

MAŁGORZATA GUMIENNA, MAŁGORZATA LASIK,
HALINA ROSZYK, ZBIGNIEW CZARNECKI

KWAS OLEINOWY ŹRÓDŁEM WĘGLA O WŁAŚCIWOŚCIACH HYDROFOBOWYCH W BIOSYNTEZIE ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH PRZEZ SZCZEP *CANDIDA BOMBICOLA*

Streszczenie

W pracy przebadano szczep drożdży *Candida bombicola* ATCC 22214 pod względem możliwości syntezy związków powierzchniowo czynnych na podłożu zawierającym kwas oleinowy jako źródło węgla hydrofobowego. Do hodowli wprowadzano zamiennie źródła azotu pochodzące z ekstraktu drożdżowego, chlorku amonu i wodorofosforanu(V) amonu. Kwas oleinowy okazał się doskonałym materiałem do syntezy glikolipidów. Najlepszą wydajność biosurfaktantów 85 g/l uzyskano na podłożu wzrostowym zawierającym: glukozę, kwas oleinowy i ekstrakt drożdżowy. Najefektywniejsze do biosyntezy okazało się wzbogacanie podłoża w czasie hodowli glukozą (14,4 g/l/dobę) i kwasem oleinowym (10 g/l/dobę).

Wstęp

Związki powierzchniowo czynne syntetyzowane na drodze chemicznej od dawna wykorzystywane są w wielu gałęziach przemysłu. Ze względu na swą aktywność powierzchniową i związane z nią właściwości, znajdują zastosowanie m.in. w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym, naftowym, papierniczym, tekstylnym, a także w rolnictwie. Istnieje możliwość wytwarzania tych związków przez mikroorganizmy w czasie ich wzrostu. Mają one wiele zalet, takich jak niska toksyczność, czy zdolność do biodegradacji, które szczególnie ze względu na ochronę środowiska naturalnego są bardzo istotne, mimo droższego sposobu ich pozyskiwania.

Na całym świecie przeprowadza się badania w kierunku dokładnego poznania biochemicznych i genetycznych mechanizmów odpowiedzialnych za wytwarzanie

tych związków przez mikroorganizmy. Zbadano, że ich biosynteza zachodzi w dość łagodnych warunkach, optymalnych do wzrostu i funkcjonowania mikroorganizmu. Istotną zaletą hodowli jest możliwość wykorzystywania tanich, łatwo dostępnych źródeł węgla i energii, co znacznie obniża koszty ich produkcji [7, 9, 15].

Drożdże te wymagają – do optymalnego przyrostu biomasy – obecności w podłożu: węgla (główne źródło energii), azotu (do syntezy białka), fosforu (do produkcji ATP) i magnezu (enzymatyczny faktor). Do produkcji biosurfaktantów niezbędna jest natomiast obecność w podłożu dwóch źródeł węgla: hydrofobowego i hydrofilowego. Biosynteza soforolipidów rozpoczyna się w końcowej fazie wzrostu drożdży, a w przypadku obecności azotu w podłożu, dopiero po całkowitym jego wykorzystaniu [3, 8, 12, 16].

Badania wykazują, że szczep *Candida bombicola* jest bardzo obiecującym drobnoustrojem. Wykorzystuje bowiem do syntezy biosurfaktantów stosunkowo tanie i łatwo dostępne surowce, przy jej wysokiej wydajności. Stwierdzono wręcz, że koszty produkcji glikolipidów przez ten szczep, na drodze mikrobiologicznej, są porównywalne z kosztami produkcji surfaktantów syntetycznych [4, 9].

Celem niniejszej pracy była ocena możliwości biosyntezy biosurfaktantów przez szczep *Candida bombicola* ATCC 22214 z zastosowaniem kwasu oleinowego jako składnika podłoża.

