



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PRODUKCE A CHARAKTERIZACE BIOSURFAKTANTŮ

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Olga Kratochvílová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1141/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Olga Kratochvílová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Produkce a charakterizace biosurfaktantů

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Mikrobiální produkce vybraných biosurfaktantů
3. Optimalizace postupů pro stanovení biosurfaktantů
4. Charakterizace vybraných biosurfaktantů

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Olga Kratochvílová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá mikrobiální produkcí biosurfaktantů vybraných bakteriálních kmenů. Za účelem otestování schopnosti produkce biosurfaktantů byly vybrány screeningové metody, na základě nichž bylo možné posoudit potenciál vybraných kmenů k produkci povrchově aktivních látek. V rámci práce bylo otestováno 11 bakteriálních kmenů, které jsou standardně využívány jako producenti polyhydroxyalkanoátů (PHA). Schopnost produkce biosurfaktantů byla u všech kmenů otestována jak v komplexních inokulačních tak v minerálních produkčních médiích. Na základě výsledků testů dosažených po kultivaci v inokulačních a produkčních médiích byla detekována přítomnost biosurfaktantů u bakterie *Pseudomonas putida*. Společně s bakterií *Pseudomonas fulva* byla podrobena důkladnějšímu studiu, kdy byla podpořena jejich produkce kultivací v různých typech produkčních médiích, které byly doplněny o různé zdroje uhlíku a dusíku, testován byl také vliv doby kultivace.

Biosurfaktanty produkované těmito bakteriemi byly následně identifikovány pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) na základě které byly látky identifikovány jako rhamnolipidy. Podle výsledků tenkovrstvé chromatografie (TLC) produkuje bakterie *Pseudomonas putida* směs mono- a dirhamnolipidů, přičemž v našich vzorcích byly dominantnější frakcí monorhamnolipidy.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the microbial production of biosurfactants of selected bacterial strains. In order to test the biosurfactant production ability, screening methods were chosen to be able to review the potential of the selected strains to produce biosurfactants. With the scope of the work, 11 bacterial strains, which are used as polyhydroxyalkanoate (PHA) producers, have been tested. The ability to produce biosurfactants was tested in all strains both in complex inoculation and mineral production media. The presence of biosurfactants in *Pseudomonas putida* was detected on the basis of the results obtained after cultivation in inoculation and production media. The bacteria *Pseudomonas fulva* was put under more deep study to support their production by cultivation in different types of production media supplemented by different sources of carbon and nitrogen, and the effect of cultivation time was tested as well. Biosurfactants produced by these bacteria were subsequently identified by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) on the basis of which the substances were identified as rhamnolipids. According to thin-layer chromatography result (TLC), *Pseudomonas putida* produces a mixture of mono- and dirhamnolipids, with monorhamnolipids being more dominant in our samples.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biosurfaktanty, rhamnolipidy, screening, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, chromatografie na tenké vrstvě

KEYWORDS

Biosurfactants, rhamnolipids, screening, Fourier transform infrared spectroscopy, thin layer chromatography

KRATOCHVÍLOVÁ, O. *Produkce a charakterizace biosurfaktantů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 72 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, vstřícnost a především čas, který mi věnoval. Velké poděkování patří Ing. Ivě Pernicové za cenné konzultace, připomínky, pomoc s laboratorními experimenty, její neutuchající optimismus a podporu během vypracování celé práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za pomoc s realizací experimentů. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali, za jejich lásku a trpělivost, kterou mě obklopují.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Biosurfaktanty	8
2.2	Chemická struktura biosurfaktantů	8
2.3	Klasifikace biosurfaktantů.....	10
2.3.1	Glykolipidy.....	10
2.3.2	Lipopeptidy a lipoproteiny	12
2.3.3	Polymerní surfaktanty	13
2.3.4	Mastné kyseliny, neutrální lipidy a fosfolipidy	13
2.4	Vlastnosti biosurfaktantů.....	13
2.5	Syntéza biosurfaktantů	14
2.5.1	Metabolismus rhamnolipidů.....	15
2.6	Faktory ovlivňující biotechnologickou produkci biosurfaktantů	16
2.7	Extrakce a purifikace biosurfaktantů.....	17
2.8	Aplikace biosurfaktantů	18
2.9	Screening produkce biosurfaktantů	19
2.9.1	Principy jednotlivých metod.....	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie, přístroje.....	24
3.1.1	Použité mikroorganismy.....	24
3.1.2	Použité chemikálie.....	24
3.1.3	Přístroje.....	25
3.2	Kultivace bakterií	26
3.2.1	Příprava inokulačních médií.....	26
3.2.2	Složení inokulačních médií	26
3.2.1	Příprava produkčních médií	29
3.2.2	Složení produkčních médií	30
3.2.3	Příprava produkčních médií pro vybrané bakterie	31
3.3	Stanovení obsahu biomasy	32
3.3.1	Gravimetrické stanovení obsahu biomasy.....	32
3.3.2	Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy	33
3.4	Optimalizace metod.....	33
3.4.1	Metoda rozšiřování oleje – „Oil spreading assay“	33
3.4.2	Stanovení aktivity emulze – „Emulsification capacity assay“	33
3.4.3	Solubilizace krystalického antracenu – „Solubilization of crystalline anthracene“	34
3.4.4	Penetrační test – „Penetration assay“	34
3.4.5	Orcinolová metoda – „Orcinol assay“	34

3.4.6	Metoda Du-Nouy-Ring.....	35
3.4.7	CTAB agarový test – „CTAB agar assay“	35
3.5	Extrakce rozpouštědly	36
3.6	Extrakce srážením	37
3.7	Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)	37
3.8	Infračervená spektroskopie.....	37
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
4.1	Kultivace v inokulačních médiích.....	38
4.1.1	Metoda rozšiřování oleje (OSM).....	38
4.1.2	Stanovení emulgační aktivity	39
4.1.3	Orcinolová metoda	41
4.1.4	Penetrační test.....	42
4.1.5	CTAB agarový test	42
4.1.6	Solubilizace krystalického antracenu	42
4.1.7	Metoda Du-Nouy-Ring.....	43
4.1.8	Přehled výsledků po kultivaci mikroorganismů v inokulačních médiích..	44
4.2	Kultivace v produkčních médiích.....	45
4.2.1	Metoda rozšiřování oleje	45
4.2.2	Stanovení emulgační aktivity	46
4.2.3	Solubilizace krystalického antracenu	48
4.2.4	Metoda Du-Nouy-Ring.....	49
4.2.5	Přehled výsledků po kultivaci mikroorganismů v produkčních médiích ..	51
4.3	Kultivace vybraných bakterií PP a D ₃ v produkčních médiích	52
4.3.1	Stanovení emulgační aktivity PP a D ₃	52
4.3.2	Solubilizace krystalického antracenu	55
4.3.3	Metoda Du-Nouy-Ring zaměřená na bakterie PP a D ₃	56
4.4	Vyhodnocení infračervené spektroskopie	58
4.5	Vyhodnocení chromatografie na tenké vrstvě (TLC).....	62
5	ZÁVĚR.....	63
6	LITERATURA	65
7	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	72

1 ÚVOD

S povrchově aktivními látkami, rovněž známými pod pojmem surfaktanty se setkáváme již od dávných dob. Nejstarší zmínka o jejich využití pochází z roku 2800 před našim letopočtem a souvisí s výrobou mýdla, které bylo vyráběno v Babylonu vařením tuku společně s popelem [1].

V dnešní době se k výrobě mýdla využívá způsob známý jako saponifikace, kdy je mýdlo vyráběno alkalickou hydrolyzou z živočišných tuků či olejů. Saponiny jsou chemické sloučeniny produkované rostlinami. Jedná se o steroidní látky či triterpenoidní glykosidy vykazující vlastnosti surfaktantů. *Saponaria officinalis* je rostlina produkující řadu glykosidů umožňujících zvyšovat smáčivost povrchů, rozpustnost tuků a pěnivost roztoků. Přičemž požadavky na tyto vlastnosti jsou kladeny i v případě moderních povrchově aktivních látek. Mimo rostliny jsou surfaktanty produkovány také mikroorganismy [2].

Právě produkce biosurfaktantů, tedy povrchově aktivních látek produkovaných mikroorganismy, je považována za jednu z klíčových technologií pro vývoj v 21. století. Kromě silného pozitivního dopadu na hlavní globální problémy má výroba biosurfaktantů značný význam v průmyslových procesech, jako je využití obnovitelných zdrojů a „green“ produktů [3].

