

PRODUKCE A CHARAKTERIZACE KVASINKOVÉHO BIOSURFAKTANTU A TESTOVÁNÍ JEHO PŮSOBNÍ NA PŮDNÍ MIKROORGANISMY

MAREK ŠÍR^a, KRISTINA LHOTSKÁ^a, MARTIN
BYSTRIANSKÝ^a a JIŘÍ MIKEŠ^b

^a Ústav chemie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b EPS
s.r.o., V Pastouškách 205, 68604 Kunovice
sirm@vscht.cz

Došlo 30.10.14, přijato 25.11.2014.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby
urychleného publikování.

Klíčová slova: biosurfaktant, kvasinka, dehydrogenasová
aktivita, sanační promývání, ropné uhlovodíky, dekonta-
minace

Úvod

Biosurfaktanty zahrnují širokou skupinu látek pře-
vážně lipidové povahy produkovaných řadou mikroorga-
nismů¹. Mezi konkrétní zástupce biosurfaktantů a jejich
nejvýznamnější producenty lze zařadit např. rhamnolipidy
(*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp.), trehalolipi-
dy (*Arthrobacter paraffineus*, *Corynebacterium* sp.,
Mycobacterium sp.), sophorolipidy (*Candida apicola*,
Candida bombicola, *Yarrowia* sp.), polyollipidy
(*Rhodotorula glutinus*, *Rhodotorula graminus*) nebo gly-
kolipidy (*Alcanivorax borkumensis*, *Arthrobacter* sp.)².

Sophorolipidy (SL) jsou extracelulární kvasinkové
biosurfaktanty, které se skládají z hydrofilní sacharidové
části tvořené sophorosou a z hydrofobní části tvořené
mastnou kyselinou, které jsou spojeny β-glykosidickou
vazbou. Karboxylový konec řetězce mastné kyseliny může
být volný, pak hovoříme o kyselé neboli otevřené formě
SL. Spojením karboxylové skupiny s hydroxylovou skupi-
nou sophorosy dojde ke vzniku cyklického laktonu, pak
hovoříme o laktonické formě SL³. Právě spojení hydrofilní
a hydrofobní části molekuly propůjčuje biosurfaktantům
(stejně jako syntetickým surfaktantům) jedinečné vlastnosti.

Působením biosurfaktantů dochází ke snížení povr-
chového napětí a také mezifázového napětí na rozhraní
polární/nepolární fáze. Při dosažení určité koncentrace
biosurfaktantu v roztoku – tzv. kritické micelární koncen-
trace (KMK) – dochází ke zvýšení rozpustnosti a mobility
hydrofobních látek v důsledku jejich inkorporace do micel
tvořených biosurfaktantem. Roztoky biosurfaktantů mohou
být použity pro odstraňování kontaminantů životního pro-
středí procesem sanačního promývání, přičemž mohou
vykazovat obdobnou účinnost jako syntetické surfaktanty.

Jejich výhodou může být nižší toxicita vůči specifickým
mikroorganismům⁴, nebo lepší biologická rozložitelnost⁵.

Při využití roztoku biosurfaktantů v sanačním promý-
vání zůstává část biosurfaktantu v zemině v důsledku sorp-
ce a v pórech a ovlivňuje tak kvalitu půdy a přítomné orga-
nismy. Pro testování působení biosurfaktantů v teres-
trickém prostředí mohou být použity testy s organismy
charakteristickými pro tuto matici, jako jsou např. roupice
Enchytraeus crypticus a chvostokoci *Folsomia candida*⁶.
V případě rozšíření testů na vodní prostředí lze využít
např. korýše žábřonozkou slaništní (*Artemia salina*) nebo
korýše hrotnatku velkou (*Daphnia magna*)⁷.

Jednou z dalších možností, jak stanovit vliv bio-
surfaktantu přímo na půdní mikroorganismy, je provedení
testu dehydrogenasové aktivity (DHA). Test DHA byl
vyvinut k určení mikrobiálního oživení půd a k určení
přímého vlivu čistých chemických látek na nespecifická
půdní společenstva. Dehydrogenasy jsou enzymy dýchací-
ho řetězce, které hrají významnou úlohu v energetické
produkci organismů tím, že se podílí na oxidaci organ-
ických látek. Dehydrogenasová aktivita slouží jako indikátor
biologických redoxních systémů a udává tak mikrobiolo-
gickou aktivitu v půdě.