Material i metody badań

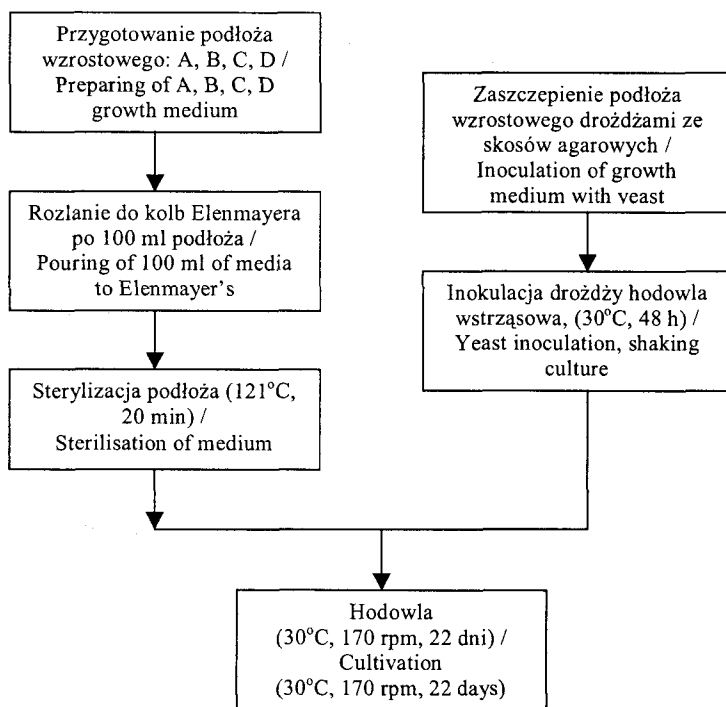
Do syntezy biosurfaktantów wykorzystano drożdże *Candida bombicola* ATCC 22214, otrzymane z *American Type Culture Collection*.

W skład podłoży hodowlanych wchodziły związki: kwas oleinowy (techn. 90%), glukoza bezwodna (cz.d.a.) oraz źródła azotu i fosforu – chlorek amonu (cz.d.a.), wodorfosforan amonu (cz.d.a.).

Przygotowanie inokulum

Drożdże przechowywano w temp. 4°C na skosach agarowych, systematycznie odświeżając poprzez przeszczepy na świeże skosy, w miesięcznych odstępach czasowych, inkubując w temperaturze 25°C przez okres 4 dni [3].

Drożdże przechowywane na skosach agarowych służyły do przygotowania inokulum. Kolbę zawierającą pożywkę wzrostową, na której planowano syntezę biosurfaktantów, zaszczepiano czystą kulturą drożdżową ze skosu agarowego. Matkę drożdżową namnażano inkubując przez 48 h w temperaturze 30°C, w hodowli okresowej, w łaźni wodnej (170 rpm), (rys. 1).



Rys. 1. Schemat procesu przygotowania podłoża do hodowli.

Fig. 1. Schematic preparation the medium and culture conditions.

Skład podłoży hodowlanych

Skład czterech podłoży wzrostowych zastosowanych w pracy przedstawiono w tab. 1. W tabeli zostały zestawione rodzaje hodowli wraz ze składem (g/l) poszczególnych składników podłoża.

Hodowla A została potraktowana jako odniesienie w stosunku do pozostałych wariantów. Nie zwiększano w podłożu stężenia glukozy ani kwasu oleinowego w czasie jej trwania, jedynym źródłem azotu był ekstrakt drożdżowy. Natomiast do podłoża B, począwszy od 3. dnia hodowli, wprowadzono dodatkową ilość glukozy i kwasu oleinowego. Podobnie (jak z podłożem B) postępowano z hodowlami C i D, zaś czynnikiem różnicującym była zwiększona ilość azotu, uzyskana poprzez komplementarne zastosowanie chlorku amonu (podłoże C) i wodorofosforanu(V) amonu (podłoże D) – jako źródeł tego pierwiastka. We wszystkich hodowlach pH pożywki wzrostowej utrzymywano na poziomie 3,5, korygując wartości pH 5 M roztworem NaOH.

Przygotowanie podłoża hodowlanego

Źródła węgla (hydrofilowe – glukoza, hydrofobowe – kwas oleinowy) i soli mineralnych, wykorzystywane do przygotowania pożywki wzrostowej, rozpuszczano w wodzie dejonizowanej, następnie regulowano pH do wartości 5,6 za pomocą 0,1 M HCl, rozlewano do kolb po 100 ml podłoża. Do każdej z kolb dodawano inokulum w ilości stanowiącej 10% pożywki, prowadząc hodowlę wstrząsową przez 22 dni (rys. 1, tab. 1).