Nejčastěji vyráběné povrchově aktivní látky jsou po chemické stránce deriváty ropy. Nicméně takové syntetické tenzoaktivní látky jsou obecně toxické. Právě tento problém v posledních letech motivoval řadu vědců k hledání povrchově aktivních látek, které jsou šetrnější k životnímu prostředí, jako jsou ty, kterých může být dosaženo prostřednictvím mikrobiální produkce, známých jako biosurfaktanty. Rovněž vedou k rozvoji přírodních povrchově aktivních látek jako alternativy k stávajícím výrobkům obavy týkající se životního prostředí ze strany spotřebitelů a nové právní předpisy v oblasti ochrany životního prostředí [4].

Biosurfaktanty přitahují zájem různých průmyslových odvětví díky výhodám, jako je jejich strukturní rozmanitost, nízká toxicita, dobrá biodegradabilita, schopnost fungovat v širokém rozmezí pH, teplot a salinity. Kromě toho mohou být biosurfaktanty získány za použití agroindustriálního odpadu jako substrátu, což pomáhá snížit celkové výrobní náklady [5].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biosurfaktanty

Povrchově aktivní látky označované jako surfaktanty (z angl. surface active agents), jsou aktivní složky obsažené v mýdlech a detergentech. Mají schopnost soustředit se na rozhraní vzduch – voda a běžně se používají k oddělování mastných materiálů z určitého média. Jelikož jsou schopny zvýšit rozpustnost nevodných fází kapalin ve vodě snížením jejich povrchového/mezifázového napětí na rozhraní vzduch – voda a voda – olej [6]. Rovněž hrají surfaktanty zásadní roli v lidském těle, kde se vyskytují například v plicích a žluči. V plicích usnadňují dýchání tím, že snižují odpor plic při nádechu, ve žluči pak fungují jako emulgátory tuků [7].

Surfaktanty dělíme do dvou hlavních skupin: syntetické povrchově aktivní látky a biosurfaktanty. Syntetické povrchově aktivní látky se vytvářejí organickými chemickými reakcemi. Zatímco biosurfaktanty jsou produkovány biologickými procesy, které jsou extracelulárně vylučovány mikroorganismy, jako jsou bakterie, houby a kvasinky [8]. Ve srovnání se syntetickými povrchově aktivními látkami mají biosurfaktanty několik výhod. K hlavním rozdílům mezi nimi patří jejich netoxičita, biodegradovatelnost a biokompatibilita. Mimo to mají vysokou specifitu a selektivitu a mohou být syntetizovány s využitím obnovitelných zdrojů [9].

2.2 Chemická struktura biosurfaktantů

Molekulová hmotnost biosurfaktantů se pohybuje mezi 500 – 1500 daltony [10]. Mají široký rozsah fyzikálně-chemických vlastností, přičemž většina z nich je amfifilní a skládá se z hydrofobní a hydrofilní části molekuly. Většina biosurfaktantů je neutrální anebo anionová (negativně nabitá), pouze některé jsou kationové (pozitivně nabitě) [11]. Hydrofobní, neboli nepolární části molekuly surfaktantů jsou všeobecně tvořeny nasycenými, nenasycenými nebo mastnými kyselinami. Hydrofilní, neboli polární části mohou být tvořeny z uhlohydrátů, peptidů, cyklických peptidů, karboxylové kyseliny, alkoholu anebo fosfátové skupiny [10]. Struktura povrchově aktivní látky je znázorněna na Obr. 1.



Obr. 1: Molekula povrchově aktivního činidla s nepolární (hydrofobní) a polární (hydrofilní) skupinou [3]

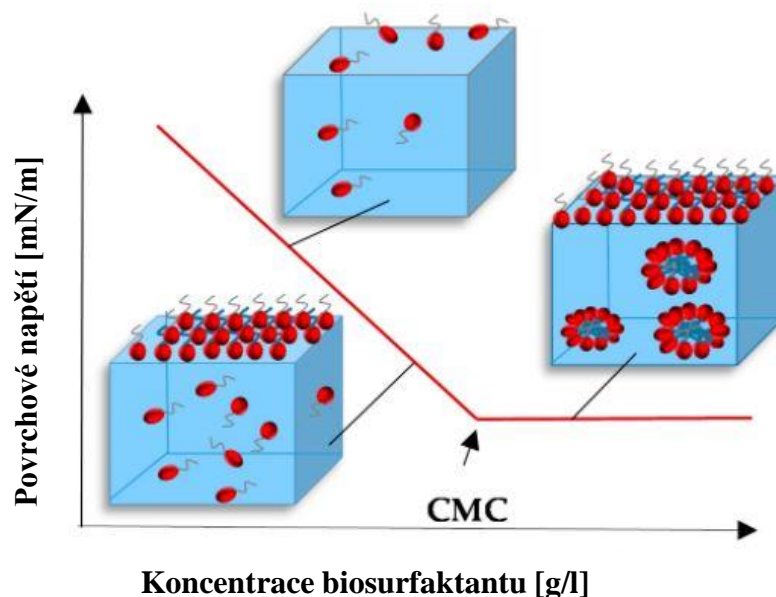
Amfifilní podstata molekul jim umožňuje se uspořádat na mezifázovém rozhraní a snižovat povrchové (vzduch – kapalina) a mezifázové napětí (kapalina – kapalina). Přičemž polární část biosurfaktantu je orientována do vodného prostředí a nepolární část do prostředí plynného. Díky tomu se pak povrch roztoku jeví jako nepolární a dochází ke snížení povrchového napětí. Vzorec pro výpočet povrchového napětí je znázorněn jako rovnice (1), kde povrchové napětí je označeno jako σ , dF označuje velikost povrchové síly působící kolmo na dl délku myšleného řezu povrchem. Jednotkou povrchového napětí je N/m [12].

$$\sigma = \frac{dF}{dl} \quad (1)$$

V případě mezifáze kapalina – kapalina jako je olej – voda, přítomnost biosurfaktantů snižuje povrchové napětí a odpudivé síly mezi fázemi a umožňuje jim se vzájemně smísit. Schopnost biosurfaktantů snižovat mezifázové napětí stoupá s jejich stoupající koncentrací, až po dosažení kritické koncentrace – známé jako kritická micelární koncentrace (CMC). Nad touto hodnotou už nedochází k dalšímu snižování povrchového a mezifázového napětí, ale dochází ke zvýšení rozpustnosti a mobility hydrofobních látek v důsledku jejich inkorporace do micel tvořených biosurfaktantem [12].

Tvorba CMC je závislá na pH, iontové síle a teplotě. Biosurfaktanty obecně vykazují nízkou hodnotu CMC v rozsahu od 0,001 do 2 g/l, přičemž právě to je jednou z jejich výhod oproti surfaktantům syntetickým [12].

Průběh tvorby micel v závislosti na koncentraci je znázorněn na Obr. 2.



Obr. 2: Ilustrace oblastí, ve kterých dochází ke tvorbě micel [3]

2.3 Klasifikace biosurfaktantů

Biosurfaktanty jsou tříděny do různých skupin podle chemického složení a mikrobiálního původu. Hlavní skupiny biosurfaktantů jsou: glykolipidy, lipopeptidy, lipoproteiny, fosfolipidy, neutrální lipidy, mastné kyseliny a polymerní biosurfaktanty [10].

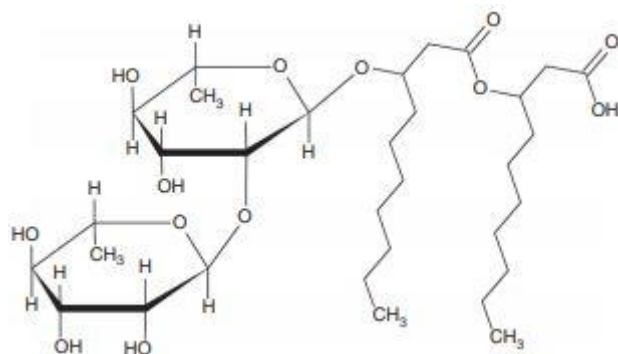
2.3.1 Glykolipidy

Glykolipidové biosurfaktanty jsou nejčastější podskupinou nízkomolekulárních biosurfaktantů. Strukturně se skládají z hydrofobní části tvořené mastnou kyselinou s dlouhým řetězcem, která může být alifatická, hydroxylová nebo nenasycená. Jejich hydrofilní část je pak tvořena sacharidem (glukózou, trehalózou, manózou, galaktózou, sorbitózou a rhamnózou). Nejznámějšími glykolipidy jsou rhamnolipidy (produkční mikroorganismus např. *Pseudomonas aeruginosa*), trehalolipidy (*Rhodococcus erythropolis*) a sophorolipidy (*Candida bombicola*, *Candida apicola*) [13].