V předchozích studiích byl pomocí testu DHA např.
sledován vliv průmyslových hnojiv na mikrobiologickou
aktivitu v zemědělsky využívaných půdách^{8,9}, vliv odpad-
ních materiálů ze sklářského průmyslu na oživení půd¹⁰,
nebo byla posuzována schopnost mikroorganismů využívat
jako substrát hlušinu po těžební činnosti¹¹. Pomocí testu
DHA byla také sledována toxicita jednotlivých chemi-
ckých látek jako jsou těžké kovy¹², herbicidy¹³ nebo pesti-
cidy¹⁴.

Cílem provedené studie bylo určit, zda aplikovaný
roztok biosurfaktantu má stimulační nebo inhibiční efekt
na přirozeně se vyskytující půdní společenstva.

Experimentální část

Produkce a izolace biosurfaktantu

Producentem biosurfaktantu byla kvasinka *Yarrowia
lipolytica*. Kultivace probíhala v kapalném médiu v Erl-
enmayerově baňce o objemu 2 litry, která byla umístěna na
horizontální třepačce a třepána frekvencí 120 otáček za
minutu. Produkční médium obsahovalo dva různé zdroje
organického uhlíku – glukosu (10 g l⁻¹) a rostlinný olej
(10 g l⁻¹). Dalšími složkami média byl kvasniční extrakt,
pepton a minerály. Kultivace probíhala při pokojové teplotě
20–25 °C. Během prvních 48 hodin kultivace došlo
k poklesu pH z hodnoty 6,5 na 3,0. Hodnota pH nebyla
upravena přidávkou pufru. Pro stanovení relativního obsa-
hu biosurfaktantu v produkčním médiu byla zvolena meto-
da oil spreading. Postup stanovení byl následující: ke
30 ml destilované vody v Petriho misce bylo přidáno 15 μl
oleje. Dále bylo přidáno 5 ml produkčního média dopro-
střed misky. Relativní množství biosurfaktantu bylo sta-
noveno podle průměru čiré zóny. Produkční proces byl

zastaven po 144 hodinách kultivace a následně byl izolován surový biosurfaktant.

Po ukončení kultivace bylo produkční médium vystaveno působení ultrazvuku po dobu 20 min ve vodní lázni PS04000A (Notus-POWERSONIC Ltd.). Poté bylo médium extrahováno ethylacetátem v objemovém poměru 1:1. Ethylacetát byl následně odpařen na rotační vakuové odparce RVO 64 a surový produkt byl promyt hexanem, aby došlo k odstranění olejových zbytků. Čistý biosurfaktant byl rozpuštěn v destilované vodě a byly stanoveny jeho základní vlastnosti.

Povrchové a mezifázové napětí bylo měřeno pomocí školního tenziometru K6 (Kruss GmbH) Du Noüyho metodou odtrhování prstence. Pro měření povrchového napětí byl použit roztok biosurfaktantu dané koncentrace o objemu 20 ml. Kritická micelární koncentrace (KMK) byla stanovena metodou měření povrchového napětí. Minimální povrchové napětí (MPN) bylo určeno z grafu závislosti povrchového napětí na koncentraci. Mezifázové napětí bylo měřeno na rozhraní roztoku biosurfaktantu a leteckého petroleje.