Tabela 1

Skład początkowy podłoży hodowlanych.
Culture medium composition.

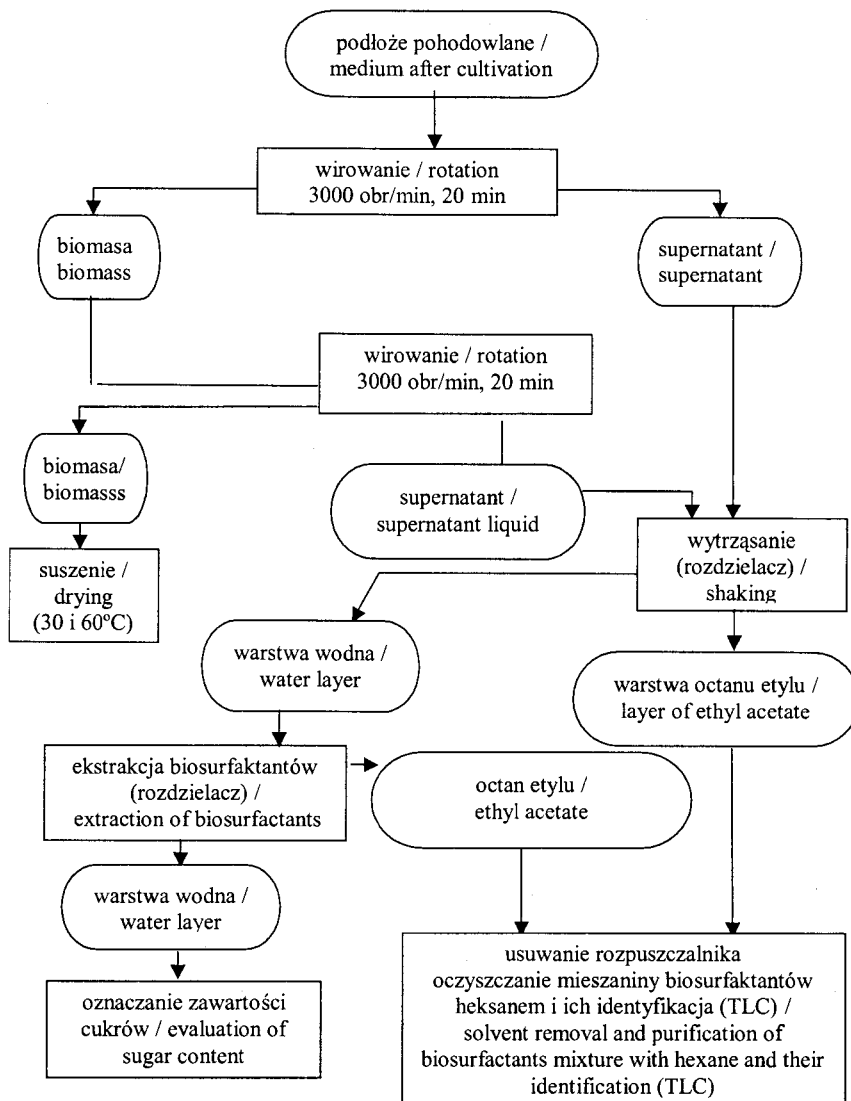
Lp.	Składniki podłoża/ Medium components	Stężenie składników w podłożu [g/l] / Concentration of medium components [g/l]			
		hodowla A culture A	*hodowla B culture B	*hodowla C culture C	*hodowla D culture D
1.	Glukoza Glucose	100	100	100	100
2.	Kwas oleinowy Oleic acid	100	10	10	10
3.	Ekstrakt drożdżowy Yeast extract	5	5	10	10
4.	Chlorek amonu Ammonium chloride	–	–	1	–
5.	Wodorofosforan(V) amonu Hydrogen ammonium phosphate	–	–	–	1,2

*w czasie hodowli B,C, D podłoże uzupełniano w 14,4 g/l/dobę glukozy oraz 10 g/l/dobę kwasu oleinowego)

*glucose and oleic acid were added to the medium during cultivation (14,4 g/l/day glucose and 10g/l/day oleic acid).