• Rhamnolipidy

Rhamnolipidy, snad nejvíce dosud studované glykolipidy, jsou složeny z jedné nebo dvou molekul L-ramnózy tvořící mono nebo dimér s β -hydroxy mastnou kyselinou. Struktura dirhamnolipidu je znázorněna na Obr. 3. Zatímco -OH skupina jedné z kyselin je zapojena do glykosidické vazby s anomerním hydroxylem disacharidu rhamnózy, skupina -OH druhé kyseliny se podílí na tvorbě esterů. Rhamnolipidy jsou produkovány několika druhy z rodu *Pseudomonas* a *Burkholderia*. Gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je jedním z nejlepších producentů, jelikož většina známých kmenů této bakterie produkuje rhamnolipidy v množství kolem 100 g/l [1].

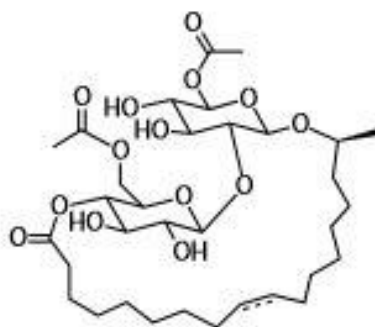
Délka řetězce β -hydroxy mastných kyselin se pohybuje mezi 8 až 16 atomů uhlíku, přičemž kyselina β -hydroxydekanová převažuje u druhu *Pseudomonas aeruginosa* a kyselina β -hydroxy tetradekanoová u druhů *Burkholderia*. Za zmínku stojí fakt, že různé druhy *Burkholderia* produkuje rhamnolipidy, které mají delší alkylové řetězce než ty, které produkuje nejprostudovanější produkční organismus *Pseudomonas aeruginosa*. Rhamnolipidy mají zajímavé využití např. v rámci sanace půdy nebo v boji proti škůdcům [14]. Tyto biosurfaktanty jsou komercializovány několika společnostmi jako je Jeneil Biotech Inc. a Rhamnolipid Companies Inc., ale jejich vysoká cena stále brání jejich dalšímu pronikání na trh [1].



Obr. 3: Struktura dirhamnolipid α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydekanoyl- β -hydroxy dekanoyl [1]

• Sophorolipidy

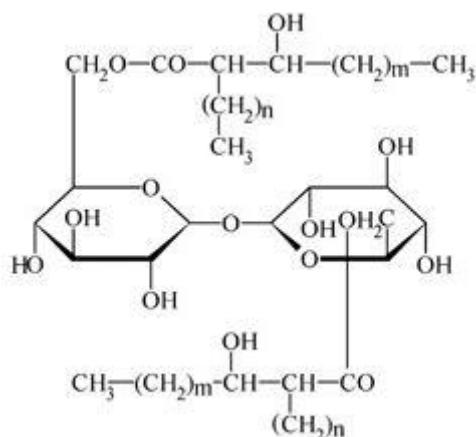
Sophorolipidy obsahují disacharid sorporózu a mohou být přítomny ve dvou formách, v laktonové formě a ve formě otevřené kyseliny. Existuje mnoho sophorolipidových struktur, které byly popsány zejména u kvasinek *Torulopsis bombicola*, *T. apicola* a *T. Petrophilum*. Převážně hydrofobní část obsahuje glykosidicky vázanou kyselinu 17-hydroxyolejovou, která je obvykle laktonicky spojena se 4" polohou sorporózy a acetylovým zbytkem v polohách 6' a 6" [15]. Chemická struktura sophorolipidu produkovaného kvasinkou *T. bombicola* je znázorněna na Obr. 4.



Obr. 4: Chemická struktura laktonového sophorolipidu produkovaného kvasinkou *Torulopsis bombicola* [16]

• Trehaloselipidy

Mezi nejznámějšími producenty trehaloselipidů se řadí rody jako *Mycobacterium*, *Rhodococcus* a *Arthrobacter*. Trehalóza je neredukující disacharid obsahující dvě glukóзовé jednotky, které jsou spojeny α , α -1,1-glykosidickou vazbou. Tyto glykolipidy se liší v počtu a celkové délce řetězce (C20-C90) esterifikovaných mastných kyselin. Většina trehalózových lipidů syntetizovaných rodem *Rhodococcus* a rody příbuznými je navázána na buněčnou stěnu a je produkována především při růstu mikroorganismů na uhlovodících. Nejvíce uváděným trehalózovým lipidem je trehalóza 6,6'-dimykolát [17]. Její chemická struktura je znázorněna na Obr. 5.

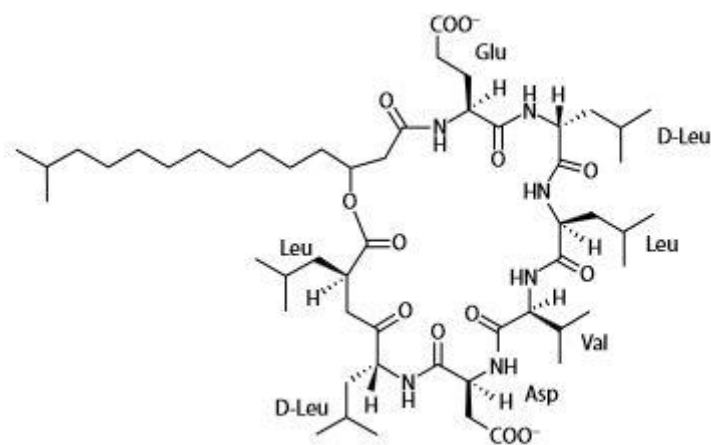


Obr. 5: Chemická struktura glykolipidu trehalózy 6,6'-dimykolát [17]

2.3.2 Lipopeptidy a lipoproteiny

Mikrobiální lipopeptidy jsou cyklické peptidy, které jsou acylovány mastnou kyselinou. Do růstového média jsou vylučovány různými mikroorganismy, včetně grampozitivních rodů, jako jsou *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces* a gramnegativních rodů jako jsou *Pseudomonas* a *Serratia*. Surfaktin byl objevený jakožto první přírodní lipopeptid [18]. Mnoho lipopeptidů vykazuje nejenom snížení povrchového napětí, ale také silný antibiotický účinek. Nejznámějšími sloučeninami této třídy jsou jistě surfaktin, polymyxin B a lipopeptidické antibiotikum daptomycin [19]. Vzhledem k tomu, že nomenklatura lipopeptidů je poměrně chaotická, proto jsou podobné lipopeptidy jedné skupiny často nazývány různými jmény [20].

Surfaktin je cyklický lipopeptid produkovaný bakterií *Bacillus subtilis* obsahující sedm aminokyselin a různé 3-hydroxylové mastné kyseliny. Chemická struktura surfaktinu je znázorněna na Obr. 6. Hlavní složkou je kyselina 3-hydroxy-13-methylmyristinová. Surfaktin je velmi dobrá povrchově aktivní látka, která rovněž vykazuje antibakteriální vlastnosti. Kromě surfaktinu produkuje *Bacillus subtilis* také dva další lipopeptidy, konkrétně Iturin a Fengycin [20].



Obr. 6: Chemická struktura surfaktinu produkovaného bakterií *Bacillus subtilis* [16]

2.3.3 Polymerní surfaktanty

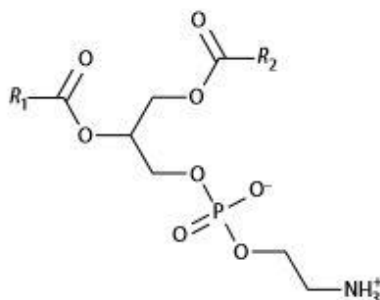
Jejich hydrofilní část se skládá z heteropolysacharidů. Mezi nejvíce prozkoumané biosurfaktanty patřící do této skupiny se řadí emulsan (*Acinetobacter species*), liposan, který je tvořený z 83 % sacharidem a ze 17 % proteinem (*Yarrowia lipolytica*), sacharid-protein-lipidové komplexy (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Debaryomyces polymorphus*) nebo mannoprotein (*Saccharomyces cerevisiae*). Emulsan je velmi účinné emulgační činidlo pro uhlovodíky ve vodě, dokonce i v koncentraci 0,001 až 0,01%. Jedná se o jeden z nejsilnějších emulzních stabilizátorů odolávající inverzi i při poměru voda – olej 1:4, který je dnes znám [21].

2.3.4 Mastné kyseliny, neutrální lipidy a fosfolipidy

Některé bakterie a houby produkují velké množství volných mastných kyselin a fosfolipidových povrchově aktivních látek během růstu na n-alkánech. Mastné kyseliny mohou být produkovány mikrobiální oxidací alkanů. Nejvýraznějšího snížení povrchového a mezifázového napětí bývá dosaženo mastnými kyselinami s délkou řetězce C12 – C14 [22].