Testování solubilizačních vlastností

Základní solubilizační vlastnosti biosurfaktantu byly testovány na leteckém petroleji. K roztoku biosurfaktantu o objemu 50 ml byl přidán 1 ml leteckého petroleje, který vytvořil na hladině fázi. Směs byla třepána frekvencí 120 otáček za minutu na horizontální třepače po dobu 24 hodin. Poté byla směs ponechána při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin, aby došlo k úplnému oddělení fázi. Vodná fáze (roztok biosurfaktantu se solubilizovaným leteckým petrolejem) byla extrahována tetrachlormethanem v objemovém poměru 20:1 a organická fáze byla oddělena. Extrakt byl sušen přidávkem Na_2SO_4 a silikagelu po dobu 24 hodin. Následně byl extrakt filtrován přes fritu a doplněn na objem 10 ml. Koncentrace nepolárních extrahovatelných látek (NEL) byla měřena v 1 cm kvetě pomocí FTIR spektrometru NICOLET 6700 (Thermo Scientific). Pro porovnání solubilizačních vlastností biosurfaktantu byly provedeny obdobné experimenty s neiontovým alkylfenolpolyethoxylátovým surfaktantem Triton-X100 a s neiontovým polyoxyethylensorbitanovým surfaktantem Tween 80.

Testování dehydrogenasové aktivity

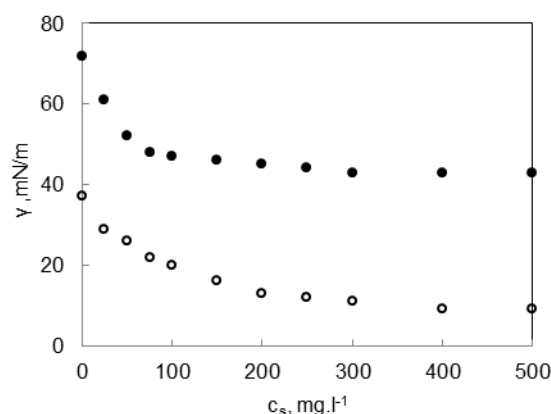
Test dehydrogenasové aktivity byl proveden podle modifikované metody založené na redukci 2,3,5-trifenylnitrobenzolu (TTC) na trifenylnitrosol (TPF) pomocí působení půdních společenstev¹⁵. Postup byl následující: 1,0 ml roztoku TTC ($c = 10 \text{ g l}^{-1}$) a 1,0 ml roztoku biosurfaktantu o testované koncentraci byl přidán k 2,0 g přirozeně vlhké půdy, která byla ponechána inkubovat ve tmě při teplotě $27 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 hodin. Vzniklý TPF byl extrahován do methanolu a jeho koncentrace stanovena spektrofotometricky při 482 nm. Dehydrogenasová aktivita byla vyjádřena koncentrací TPF v extraktu v mg l^{-1} .

Pro test byly odebrány 3 vzorky nekontaminovaných zemín a charakterizovány z hlediska obsahu organické frakce – celkového organického uhlíku (TOC).