Przebieg hodowli i izolacja biosurfaktantów

Drożdże *Candida bombicola* hodowano w podłożach zawierających surowce węglowe jak i źródło azotu, w temperaturze 30°C przez 22 dni. W czasie hodowli badano przyrost biomasy (suszenie do stałej masy w 30°C – 4 h i 3 h w 60°C) [17], zawartość cukrów redukujących – zgodnie z metodyką podaną przez Millera [11], kontrolowano także wartość pH oraz wzrost zawartości biosurfaktantów – ekstrahując je z podłoża octanem etylu, oczyszczając heksanem i susząc w temperaturze 60°C – 3 h i 105°C przez 4 h [17], (rys. 2).



Rys 2. Schemat izolacji podłoża pochodowlanego.

Fig. 2. Scheme of medium separation after cultivation.

Otrzymane preparaty analizowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach Kieselgel 60 stosując układ rozwijający: chloroform:metanol:woda w stosunku 65:15:2 (v/v/v). Chromatogram wywoływano α -naftolem rozpuszczonym w mieszaninie chloroform : metanol w stosunku 1:1 (v/v) [4]. Pomiary napięcia powierzchniowego wykonywano tensjometrem Sigma 70 produkcji firmy KSV Ltd., Finlandia, stosując platynowy okrąg jako układ pomiarowy [2]. Wodne roztwory biosur-

faktantów przygotowano w pięciu stężeniach od 0,0005% do 0,1%. Nie przygotowano wyższych stężeń roztworów ze względu na ich słabą rozpuszczalność w wodzie. Wyizolowaną mieszaninę związków zbadano także pod względem zdolności do tworzenia emulsji. Jako fazę organiczną zastosowano ksylen oraz olej słonecznikowy. Przygotowano roztwory o stężeniu 0,25%, 0,5%, 0,75% biosurfaktantów. Biosurfaktanty rozpuszczano w 6 ml ksylenu/oleju, dodawano 4 ml wody destylowanej i wytrząsano przez 5 min. [6].

Wyniki i dyskusja

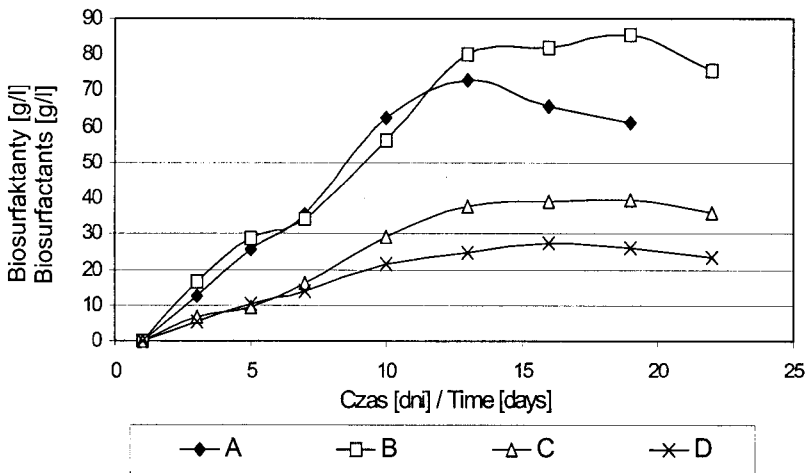
Synteza związków powierzchniowo czynnych przez szczep drożdży *Candida bombicola* zachodziła podczas fermentacji na pożywce wyjściowej, zawierającej dwa źródła węgla: glukozę (10%) i kwas oleinowy (1%, 10%). Związki azotowe dodane do podłoża pochodziły z ekstraktu drożdżowego (0,5%, 1%), chlorku amonu (0,1%), wodorofosforanu(V) amonu (0,12%), (tab. 1).

Zastosowane w pracy podłoża i ich modyfikacje pozwoliły na otrzymanie znacznej wydajności (85 g/l) biosurfaktantów oraz określenie najlepszych warunków hodowli.

Podobne badania prowadzili Asmer i wsp. [1] oraz Rau i wsp. [12], którzy maksymalną wydajność biosurfaktantów 77 g/l i 180g/l uzyskali już po 7.– 8. dobie hodowli ciągłej. Jednak wyniki analiz hodowli okresowych przedstawionych w tej pracy nie pozwoliły na zakończenie hodowli w 7. lub 8. dniu, dlatego też do uzyskania pełnego obrazu biosyntezy soforolipidów trwały one 22 dni (rys. 3).

