia powierzchniowego do wartości 44÷45 mN/m (niezależnie od wprowadzonej ilości substratu). Czas trwania hodowli (do momentu całkowitego wyczerpania substratu) wynosił od 5 (przy 1% v/v) do 24 dni (przy 6% v/v).

W drugim etapie badań sprawdzono czy stopniowe dostarczanie substratu skutkować będzie lepszą wydajnością wytwarzania biosurfaktantu. W trakcie tych procesów obserwowano znacznie lepszą emulgację medium hodowlanego. Przykładowe wyniki przy utrzymywaniu objętości substratu w układzie na poziomie ok. 2% v/v (szybkość zużycia substratu oszacowano na podstawie hodowli okresowych) przedstawiono na rys. 3. W trakcie tego procesu obserwowano stale wzrastające stężenie ramnolipidu. Współczynnik  $Y_{Pr/S}$  utrzymywał się na stałym, ale niskim poziomie i wynosił 0,0048÷0,005.



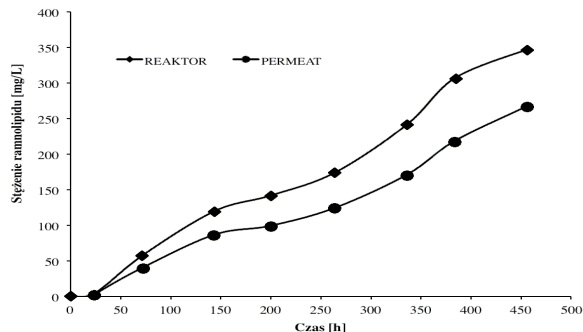
Rys. 3. Zmiana napięcia powierzchniowego oraz stężenia ramnolipidów trakcie hodowli z dozowaniem substratu okresowej (utrzymanie ok. 2% v/v heksadekanu w reaktorze).

W etapie trzecim prowadzono proces z odbiorem ramnolipidu w procesie *fine*-ultrafiltracji. Stosowana membrana w pełni zatrzymywała biomasę oraz heksadekan zawracany do bioreaktora.



Rys. 4. Zmiana napięcia powierzchniowego w trakcie hodowli z separacją membranową ramnolipidu (utrzymanie ok.2% v/v heksadekanu w reaktorze).

Na rys. 4 i 5 przedstawiono odpowiednio zmiany napięcia powierzchniowego i stężenia ramnolipidu w reaktorze (nadawie do modułu membranowego) oraz permeacie. Uśredniony współczynnik retencji ramnolipidu wynosił 0,292, co świadczy o zadowalającym przechodzeniu związku przez pory membrany. Współczynnik  $Y_{Pr/S}$  utrzymywał się na stałym poziomie i wynosił 0,0075.



Rys. 5. Zmiana stężenia ramnolipidu w trakcie hodowli z separacją

## Wnioski

Wyniki Uzyskane w wyniku badań pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

- Szczep *P. fluorescens* biodegradując alkanę wyższe jest zdolny do wytwarzania biosurfaktantu, oznaczonego jako ramnolipid.
- W wyniku działania biosurfaktantu napięcie powierzchniowe spadało osiągając graniczną wartość 43÷44 mN/m. Widoczna była również silna emulgacja układu wzrastająca ze stężeniem ramnolipidu.
- Wytwarzaniu ramnolipidu sprzyja stopniowe dodawanie substratu.
- Zastosowanie membrany pozwalającej na odbiór biosurfaktantu ze strefy reakcji wpłynęło na wzrost produkcji ramnolipidu o ok. 50%.
- Permeat uzyskany z membrany o współczynniku odcięcia 150 kDa jest wolny od komórek i nieprzereagowanego substratu. Stężenie ramnolipidu wynosiło ok. 70% jego stężenia w reaktorze.

## LITERATURA

- Bednarski W., Adamczak M., 1999. Biotechnologiczne metody otrzymywania związków powierzchniowo aktywnych. Część II. Synteza związków powierzchniowo aktywnych przez mikroorganizmy. *Biotechnologia*, **4**, 24-44
- Chandrasekaran E.V., BeMiller J.N., 1980. *Constituent analysis of glycosaminoglycans* [in:] Whistler R.L. Methods in carbohydrate chemistry. Academic Press, New York **8**, 89-94
- Chayabutra C., Wu J., Ju L.-K., 2001. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 25-33. DOI: 10.1002/1097-0290(20010105)72:13.0.CO;2-J
- Guzik U., Wojcieszynska D., Krysiak M., Kaczorek E., 2010. *Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych*. *Nafta-Gaz*, **11**, 1019-1027
- Sim L., Ward O.P., Li Z.-Y., 1997. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 232-238
- Trusek-Holownia, A., 2011. *Membrane Bioreactors – Models to Process Design*. Balaban Publications, USA
- Wei Y-H., Cheng C-L., Chien C-C., Wan H-M., 2008. Enhanced di-rhamnolipid production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16. *Proc. Biochem.*, **43**, 769-774. DOI: 10.1016/j.proc bio.2008.03.009

Praca była realizowana w ramach projektu S40616/Z0311 z działalności statutowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.