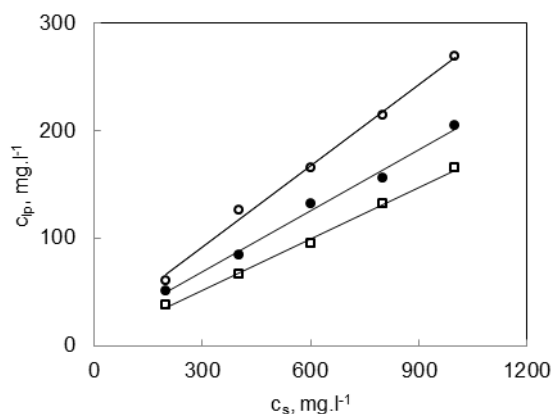
Výsledky a diskuse

U studovaného biosurfaktantu byla $\text{KMK} = 60 \text{ mg l}^{-1}$, což je výrazně nižší hodnota, než uvádí ostatní autoři u biosurfaktantu stejného producenta ($\text{KMK} = 500 \text{ mg l}^{-1}$)¹⁴. Hodnota minimálního povrchového napětí byla $\text{MPN} = 43 \text{ mN m}^{-1}$ (obr. 1). Amaral uvádí hodnotu MPN vyšší, konkrétně $\text{MPN} = 50 \text{ mN m}^{-1}$ (cit.¹⁶). Pro porovnání lze uvést také hodnoty obdobného biosurfaktantu sophorolipidového typu, který byl produkován kvasinkou *Candida bombicola*. Autoři uvádí hodnoty $\text{KMK} = 34,15 \text{ mg l}^{-1}$ a $\text{MPN} = 59,43 \text{ mN m}^{-1}$ (cit.¹⁷). Rozdíly ve vlastnostech biosurfaktantů mohou být dány rozdílnými kultivačními podmínkami (především rozdíly ve zdrojích uhlíku) a také rozdíly v morfologii produkčních kvasinek¹⁸. Dva syntetické neiontové surfaktanty vybrané k porovnávacím solubilizačním testům měly následující vlastnosti: $\text{KMK} = 143 \text{ mg l}^{-1}$ a $\text{MPN} = 33 \text{ mN m}^{-1}$ (Triton X-100), $\text{KMK} = 17 \text{ mg l}^{-1}$ a $\text{MPN} = 42 \text{ mN m}^{-1}$ (Tween 80). Snížení mezifázového napětí podporuje vznik emulzí a zvyšuje mobilitu a biologickou dostupnost sledovaného kontaminantu, čehož lze využít např. při studiu kombinovaných bioremediačních procesů¹⁹. Při poklesu mezifázového napětí nedochází na křivce ke zlomu při dosažení kritické micelární koncentrace tak, jak je patrné u závislosti povrchového napětí na koncentraci. Pozvolný pokles povrchového napětí po dosažení KMK je dán přítomností nečistot, v případě syntetických surfaktantů je po dosažení KMK povrchové napětí konstantní.

Podmínky solubilizačních experimentů zajistily ustavení rovnováhy mezi roztokem biosurfaktantu a fází leteckého petroleje. Rozpustnost použitého leteckého petroleje



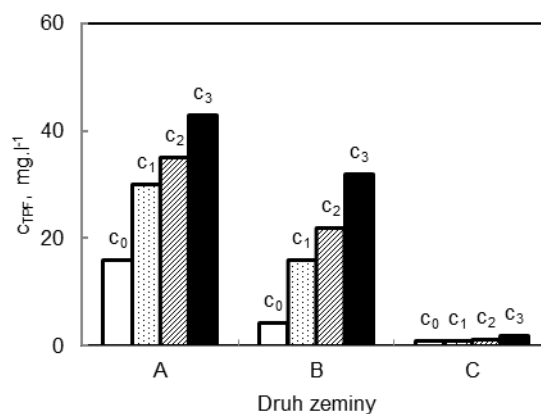
Obr. 1. Závislost povrchového a mezifázového napětí roztoku biosurfaktantu na koncentraci, mezifázové napětí bylo měřeno na rozhraní roztok biosurfaktantu/letecký petrolej, ● povrchové napětí, ○ mezifázové napětí



Obr. 2. Solubilizace leteckého petroleje pomocí tří typů surfaktantů, c_p udává koncentraci leteckého petroleje ve vodné fázi, c_s udává koncentraci surfaktantu, ● biosurfaktant, ○ Tween 80, □ Triton X-100

v demineralizované vodě byla 31 mg l⁻¹. V daném koncentračním rozmezí (200–1000 mg l⁻¹) byl pro jednotlivé surfaktanty stanoven následující hmotnostní solubilizační poměr (HSP): kvasinkový biosurfaktant měl 217 mg g⁻¹, Tween 80 měl 286 mg g⁻¹ a Triton X-100 měl 168 mg g⁻¹. HSP udává množství látky, které je vázáno v micelách surfaktantu. Na hmotnost surfaktantu se vztahuje množství rozpuštěné látky po odečtu množství, které se rozpustí v samotné vodě. Z hlediska solubilizačních vlastností se produkovaný sophorolipidový biosurfaktant blíží Tritonu X-100, což je neiontový alkylfenolpolyethoxylátový surfaktant. Tween 80, který je neiontovým polyoxyethylen-sorbitanovým surfaktantem, vykazoval přibližně o 25 % lepší schopnost solubilizovat letecký petrolej oproti sophorolipidu. U všech sledovaných surfaktantů došlo v oblasti nad kritickou micelární koncentrací k lineárnímu nárůstu rozpustnosti leteckého petroleje ve vodné fázi (obr. 2). Trend lineárního nárůstu rozpustnosti kapalných nebo pevných organických látek byl zdokumentován v předchozích studiích, ve kterých byla např. sledována solubilizace toluenu, ethylbenzenu a butylbenzenu pomocí bakteriálního rhamnolipidového biosurfaktantu²⁰ nebo solubilizace fenanthrenu pomocí syntetických surfaktantů²¹. Nad mezní koncentrací biosurfaktantu může docházet k postupnému snižování HSP pro určité typy látek, tzn., že zvyšování koncentrace biosurfaktantu nevede ke zvyšování koncentrace solubilizované látky. Jeví je způsoben oslabením interakcí mezi solubilizovanou látkou a biosurfaktantem a naopak posílením interakcí mezi molekulami biosurfaktu, což vede k tvorbě větších agregátů a k destabilizaci micel²². V daném koncentračním rozmezí nebyl tento jev pozorován.