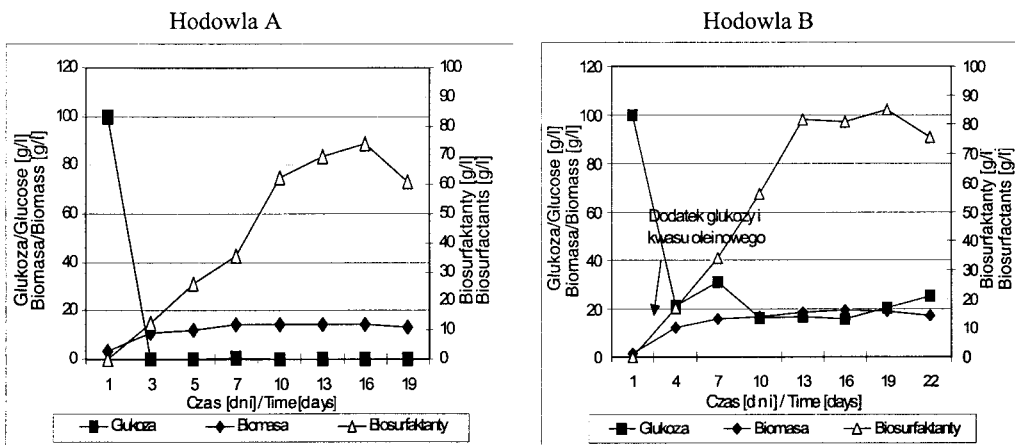
Podczas hodowli A, prowadzonej w celu wstępnej charakterystyki możliwości syntezy, osiągnięto wydajność związków powierzchniowo czynnych – 73 g/l (rys. 3 i 4). Regulację wartości pH podłoża na poziomie 3,5 wprowadzono w oparciu o prace Davila i wsp. [5], Rau i wsp. [12] oraz McCaffreya i Coopera [10], którzy donoszą, iż najbardziej optymalnym pH do biosyntezy związków powierzchniowo czynnych jest pH o wartości 2,5–3,5.

W hodowli B, w odróżnieniu od hodowli A, otrzymano największą wydajność soforolipidów – 86 g/l po 19. dniu. Wynikiem wzrostu wydajności glikolipidów w podłożu hodowlanym najprawdopodobniej jest zastosowanie dodatkowej ilości glukozy i kwasu oleinowego. W ten sposób, w podłożu dwukrotnie zwiększono stężenie glukozy do kwasu, choć jak donosi w swojej pracy Klekner i wsp. [8], najbardziej pożądanym stosunkiem węgla hydrofobowego do hydrofilowego jest stosunek 3:1 (tab. 1, rys. 3 i 4). W przypadku hodowli C i D wzbogacanie podłoża nie miało wpływu na zwiększenie syntezy związków powierzchniowo czynnych.



Znaczenie symboli A, B, C, D objaśniono w tab.1./ A, B, C, D as shown in tab.1.

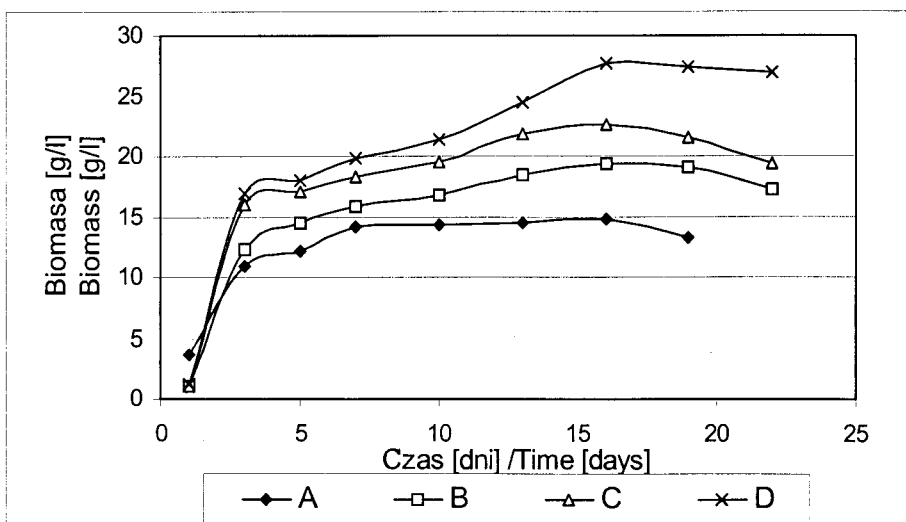
Rys. 3. Wpływ składu podłoża na syntezę związków powierzchniowo czynnych w czasie hodowli.
 Fig. 3. Influence of medium composition on the surface active compounds yield during cultivation.