Fosfolipidy jsou hlavní součástí mikrobiálních membrán a obvykle nejsou přítomné v extracelulární formě [16]. Avšak *Acinetobacter* sp. při růstu na hexadekanu produkuje extracelulární fosfolipidové vezikuly. Silný účinek surfaktantu těchto vezikul byl odvozen pouze nepřímo prostřednictvím vzniku opticky čiré mikroemulze hexadekanu ve vodě [22].

Bakterie *Rhodococcus erythropolis* vylučuje fosfatidylethanolaminy, vznikající při růstu na n-alkánech, které snižují povrchové napětí. Fosfatidylethanolamin (cefalin) znázorněn na Obr. 7 je jedním z nejběžnějších fosfolipidů a obvykle jedna z hlavních složek bakteriálních membrán [23].



Obr. 7: Fosfatidylethanolamin (R_1 , R_2 = obvykle dlouhé, nasycené nebo nenasycené, nerozvětvené alifatické řetězce) [16]

2.4 Vlastnosti biosurfaktantů

Jedinečné a odlišné vlastnosti biosurfaktantů v porovnání s jejich chemicky syntetizovanými protějšky a široká dostupnost substrátu je činí vhodnými pro komerční účely. Charakteristické vlastnosti povrchově aktivních látek souvisejí s jejich povrchovou aktivitou, tolerancí k pH, teplotě a iontové síle, biologické rozložitelnosti, nízké toxicitě, emulgační a deemulgační

schopnosti a antibakteriální účinnosti [21]. Některé vlastnosti jsou společné většině biosurfaktantů a mají výhody oproti běžným povrchově aktivním látkám [10].

Efektivita a účinnost jsou základní charakteristikou dobrého povrchově aktivního činidla. Účinnost se měří CMC, zatímco efektivita se vztahuje na povrchové a mezifázové napětí. CMC biosurfaktantů se pohybuje v rozmezí od 0,001 do 2 g/l, zatímco mezifázové (olej/voda) a povrchové napětí jsou přibližně 1 a 30 mN/m. Dobré surfaktanty jsou schopné snížit povrchové napětí vody ze 72 na 40 mN/m nebo méně [3]. Obecně platí, že biosurfaktanty jsou efektivnější a účinnější a jejich CMC je několikanásobně nižší než v případě chemické povrchově aktivní látky, tj. pro dosažení maximálního poklesu povrchového napětí je potřebné jen malé množství povrchově aktivní látky [24].

Díky snadné biodegradovatelnosti biosurfaktantů mikroorganismy ve vodě a půdě se jeví jako vhodné sloučeniny pro bioremediaci a úpravu odpadu. Rovněž je třeba vyzdvihnout jejich nízkou toxicitu, která umožňuje použití biosurfaktantů v potravinách, kosmetice, léčivech a má zásadní význam pro aplikace v oblasti životního prostředí. Bezesporu stojí za zmínku i fakt, že mikroorganismy, které produkují biosurfaktanty dokáží růst na široké škále substrátů, které jsou dostupné a levné. Zahrnující např. rostlinný olej nebo různé druhy průmyslových odpadů [3].

Specifické účinky biosurfaktantů, jakožto komplexních molekul se specifickými funkčními skupinami jsou zvláště zajímavé v detoxikaci různých znečišťujících látek a dezemulzifikaci průmyslových emulzí. Biosurfaktanty mohou působit buď jako emulgátory, nebo jako deemulgátory, přičemž emulze může být popsána jako heterogenní systém sestávající z jedné nemísitelné kapaliny dispergované v jiné ve formě kapiček, jejichž průměr obecně přesahuje 0,1 mm. Existují dva základní typy emulzí: olej ve vodě (o/w) a voda v oleji (w/o). Emulze mají minimální stabilitu, ale právě přídavek biosurfaktantu může vést k emulzi, která zůstává stabilní po celé měsíce nebo dokonce roky [4].

Velmi nízká nebo dokonce úplná netoxicitu mikrobiálně produkovaných povrchově aktivních látek z nich činí vhodné komponenty pro farmaceutický, kosmetický a potravinářský průmysl. Bylo zjištěno, že syntetická povrchově aktivní látka Corexit vykazovala LC_{50} (smrtnou koncentraci na 50% testovaných jedinců daného druhu) proti bakterii *Photobacterium phosphoreum* desetkrát nižší než rhamnolipidy, což dokazuje vyšší toxicitu chemicky syntetizovaných povrchově aktivních látek [25].

2.5 Syntéza biosurfaktantů

Biosurfaktanty jsou tvořeny hydrofilní a hydrofobní částí, přičemž hydrofobní část je tvořena buď mastnou kyselinou s dlouhým řetězcem, hydroxy mastnou kyselinou, nebo α -alkyl- β -hydroxy mastnou kyselinou. Hydrofilní část molekuly je pak tvořena např. uhlohydrátem, aminokyselinou, cyklickým peptidem, fosfátem, karboxylovou kyselinou, alkoholem a dalšími. Při syntéze obou částí molekuly biosurfaktantu je zapojeno několik metabolických drah využívajících řady enzymů. Své uplatnění zde nacházejí například enzymy regulační [16].

Možnosti syntézy biosurfaktantů:

1. *De novo* syntéza hydrofilní a hydrofobní části dvěma navzájem nezávislými cestami a jejich následné spojení do kompletní molekuly biosurfaktantu.
2. *De novo* syntéza hydrofilní části molekuly a substrát-dependentní syntéza hydrofobní části molekuly a jejich spojení do kompletní molekuly biosurfaktantu.
3. *De novo* syntéza hydrofobní části molekuly a substrát-dependentní syntéza hydrofilní části molekuly a jejich spojení do kompletní molekuly biosurfaktantu [16].

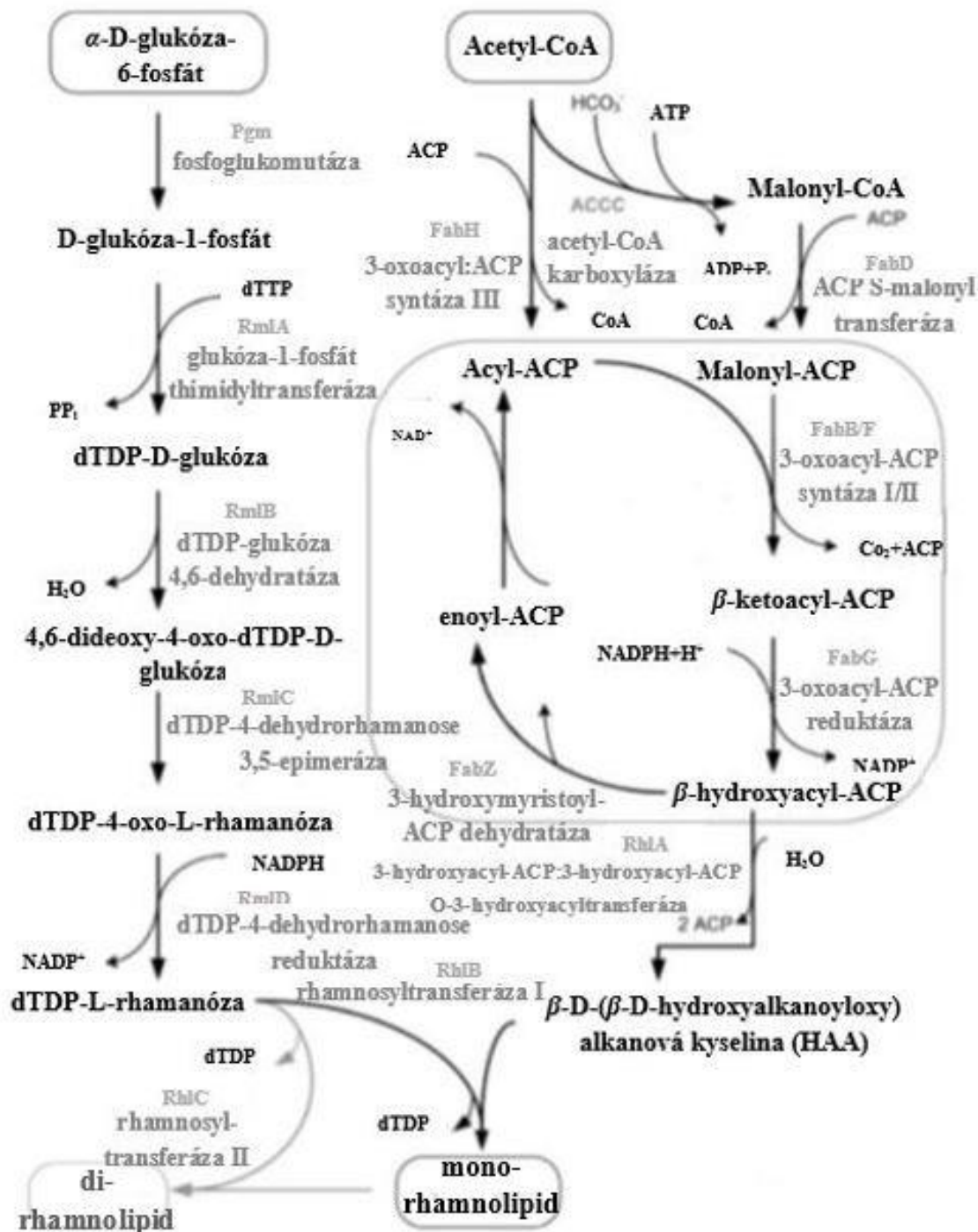
2.5.1 Metabolismus rhamnolipidů

Pokud kultivujeme bakterie v kapalném médiu, kmeny *Pseudomonas* vylučují převážně dva typy rhamnolipidů: monorhamnolipid a dirhamnolipid. Co se týká biosyntetické dráhy těchto dvou povrchově aktivních sloučenin, tak rhamnosylová část a část mastné kyseliny je produkována syntézou *de novo* [26].