Pro všechny tři testované zeminy byl pozorován stimulační efekt biosurfaktantu na nespecifická půdní společenstva. Při testování běžné hlinité zeminy s obsahem celkového organického uhlíku TOC = 4 % byl se vzrůstajícím



Obr. 3. Působení biosurfaktantu na půdní společenstva pro tři typy zemín, které se liší obsahem celkového organického uhlíku (TOC), TOC (A) = 4,0 %, TOC (B) = 1,8 %, TOC (C) = 0,1 %. Koncentrace trifenylylformazanů (TPF) je úměrná mikrobiologické aktivitě. Hodnoty se vztahují k rozdílným koncentracím biosurfaktantu (c_0 blank, c_1 = 500 mg l⁻¹, c_2 = 1000 mg l⁻¹, c_3 = 2000 mg l⁻¹)

množstvím přidaného biosurfaktantu zaznamenaný postupný nárůst mikrobiální aktivity, který při nejvyšší testované koncentraci biosurfaktantu dosáhl 260 % původní hodnoty. U jílovito-hlinité zeminy byl zaznamenaný nejvyšší nárůst mikrobiální aktivity již od nízkých koncentrací biosurfaktantu (obr. 3). V dostupné literatuře lze dohledat informace o stimulačních vlastnostech biosurfaktantů z hlediska biodegradacních procesů¹⁹. Přidavek bakteriálního surfaktantu ke kontaminované zemině urychlil biodegradaci ropy o přibližně 20 % za daných podmínek²³. V další studii byla prokázána rychlejší biodegradace fenanthrenu, pyrenu a ropy v médiích obsahujících bakteriální surfaktanty²⁴. V současnosti ovšem chybí informace o působení samotných biosurfaktantů na kvalitu půdy. Jedná se zejména o případy, kdy již došlo k odstranění kontaminantu ze zeminy, ale v zemině stále zbývá surfaktant v pórech a vázaný sorpcí. V případě této studie bylo cílem kvantifikovat působení samotného biosurfaktantu na aktivitu půdních společenstev v nekontaminované zemině. Z hlediska praktického využití se jedná o posouzení dekontaminační technologie založené na sanačním promývání, které dává prostor pro hodnocení sanačního promývání z hlediska kvality půdy po sanačním zákroku v porovnání s dalšími *in-situ* nebo *ex-situ* dekontaminačními technologiemi. Technologie založené např. na *in-situ* chemické oxidaci kontaminantů mohou působit negativně na oživení půd po sanačním zákroku.

Závěr

V rámci studie byly testovány vlastnosti biosurfaktantu patřícího do skupiny sophorolipidů produkovaných kva-

sinkou *Yarrowia lipolytica*. Z hlediska schopnosti solubilizace ropných látek má studovaný biosurfaktant obdobné vlastnosti jako běžné syntetické surfaktanty Triton X-100 a Tween 80. Pomocí testu dehydrogenasové aktivity bylo sledováno jeho působení na nespecifická půdní společenstva. Tímto testem byl ve všech případech prokázán stimulační efekt na aktivitu přirozeně se vyskytujících mikroorganismů. Kvasinkové biosurfaktanty mohou být s úspěchem aplikovány v technologiích dekontaminace zemin založených na sanačním promývání, přičemž po odstranění kontaminantu lze získat zeminu s vyšším mikrobiálním oživením.