Rys. 4. Wpływ składu podłoża na ubytek glukozy, przyrost biomasy i wydajność biosurfaktantów w hodowlach A i B.
 Fig. 4. Influence of medium composition on glucose cavity, biomass growth and biosurfactants yields in the cultivation A and B.

Ponadto w hodowlach C i D wprowadzono, oprócz ekstraktu drożdżowego (10 g/l), dodatkowo chlorek amonu jako źródło azotu (0,1%) i wodorofosforan(V) amonu – jako źródło fosforu. Badania wykazały, że obecność fosforu w podłożu wpływała

korzystnie tylko na przyrost biomasy, nie mając znacznego wpływu na proces syntezy związków powierzchniowo czynnych. Podobne zjawisko można było zaobserwować podczas hodowli na podłożu z dodatkiem azotu (hodowla C), choć w tym przypadku wydajność glikolipidów wzrosła (rys. 5). Porównywalne wyniki otrzymał Cassas i wsp. [3], stosując do podłoża wzrostowego sole potasowe, magnezowe i żelazowe(III).



Znaczenie symboli A, B, C, D objaśniono w tab.1./ A, B, C, D as shown in tab.1.

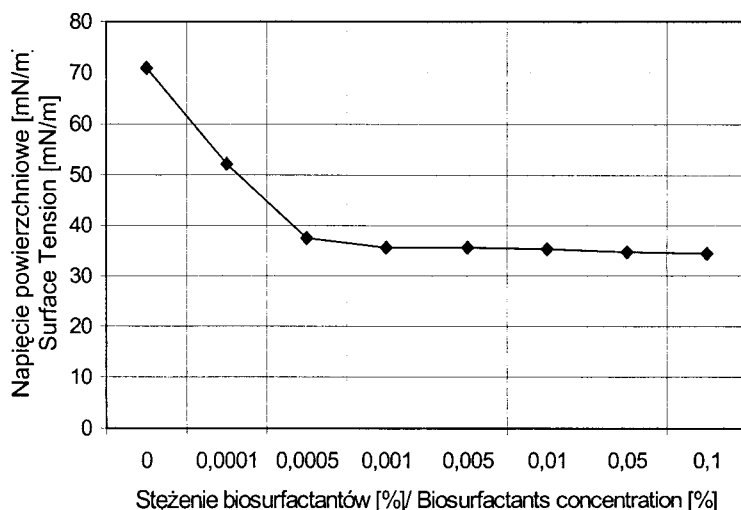
Rys. 5. Wpływ dodatku azotu i fosforu do podłoża na przyrost biomasy w czasie hodowli.

Fig. 5. Effect of the nitrogen and phosphorus concentration on biomass yield during cultivation.

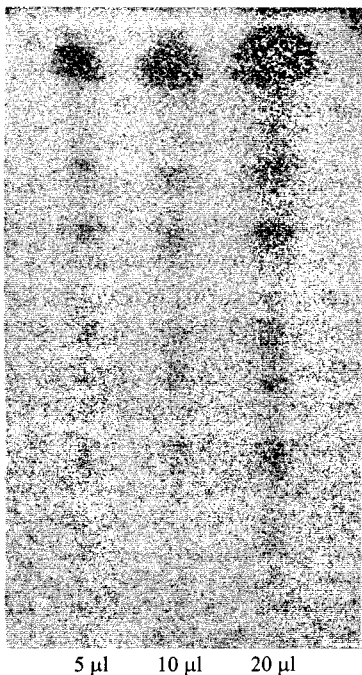
Wyraźnie wyższą wydajność biosurfaktantów obserwowano w przypadku podłoża zawierającego azot pochodzący tylko z ekstraktu drożdżowego (rys. 3). Ponadto podłoże, w którym jedynym źródłem azotu był ekstrakt drożdżowy (0,5%), okazało się najbardziej optymalne do biosyntezy glikolipidów [12, 16]. Natomiast na podłożu zawierającym dodatkowo chlorek amonu ilość powstałego produktu była o połowę mniejsza.