Dárce rhamnosylové skupiny je aktivovaný cukr známý jako deoxythymidindifosfo-L-ramnóza (dTDP-L-rhamnóza). Pro jeho syntézu je třeba nejprve syntetizovat D-glukózu-1-fosfát a to specifickou reakcí katalyzovanou enzymem fosfoglukomutázou (Pgm). Biosyntéza dTDP-L-ramnózy zahrnuje pět po sobě následujících reakcí katalyzovaných enzymy, které jsou kódované tzv. *rml* geny [27].

Syntéza části mastných kyselin rhamnolipidů je řízena enzymem 3-oxoacyl-ACP reduktázou (FabG), který je zodpovědný za uvolnění prekurzorů mastných kyselin z celkové syntézy mastných kyselin na úrovni ketoacylové redukce [27].

Výsledná syntéza rhamnolipidů se skládá ze třech specifických enzymatických reakcí. V prvním kroku jsou dvě aktivované β -hydroxy mastné kyseliny vázány 3-hydroxyacyl-ACP:3-hydroxyacyl-ACP O-3-hydroxyacyltransferázou (RhlA) za vzniku β -D-(β -D-hydroxyalkanoyloxy) alkanové kyseliny (HAA). Monorhamnolipidy jsou produkovány rhamnosyltransferázou I (RhlB), kondenzací HAA a dTDP-L-ramnózy. Rhamnosyltransferáza II (RhlC) přidá k monorhamnolipidu další ramnózovou část, což vede k tvorbě dirhamnolipidu [28]. Podrobná biosyntéza rhamnolipidů je znázorněna na Obr. 8.



Obr. 8: Biosyntetická dráha rhamnolipidů [29]

2.6 Faktory ovlivňující biotechnologickou produkci biosurfaktantů

Složení a emulgační aktivita biosurfaktantů závisí nejen na produkčním kmeni, ale také na podmínkách kultivace. Tedy na povaze zdroje uhlíku, dusíku, na jejich vzájemném poměru C:N, nutričních omezeních, chemických a fyzikálních parametrech jako je teplota, oxysličení, obsah dvojmocných kationtů a pH. Tyto parametry ovlivňují nejen množství vyrobeného biosurfaktantu, ale i charakter vyrobeného biosurfaktantu [30].

Zdroj uhlíku: Kvalita a kvantita množství produkovaného biosurfaktantů je ovlivněna povahou uhlíkového substrátu. Glukóza, sacharóza a glycerol jsou považovány jakožto vhodný zdroj uhlíkového substrátu pro výrobu biosurfaktantů [31]. Je zřejmé, že uhlíkový substrát hraje důležitou roli při produkci biosurfaktantu. Hydrofobní substráty jako kukuřičný olej, sádlo (bohaté na nenasycené a nasycené tuky) a alkoholy s dlouhým řetězcem maximalizují produkci biosurfaktantů. Oproti tomu hydrofilní substráty, jako je glukóza a sukcinát ve většině případů, tak znatelně vysokých výtěžků nedosahují [32].

Při zpracování odpadních vod se používá rozpustný acetát a špatně rozpustný hexadekan jako uhlíkatý substrát pro růst *Gordonia amarae* a biosurfaktant je produkován ve velkoobjemových reaktorech [31].

Zdroj dusíku: Dusík hraje zásadní roli v produkčním médiu biosurfaktantů, protože je nezbytný pro mikrobiální růst, jako je syntéza proteinů a enzymů. Pro produkci biosurfaktantů mohou být využity různé sloučeniny dusíku jako je pepton, kvasniční extrakt, síran amonný, dusičnan amonný a další extrakty. Nejčastěji používaným zdrojem dusíku, co se týká produkce biosurfaktantů je kvasničný extrakt, avšak jeho použití s ohledem na koncentraci je závislé na organismu a kultuře [16].

Okysličení a míchání: Jedná se o důležité faktory ovlivňující tvorbu biosurfaktantů [33]. Jelikož mikroorganismy používané pro výrobu biosurfaktantů jsou organismy aerobní, je třeba v případě submerzní kultivace dbát na neustálé provzdušňování a míchání. Nicméně s tvorbou biosurfaktantů dochází i ke vzniku vážného problému, a to v podobě tvorby velkého množství pěny [34].

Toto pění s sebou přináší několik nežádoucích účinků. Za prvé dochází k tendenci mikroorganismů hromadit se uvnitř pěny, čímž dochází k odstranění buněk z kultivačního média. Za druhé, přítomnost pěny snižuje účinnost přenosu plynu mezi plynnou a kapalnou fází v bioreaktoru, což snižuje rychlost dodávání kyslíku do kapaliny a odstranění oxidu uhličitého z něj. Za třetí, zpění je obvykle tak silné, že pěna má tendenci opustit prostor bioreaktoru skrze libovolně dostupný otvor v jeho horní části. Což nejenomže představuje ztrátu buněk, ale výrazně zvyšuje riziko kontaminace bioreaktoru. Ve snaze předejít problému zpění při výrobě biosurfaktantů submerzní kultivací se nabízí řešení ve formě přidání protipěnových látek či mechanického poškození pěny [35].

2.7 Extrakce a purifikace biosurfaktantů

Jedním z nejdůležitějších kroků při výrobě biosurfaktantů je rychlé, efektivní a levné získání produktu činící zhruba 60% celkových výrobních nákladů. Proces získávání biosurfaktantů závisí především na jeho konečném použití. V případě jeho využití například ve farmacii, medicíně či kosmetice, jsou kladeny vysoké nároky na jeho čistotu [36].

Mezi nepoužívanější metody k získávání biosurfaktantů patří buď extrakce rozpouštědly (chloroform-metanol, dichlormethan-metanol, butanol, ethylacetát, pentan, hexan, kyselina octová, éter), nebo srážení kyselinou. K dalším metodám patří srážení síranem amonným,

krystalizace, centrifugace, frakcionaci pěny, iontově výměnná chromatografie, dialýza, ultrafiltrace, lyofilizace, izoelektrická fokusace a chromatografie na tenké vrstvě (TLC) [36].

E. Huszcza a spol. izolovali biosurfaktant produkovaný bakterií *Bacillus coagulans* z kultivačního média vysrážením kyselinou chlorovodíkovou, následnou neutralizací hydroxidem sodným a lyofilizací [37]. S. Lin a spol. izolovali lipoproteinový biosurfaktant vyrobený bakterií *Bacillus subtilis* pomocí membránové ultrafiltrace. Jedná se o rychlou metodu, která nám poskytne výsledný produkt o vysoké čistotě [38].

2.8 Aplikace biosurfaktantů

Celosvětová produkce povrchově aktivních látek vzrostla v roce 2000 na 17 miliónů tun, přičemž je očekáván roční nárůst ve výši 3 – 4 % [31]. Tyto chemicky syntetizované povrchově aktivní látky jsou převážně založeny na ropě a obvykle nejsou biologicky odbouratelné, a právě proto mohou být toxické pro životní prostředí, ve kterém se nacházejí. Kvůli zvyšujícímu se povědomí o potřebě chránit ekosystém dochází ke zvýšenému zájmu o povrchově aktivní látky mikrobiálního původu jako možné alternativy k chemicky syntetizovaným. Biosurfaktanty tak nacházejí uplatnění v oblastech jako je zemědělství, medicína, kosmetika, petrochemie a v řadě dalších průmyslových odvětví [39].