Příspěvek byl připraven v rámci výzkumu realizovaného s podporou projektu MSM6046137308.

LITERATURA

- Rahman P. K. S. M., Gapke E.: *Biotechnology* 7, 360 (2008).
- Mulligan C. N.: *Environ. Pollut.* 133, 183 (2005).
- Bogaert I. N. A., Zhang J., Soetaert W.: *Process Biochem.* 46, 821 (2011).
- Lima T. M. S., Procopio L. C., Brandao F. D., Leao B. A., Totola M. R., Borges A. C.: *Bioresource Technol.* 102, 2957 (2011).
- Mulligan C. N.: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14, 372 (2009).
- Palková H., Sovová T., Koničková I., Kočí V., Bartůněk V., Sofer Z.: *Chem. Listy* 107, 885 (2013).
- Doležalová Weissmannová H., Štěpánková I., Vavrová M., Lapčíková A.: *Chem. Listy* 107, 172 (2013).
- Chu H., Lin X., Fujii T., Morimoto S., Yagi K., Hu J., Zhang J.: *Soil Biol. Biochem.* 39, 2971 (2007).
- Velmourougane K., Venugopalan M. V., Bhattacharyya T., Sarkar D., Pal D. K., Sahu A., Ray S. K., Nair K. M., Prasad J., Singh R. S.: *Geoderma* 197–198, 186 (2013).
- Dungan R. S., Kukier U., Lee B.: *Sci. Total Environ.* 357, 221 (2006).
- Fernandez P., Sommer I., Cram S., Rosas I., Gutierrez M.: *Sci. Total Environ.* 348, 231 (2005).
- Chaperon S., Sauve S.: *Soil Biol. Biochem.* 39, 2329 (2007).
- Carbonell G., Pablos M. V., Garcia P., Ramos C., Sanchez P., Fernandez C., Tarazona C., Tarazona J. V.: *Sci. Total Environ.* 247, 143 (2000).
- Pandey S., Singh D. K.: *Chemosphere* 63, 869 (2006).
- Casida L. E., Klein, D., Santoro T.: *Soil Sci.* 98, 371 (1964).
- Amaral P. F. F., Silva J. M., Lehocky M., Barros-Timmons A. M. V., Coelho M. A. Z., Marrucho I. M., Coutinho J. A. P.: *Process Biochem.* 41, 1894 (2006).
- Daverey A., Pakshirajan K.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158, 663 (2009).
- Ruiz H. J., Sentrandreu R.: *Arch. Microbiol.* 178, 477 (2002).
- Souza E. C., Vessoni-Penna T. C., Oliveira R. P. S.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 89, 88 (2014).
- McCray J. E., Bai G., Maier R. M., Brusseau M. L.: *J. Contam. Hydrol.* 48, 45 (2001).
- Li J. L., Chen B. H.: *Chem. Eng. Sci.* 57, 2825 (2002).
- Abouseoud M., Yateghene A., Amrane A., Maachi R.: *J. Hazard. Mater.* 180, 131 (2010).
- Thavasi R., Jayalakshmi S., Banat I. M.: *Bioresource Technol.* 102, 3366 (2011).
- Bordoloi N. K., Konwar B. K.: *J. Hazard. Mater.* 170, 495 (2009).

M. Šír^a, K. Lhotská^a, M. Bystrianský^a, and J. Mikeš^b (^a*Department of Environmental Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague,* ^b*EPS Ltd, Kunovice*): **Production and Characterization of Yeast Biosurfactant and Its Effect on Soil Microorganisms**

The aim of this study was to determine the effect of biosurfactant (BS) solution on soil microbial community and to determine its solubilization properties. Biosurfactant was produced by yeast *Yarrowia lipolytica* and isolated by extraction into ethyl acetate after the production process. Solubilization of kerosene resulted in the mass solubilization ratio (MSR) kerosene/BS = 217 mg g⁻¹, which reached similar values in comparison with tested synthetic surfactants Triton X-100 and Tween 80. Test of soil dehydrogenase activity showed a significant stimulating effect of produced biosurfactant on soil microorganisms.