Bez względu jednak na zastosowane podłoże hodowlane, kinetyka reakcji biosyntezy biosurfaktantów we wszystkich przypadkach przedstawiała się bardzo podobnie. Zawsze bowiem największy ubytek glukozy, bardzo intensywny od samego początku, przypadał średnio na 10. dzień hodowli. Przyrost biomasy, również gwałtowny od samego początku, swoją maksymalną wartość osiągał po 15–17. dniu, a następnie nieznacznie malał (rys. 5).

Biosynteza związków powierzchniowo czynnych we wszystkich analizowanych hodowlach rozpoczynała się od dość gwałtownego wzrostu po 7, 10 dniu kiedy



Rys. 6. Wpływ stężenia biosurfaktantów na obniżenie napięcia powierzchniowego wodnych roztworów.
Fig. 6. Influence of biosurfactants concentration on the reduction of surface tension of aqueous solutions.



Rys. 7. TLC – chromatogram mieszaniny biosurfaktantów z hodowli B.
Fig. 7. TLC – chromatogram of sophorolipids from culture B.

obserwowano znaczny spadek poziomu glukozy w podłożu i trwała średnio do ok. 17–19. dnia. Później zaobserwowano spadek ich zawartości w podłożu hodowlanym.

Związki wyizolowane z podłoża hodowlanego obniżyły poziom napięcia powierzchniowego wody z 72 mN/m maksymalnie do 34,59 mN/m, przy stężeniu 0,1% (rys. 6). Analiza TLC (rys. 7) otrzymanych preparatów wykazała, że były one mieszaniną różnych frakcji. Niektóre z nich wytrącały się w czasie hodowli i sedymentowały. Są to według Rau i wspł. [13] formy laktonowe, charakteryzujące się słabą rozpuszczalnością w wodzie. Formy kwasowe natomiast głównie skoncentrowane są w podłożu hodowlanym. Rozpuszczalność tych związków jest silnie uzależniona od

wartości pH. Glikolipidy wykazują najlepszą rozpuszczalność w pH powyżej 6 [4].

Biosurfaktanty syntetyzowane przez drożdże *Candida bombicola* okazały się mieszaniną niejednorodną i analiza wykonana za pomocą chromatografii cienkowarstwowej wykazała obecność siedmiu związków. Według prac przedstawionych przez Asmera i wsp. [1] oraz Coopera i Padocka [4] *Candida bombicola* może tworzyć mieszaninę minimum 6 związków. Z kolei efektem biosyntezy prowadzonej na innych substratach hydrofobowych zawierających np. alkohole może być mieszanina dziewięciu związków [2, 10].

Badając właściwości otrzymanych związków przeprowadzono próby określające ich zdolność do tworzenia emulsji. Biosurfaktanty uzyskane z hodowli wykazały zdolność do jej tworzenia. Określenie emulsji, a zwłaszcza jej odpowiedniego typu, zależy nie tyle od fazy dyspersyjnej, ile od obecności substancji zdolnych do obniżenia napięcia powierzchniowego czyli od tzw. bioemulgatora. Jest on amfoteryczną cząsteczką o małej masie cząsteczkowej zdolnej do obniżania napięcia powierzchniowego oraz o polimerycznej dużej masie cząsteczkowej, która stabilizuje emulsje [14].

Wnioski

1. Najbardziej efektywne do biosyntezy glikolipidów okazało się podłoże zawierające: glukozę (10%), kwas oleinowy (1%) oraz ekstrakt drożdżowy (0,5%); niezbędne było wzbogacenie podłoża w czasie hodowli glukozą w ilości 14,4 g/l/dobę i kwasem oleinowym – 10 g/l/dobę, co spowodowało znaczny wzrost wydajności soforolipidów od 58 g/l do 84 g/l.
2. Czynnikiem ograniczającym wytwarzanie biosurfaktantów był nadmiar azotu (ekstrakt drożdżowy, chlorek amonu, wodorofosforan amonu). Zwiększenie jego dodatku do podłoża wpływało jedynie na podwyższenie przyrostu biomasy.
3. Analiza chromatograficzna (TLC) otrzymanych preparatów pozwoliła na wyodrębnienie z nich siedmiu frakcji o różnych współczynnikach rozdziału.
4. Wyizolowane związki okazały się powierzchniowo aktywne i obniżały napięcie powierzchniowe wody z 72 mN/m do 37 mN/m już przy stężeniu 0,001% biosurfaktanów. Wykazywały także zdolności do tworzenia emulsji.