V zemědělství se používají povrchově aktivní látky pro hydrofilizaci těžkých půd, pro dosažení dobré smáčivosti a rovnoměrného rozložení aplikovaných hnojiv. Dále napomáhají průniku mikroorganismů do půdy v případě odstraňování toxických látek z půdy pomocí mikroorganismů (tzv. bioremediace). Kontaminace půdy ropou je častým problémem a její řešení je mnohdy ekonomicky náročné a právě bioremediace *in situ* patří mezi jednu z ekonomicky nejnáchylnějších metod. Dokáže způsobit částečnou nebo úplnou destrukci molekulární struktury látek znečišťujících prostředí. A právě použití mikroorganismů produkujících vlastní biosurfaktanty schopné degradovat znečišťující látky může náklady na ošetření takto postižených půd snižovat [40].

Rovněž v medicíně biosurfaktanty nacházejí uplatnění díky jejich silné antibakteriální, antifungální a antivirové aktivitě. Tyto povrchově aktivní látky hrají roli antiadhezivních činidel vůči patogenům, což je činí užitečnými při léčbě mnohých onemocnění. Např. *Bacillus circulans*, produkuje biosurfaktant, který má silný inhibiční účinek na řadu mikrobiálních patogenů, zahrnující vysoce nebezpečné multirezistentní kmeny. Biosurfaktant surfactin produkovaný bakterií *Bacillus subtilis* je již komerčně využíván jako antibiotikum a dokonce je testováno jeho použití ve spermicidních gelech jako prevence proti přenosu viru HIV. Některé biosurfaktanty jsou dokonce zkoumány s ohledem na jejich potenciální protirakovinný účinek [41].

Biosurfaktanty se běžně používají i v průmyslu kosmetickém pro jejich detergenční, smáčivé, emulgační, solubilizační, dispergační a pěnicí vlastnosti. Nejčastěji používanými biosurfaktanty v kosmetice jsou sophorolipidy a rhamnolipidy. Sophorolipidy vykazují dobrou kompatibilitu s kůží a vynikající hydratační vlastnosti. Rhamnolipidy jsou přírodní povrchově aktivní látky a emulgátory, které mohou nahradit petrochemické povrchově aktivní látky používané ve většině kosmetických přípravků. Používají se také v produktech proti lupům, proti

vráskám, deodorantech, v pečujících přípravcích na nehty a zubních pastách v několika různých formách, protože mají vysokou povrchovou a emulgační aktivitu [42].

2.9 Screening produkce biosurfaktantů

Produkce biosurfaktantů různými mikroorganismy využívá k detekci řadu analytických metod, jak je znázorněno v Tab. 1. Jelikož jsou biosurfaktanty po strukturní stránce velice rozmanitou skupinou biomolekul, proto je většina metod v rámci obecného screeningu kmenů produkujících biosurfaktanty založena na fyzikálních účincích povrchově aktivních látek. Alternativně může být zkoumána schopnost kmenů interferovat s hydrofobním rozhraním. Kromě metod založených na fyzikálních účincích lze pro první screening použít i např. CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) agarový test. Tento test je však vhodný pouze pro omezenou skupinu biosurfaktantů. Metody screeningu mohou poskytnout kvalitativní a/nebo kvantitativní výsledky. Pro první screening izolátů jsou obvykle dostatečné metody kvalitativní [43].

Tab. 1: Metody screeningu biosurfaktantů [44]

Analytická metoda	Rychlost		
	Kvalitativní	Kvantitativní	analýzy
Direct surface/interfacial tension – „Přímé měření povrchového napětí“	++	+	min
Drop collapse assay – „Test zhroucení kapky“	++	-	min
Microplate assay – „Mikrodestičkový test“	++	-	min
Penetration assay – „Penetrační test“	++	-	min
Oil spreading assay – „Test rozšiřování oleje“	++	-	min
Emulsification capacity assay – „Test emulgační aktivity“	+	-	den
Solubilization of crystalline anthracene – „Solubilizace krystalického antracenu“	+	-	den
Bacterial adhesion to hydrocarbons assay – „Test bakteriální adheze k uhlovodíkům“	+	-	min
Hydrophobic interaction chromatography – „Hydrofobní interakční chromatografie“	+	-	hod
Replica plate assay – „Replikační test“	+	-	den
Salt aggregation assay – „Test agregace soli“	+	-	min
CTAB agar assay – „CTAB agarový test“	+	-	den
Hemolysis assay – „Test hemolýzy“	+	-	den

Hlavním úkolem screeningu je nalezení nových biosurfaktantů s požadovanými fyzikálními a chemickými vlastnostmi, mezi které patří silná povrchová aktivita, nízká CMC, vysoká kapacita emulze, dobrá rozpustnost a činnost v širokém rozmezí pH. Rovněž je třeba dbát i na ekonomické hledisko. Podstatné je tedy najít takové kmeny bakterií vyznačující se vysokou produkcí biosurfaktantů a tedy i vysokými výnosy [44].

2.9.1 Principy jednotlivých metod

Přímé měření povrchového/mezifázového napětí

Přímé měření mezifázové nebo povrchové aktivity kultivačního supernatantu je nejjednodušší screeningovou metodou a je velmi vhodné pro předběžný screening mikroorganismů. Tento způsob měření nám výrazně indikuje, zdali je biosurfaktant produkován. Biosurfaktanty se adsorbují na fázovém rozhraní mezi kapalinou a vzduchem [45].

Mezifázové nebo povrchové napětí kapaliny lze měřit různými způsoby, vyskytuje se zde však určité omezení rozsahu měření. Povrchové napětí se s rostoucí koncentrací surfaktantu snižuje až do chvíle, kdy je dosaženo hodnoty CMC. Po dosažení hodnoty CMC již nelze detekovat zvýšení koncentrace biosurfaktantů. V důsledku toho mohou dvě kultury s velmi různými koncentracemi biosurfaktantu vykazovat stejné povrchové napětí. Tento problém lze vyřešit opakovaným ředěním, dokud není pozorováno prudké zvýšení povrchového napětí. Odpovídající ředění supernatantu se nazývá kritické ředění micel (CMD) a koreluje s koncentrací biosurfaktantu [45]. Kromě silného ovlivnění měření faktory jako je pH a iontová síla, může být měření navíc ovlivněno rostlinnými oleji, v případě jejich využití jakožto zdroje uhlíku s ohledem na obsah jejich mastných kyselin [46].

- Metoda Du-Nouy-Ring

Metoda Du-Nouy-Ring je poměrně snadnou a nejčastěji používanou metodou. Je založena na měření síly potřebné k oddělení platinového kroužku z rozhraní nebo povrchu. Síla, vynaložená k odtržení kroužku je úměrná povrchovému napětí. Může být měřena pomocí automatizovaného tenziometru, který je dostupný u mnoha výrobců [47].

Platinový kroužek je ponořen pod rozhraní testované kapaliny a následně je zvedán pomalu nahoru, přičemž dochází i ke zvedání menisku zkoumané kapaliny až do chvíle, kdy dojde k odtržení menisku od platinového kroužku a jeho navrácení do výchozí pozice. Maximální povrchová síla nutná pro výpočet povrchového napětí je tedy zaznamenána těsně před odtržením menisku [48].

Namísto platinového kroužku může být aplikována i platinová destička, tzv. Wilhelmyho destička. D. Cooper a spol. považovali ve své publikaci kulturu za slibnou, pokud snižuje povrchové napětí kapalného média na 40 mN/m nebo méně [49]. P. Willumsen a U. Karlson ve své publikaci uvádějí definici podobnou: dobrý producent biosurfaktantu je definovaný jako ten, který je schopen snížit povrchové napětí růstového média o ≥ 20 mN/m ve srovnání s destilovanou vodou, jejíž povrchové napětí odpovídá hodnotě 72 mN/m [50].

Výhodou této metody je přesnost a snadnost použití, vyžaduje však speciální vybavení. Nevýhodou je, že měření různých vzorků nelze provést současně, je objem vzorku požadovaného pro analýzu zahrnující několik desítek mililitrů a omezený rozsah koncentrací, které lze analyzovat bez ředění [43].

- Axisymmetric Drop Shape Analysis by Profil (ADSA)

Analýza tvaru kapky je další optickou metodou vhodnou pro stanovení povrchového napětí. Základní princip této metody spočívá v pozorování tvaru kapiček, které jsou značně závislé na povrchovém napětí kapaliny. Kapky kapaliny s nízkým povrchovým napětím mají sklon se odchylovat od dokonale sférického tvaru oproti kapkám kapaliny s vysokým povrchovým napětím [51].