LITERATURA

- [1] Asmer H.J., Lang S., Wagner F., Wray V.: Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, (9), 1988, 1460–1466.
- [2] Brakemeier A., Wullbrandt D., Lang S.: *Candida bombicola*: Production of novel alkyl glycosides based glucose/2 – dodecanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 1998, 161–166.
- [3] Casas J.A., Garcia de Lara S., Garcia – Ochoa F.: Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enz. Microb. Technol.*, **21**, 1997, 221–229.

- [4] Cooper D.G., Paddock D.A.: Production of a biosurfactant form *Torulopsis bombicola*. Appl. Environ. Microbiol., **47**, (1), 1984, 173–176.
- [5] Davila A.M., Marchal R., Vandecasteele J.P.: Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **38**, 1992, 6–11.
- [6] Ducret A., Giroux A., Trani M., Lortie R.: Characterization of enzymatically prepared biosurfactants. J. Am. Oil Chem. Soc., **73**, (1), 1996, 109–113.
- [7] Kosaric N.: Biosurfactants: production, properties applications, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1993.
- [8] Klekner V., Kosaric N., Zhou Q.H.: Sophorose lipids produced from sucrose. Biotechnol. Lett., **13**, (5), 1991, 345–348.
- [9] Klekner V., Kosaric N.: Biosurfactants for cosmetics. In: Kosaric N. (ed) Biosurfactants – production, properties, applications. (Surfactant science series, vol. 48) Dekker, New York 1993, 373–389.
- [10] McCaffrey W. C., Cooper D. G.: Sophorolipids production by *Candida bombicola* using self – cycling fermentation. J. Ferment. Bioeng., **79**, (2), 1995, 146 – 151.
- [11] Miller G. L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., **31**,(3), 1959, 426–428.
- [12] Rau U., Manzke C., Wagner F.: Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. Biotechnol. Lett., **18**, (2), 1996, 149–154.
- [13] Rau U., Spouckner S., Fiehler K., Lang S.: Microbielle tenside aus Pflanzenöulen; Tagungsband 5. Symposium nachwachsende Rohstoffe-Perspektiven für die Chemie, Berlin 1997, 218–222.
- [14] Sarubbo L.A., Porto A.L. F., Compos–Takaki G.M.: The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. J. Ferment. Bioeng., **45**, 1999, 423–426.
- [15] Velikonja J., Kosaric N.: Biosurfactants in food applications. In: Kosaric N (ed) Biosurfactants – production, properties, applications. (Surfactant science series, vol. 48) Dekker, New York Basel Hong Kong 1993, 373–389.
- [16] Zhou Q., Klekner V., Kosaric N.: Production of sophorose lipids. J. Am. Oil Chem. Soc., **69**, (1), 1992, 89–91.
- [17] Zhou Q., Kosaric N.: Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. J. Am. Oil Chem. Soc., **72**, (1), 1995, 67 – 71.

OLEIC ACID AS A HYDROPHOBIC CARBON SOURCE IN BIOSYNTHESIS OF SURFACE ACTIVE COMPOUNDS BY *CANDIDA BOMBICOLA* YEAST

S u m m a r y

Candida bombicola ATCC 22214 produced glycolipids up to 85 g/l using glucose and oleic acid in culture. It was profoundly also influenced by the concentration of nitrogen sources (yeast extract, ammonium chloride, hydrogen phosphate ammonium).

A high concentration of biosurfactants was obtained when the initial medium consisted of 10% glucose, 1% oleic acid, and only 0,5% yeast extract. The best surface active yield was obtained after continuous glucose and oleic acid addition during cultivation in quantity 14,4 g/l/day and 10 g/l/day respectively. Composition of glycolipids was characterized by TLC. ☒