Podle Y. Rotenberga a spol. můžeme profil kapky kapaliny popsat pomocí níže uvedené rovnice (2):

$$\Delta p = \sigma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad (2)$$

kde Δp označuje tlakový rozdíl napříč rozhraním, r_1 a r_2 poloměr zakřivení kapky a σ povrchové napětí [52].

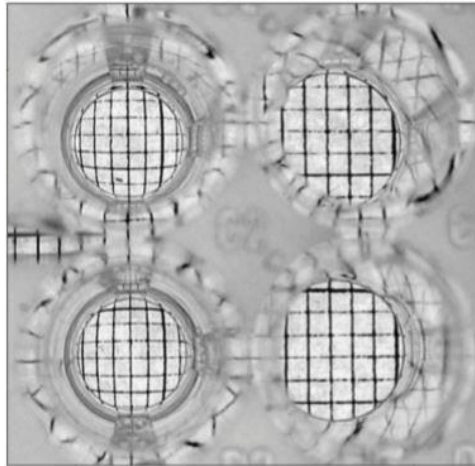
Pro analýzu tvaru kapky se na povrch FEP-teflonu nanese malé množství vzorku bakteriální suspenze. Profil kapky se určuje monitorováním jejího obrysu v závislosti na čase po dobu 2 hodin. Povrchové napětí suspenze je pak možné vypočítat z profilů kapiček pomocí výše uvedené rovnice (2). W. Van der Vegt a spol. ve svém článku popisují metodu analýzy tvaru kapky jako vhodnou metodu pro sledování produkce biosurfaktantů [51].

Výhodou této metody je potřeba malého množství vzorku v řádu μl , lze ji použít i za extrémních podmínek jako je zvýšený tlak či teplota. Nevýhodou může být potřeba speciální kamery a softwaru. Rovněž výpočet povrchového napětí je poměrně složitý. Kromě toho nelze měřit paralelně různé vzorky [51].

Některé další metody

- Microplate assay – „Mikrodestičkový test“

Povrchová aktivita jednotlivých kmenů může být stanovena kvalitativně pomocí mikrodestičkového testu vyvinutého a patentovaného D. Vauxem a M. Cottinghamem. Tento test je založen na změně optického zakřivení, kterou způsobují povrchově aktivní látky ve vodném roztoku. Využívá se mikrotitrační destičky v jejichž jamkách má čistá voda rovný povrch. Přítomnost povrchově aktivních látek má za následek smáčení okrajů jamky a povrch zkoumaného vzorku se stává nerovným, jak je možno vidět na Obr. 9. Mikrodestičkový test je snadný, rychlý a umožňuje okamžitou detekci povrchově aktivních látek. Rovněž k jeho výhodám patří i množství vzorku, které se pohybuje v řádu μl [44].



Obr. 9: Mikrotitrační test, vlevo je přítomen biosurfaktant rhamnolipid ve vodě, vpravo pouze čistá voda [43]

- Emulsification capacity assay – „Test emulgační aktivity

K dalším chemickým analýzám biosurfaktantů patří test emulgační aktivity vyvinutý D. Cooperem a B. Goldenbergem. Tento test je založen na přidavku kerosenu nebo jiné hydrofobní sloučeniny například hexadekanu ke kultivačnímu supernatantu. Tato směs je vortexována po dobu 2 minut a ponechána ke stabilizaci emulzní vrstvy po dobu 24 hodin [43]. Po 24 hodinách je změřena výška stabilizované emulzní vrstvy a je vypočítán emulgační index E_{24} podle níže uvedené rovnice (3):

$$E_{24} = \frac{h_{emulze}}{h_{tot}} \cdot 100 \% \quad (3)$$

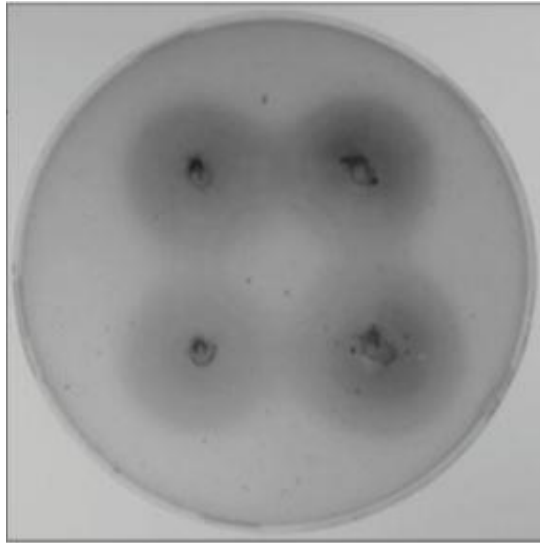
kde h_{emulze} označuje výšku emulzní vrstvy a h_{tot} celkovou výšku kapaliny. Emulgační index E_{24} koreluje s koncentrací surfaktantu [43].

Test emulgační aktivity je jednoduchou metodou vhodnou pro screening mikroorganismů produkujících biosurfaktanty. Povrchová aktivita a emulgační aktivita však vzájemně nemusejí vždy korelovat [43].

- CTAB agar assay – „CTAB agarový test“

Metoda CTAB agarové destičky je vhodná především pro detekci extracelulárních glykolipidů nebo jiných aniontových povrchově aktivních látek. Tato metoda byla vyvinuta I. Siegmundem a F. Wagnerem a je založena na kultivaci testovaných kmenů na speciálním světle modrém agarovém médiu obsahujícím kationtový surfaktant CTAB a metylenovou modř. V případě produkce biosurfaktantů dojde k vytvoření tmavě modré skvrny kolem rostoucích mikroorganismů, jak je možné vidět na Obr. 10. Aniontově povrchově aktivní látka, sekretovaná mikroorganismy, tvoří nerozpustnou iontovou dvojici s CTAB a methylenovou modří [53].

Nevýhodou je, že CTAB může inhibovat růst některých mikroorganismů, ale jak navrhuje I. Siegmund a spol., může být CTAB nahrazen jinou kationtovou povrchově aktivní látkou [53].



Obr. 10: Jeden z druhu Pseudomonas pěstovaný na CTAB agaru, tmavě modré skvrny kolem 4 kolonií jsou známkou produkce biosurfaktantů [43]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie, přístroje

3.1.1 Použité mikroorganismy

Pro experimentální práci byly použity bakteriální kmeny z České sbírky mikroorganismů Masarykovy university v Brně (Czech Collection of Microorganisms – CCM) a z německé sbírky Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures v Braunschweig. Přehled použitých bakteriálních kmenů je uveden v Tab. 2.

Tab. 2: Použité bakteriální kmeny

Mikroorganismus	Označení MO	Optimální teplota kultivace
<i>Cupriavidus necator</i> H16 CCM 3726	CnH16	30 °C
<i>Pseudomonas putida</i> KT 2440	PP	30 °C
<i>Burkholderia cepacia</i> CCM 2656	BuCe	30 °C
<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	BuSa	30 °C
<i>Haloferax mediterranei</i> DSM 1411	HXM	37 °C
<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662 ^T	HH	30 °C
<i>Halomonas organivorans</i> CCM7142	HO	37 °C
<i>Halomonas salina</i> CCM 4361	HS	30 °C
<i>Halomonas elongata</i> CCM 3756	HE	30 °C
<i>Pseudomonas fulva</i> *	D ₃	30 °C
<i>Pseudomonas gessardii</i> *	D ₂	30 °C

* *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas gessardii* – jedná se o přírodní izoláty z půdy zamořené ropou od společnosti Dekonta, Brno, Česká republika

3.1.2 Použité chemikálie

- Nutrient Broth, HiMedia (Indie)
- Chlorid sodný, p.a., LachNer (ČR)
- Chlorid vápenatý dihydrát, p.a., Lachema (ČR)
- Citronan amonno-železitý, p.a., Fluka
- Hydrogenuhličitan sodný, p.a., LachNer (ČR)
- Bromid sodný, p.a., Sigma Aldrich (SRN)
- D-glukóza monohydrát, p.a., LachNer (ČR)
- Síran hořečnatý heptahydrát, p.a., LachNer (ČR)
- Peptone, HiMedia (Indie)
- Casein, Sigma Aldrich (SRN)
- Rozpustný škrob, Sigma Aldrich (SRN)
- Pyrohroznán sodný, p.a., Lachema (ČR)
- Hydrogenfosforečnan didraselný, p.a., LachNer (ČR)

- Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a., LachNer (ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, LachNer (ČR)
- Chlorid hořečnatý hexahydrát, p.a., Penta (ČR)
- Chlorid draselný, p.a., LachNer (ČR)
- Triton X-100, Sigma Aldrich (SRN)
- n-hexan, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)
- Antracen, Sigma Aldrich (SRN)
- Orcinol, Sigma Aldrich (SRN)
- Ethylacetát, p.a., LachNer (ČR)
- Diethylether, p.a., LachNer (ČR)
- Kyselina sírová, p.a., LachNer (ČR)
- Kyselina chlorovodíková, p.a., LachNer (ČR)
- Kyselina oktanová, Sigma Aldrich (SRN)
- Ethanol, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)
- Methanol, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)
- Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)
- Ethanol 99,8 % pro UV spektroskopii, LachNer (ČR)
- D-fruktóza, p.a., LachNer (ČR)
- Yeast extract powder, HiMedia (Indie)
- Agar powder, HiMedia (Indie)
- Síran amonný, p.a., LachNer (ČR)
- Hydroxid sodný, p.a., LachNer (ČR)

3.1.3 Přístroje

- váhy Kern EW 620-3NM (SRN)
- analytické váhy, Boeco (SRN)
- vodní lázeň, WSL, BL 4/150
- magnetická míchačka, Kartell, TKO (USA)
- laminární box Aura mini, BioAir-Euroclone (USA)
- centrifuga, Hettich Zentrifugen (SRN)
- centrifuga vysokorychlostní chlazená, HERMLE, Z 36 HK (SRN)
- temperovaná třepačka, Heidolph, Incubator 1000 (ČR)
- temperovaná třepačka, Biosan ES-20
- spektrofotometr, Implen, P 300 (UK)
- inkubátor, Biotech IP30
- FTIR spektrofotometr, Nicolet iS50
- tenziometr, KSV, Sigma 701
- běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Kultivace bakterií

3.2.1 Příprava inokulačních médií

Pro kultivaci bakterií byla připravena příslušná inokulační média, jak je uvedeno v Tab. 3 o objemu 50 ml vždy do 100 ml Erlenmeyerových baněk. Jednotlivé složení inokulačních médií je uvedeno níže.

Takto připravená média byla vysterilizována. Všechna inokula byla vždy připravována ve dvou paralelních sadách. Po vysterilizování a ochlazení na pokojovou teplotu byly ve sterilním laminárním boxu do Erlenmeyerových baněk zaočkovány z kryokonzervy. Kultury byly uchovávány ve formě kryokonzervy při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 10 % roztoku glycerolu.

Připravená inokula byla kultivovaná po dobu 48 h při optimální teplotě kultivace na temperované třepačce při 180 rpm. Poté byla zcentrifugována při 6 000 rpm a výsledný supernatant byl zmrazený ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) uchován pro další práci.

Tab. 3: Použité bakteriální kmeny s příslušnými označením inokulačních médií

Mikroorganismus	Označení MO	Inokulační médium
<i>Cupriavidus necator</i> H16 CCM 3726	CnH16	NB
<i>Pseudomonas putida</i> KT 2440	PP	NB
<i>Burkholderia cepacia</i> CCM 2656	BuCe	NB
<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	BuSa	m ₁ BuSa
<i>Haloferax mediterranei</i> DSM 1411	HXM	m ₁ HXM
<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662T	HH	m ₁ HH
<i>Halomonas organivorans</i> CCM7142	HO	m ₁ HOS
<i>Halomonas salina</i> CCM 4361	HS	m ₁ HOS
<i>Halomonas elongata</i> CCM 3756	HE	m ₁ HE
<i>Pseudomonas fulva</i>	D ₃	NB
<i>Pseudomonas gessardii</i>	D ₂	NB

3.2.2 Složení inokulačních médií

Pro kultivaci *Cupriavidus necator* H16 (CnH16), *Pseudomonas putida* (PP), *Burkholderia cepacia* (BuCe), *Pseudomonas fulva* (D₃) a *Pseudomonas gessardii* (D₂) v inokulačním médiu byla připravována kapalná Nutrient Broth (NB) média o koncentraci $25\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Jeho složení je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4: Složení inokulačního média NB

Látka	m [g]	V [ml]
Beef extract	10	
Pepton	10	
NaCl	5	
Destilovaná		1 000

Pro kultivaci *Haloferax mediterranei* (HXM) bylo připraveno inokulační médium m_1 HXM, jehož složení je uvedeno v Tab. 5. Glukóza a roztok stopových prvků SL6 byly přidány v laminárním boxu do média až po sterilaci. Složení roztoku stopových prvků SL6 je uvedeno v Tab. 6.

Tab. 5: Složení inokulačního média m_1 HXM

Látka	m [g]	V [ml]
NaCl	150	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	20	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,69	
KCl	4	
NH ₄ Fe ^{III} citrát	0,063	
NaHCO ₃	0,25	
NaBr	0,5	
Yeast extract	6,25	
Glukóza	30	
SL6		1,25
Destilovaná voda		1 000

Tab. 6: Složení roztoku stopových prvků SL6

Látka	m [g]	V [ml]
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,10	
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,03	
H ₃ BO ₃	0,30	
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,20	
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,01	
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,02	
NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	0,03	
Destilovaná voda		1 000

Pro kultivaci *Halomonas halophila* (HH) bylo připraveno inokulační médium m_1 HH, jehož složení je uvedeno v Tab. 7.

Tab. 7: Složení inokulačního média m_1 HH

Látka	m [g]	V [ml]
Pepton	15	
Yeast extract	3	
NaCl	66	
Glukóza	1	
Destilovaná voda		1 000

Pro kultivaci *Burkholderia sacchari* (BuSa) bylo připraveno inokulační médium m₁BuSa, jehož složení je uvedeno v Tab. 8.

Tab. 8: Složení inokulačního média m₁BuSa

Látka	m [g]	V [ml]
Yeast extract	0,5	
Pepton	0,5	
Casein	0,5	
Glukóza	10	
Rozpustný škrob	0,5	
Pyrohroznán sodný	0,3	
K ₂ HPO ₄	0,3	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05	
Destilovaná voda		1 000

Pro kultivaci *Halomonas elongata* (HE) bylo připraveno inokulační médium m₁HE, jehož složení je uvedeno v Tab. 9.

Tab. 9: Složení inokulačního média m₁HE

Látka	m [g]	V [ml]
Nutrient Broth	25	
NaCl	30	
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5	
Destilovaná voda		1 000

Pro kultivaci *Halomonas salina* (HS) a *Halomonas organivorans* (HO) bylo připraveno inokulační médium m₁HOS, jehož složení je uvedeno v Tab. 10.

Tab. 10: Složení inokulačního média m₁HOS

Látka	m [g]	V [ml]
Yeast extract	10	
Pepton	5	
Glukóza	1	
NaCl	81	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	9,6	
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	7	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,36	
KCl	2	
NaHCO ₃	0,06	
NaBr	0,026	
Destilovaná voda		1 000

3.2.1 Příprava produkčních médií

Pro kultivaci v produkčním médiu byla kultura kultivována nejdříve 24 h v inokulačním médiu, poté byla kultivována 72 hodin v produkčním médiu.

Do Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml bylo připraveno vždy 100 ml daného produkčního média. Takto připravené médium bylo vysterilováno. Označení produkčních médií je uvedeno v Tab. 11 spolu s jim příslušejícími bakteriemi. Podrobné složení jednotlivých produkčních médií je uvedeno níže.

Pro zajištění optimálního množství stopových prvků v mediích byly taktéž připraveny roztoky stopových prvků MES, TES a SL6, jehož složení je uvedeno v Tab. 6. Podrobné složení MES je uvedeno v Tab. 12 a TES v Tab. 13. Takto připravené roztoky byly vysterilovány.

Po sterilaci byly předem připravené roztoky glukózy, fruktózy a stopových prvků přidány v laminárním boxu podle nároků baterie do jednotlivých produkčních médií. Rovněž bylo do produkčních médií sterilně zaočkováno 10 ml připravených inokulačních médií.

Připravená produkční média byla kultivovaná po dobu 72 h při optimální teplotě kultivace na temperované třepačce při 180 rpm. Poté byl obsah zcentrifugován při 6 000 rpm a výsledný supernatant byl uchován pro další práci.

Tab. 11: Použité bakteriální kmeny s příslušnými označením produkčních médií

Mikroorganismus	Označení MO	Produkční médium
<i>Cupriavidus necator</i> H16 CCM 3726	CnH16	m ₂ X
<i>Pseudomonas putida</i> KT 2440	PP	m ₂ X
<i>Burkholderia cepacia</i> CCM 2656	BuCe	m ₂ Y
<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	BuSa	m ₂ Y
<i>Haloferax mediterranei</i> DSM 1411	HXM	m ₂ HXM
<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662T	HH	m ₂ Z
<i>Halomonas organivorans</i> CCM7142	HO	m ₂ Z
<i>Halomonas salina</i> CCM 4361	HS	m ₂ Z
<i>Halomonas elongata</i> CCM 3756	HE	m ₂ Z
<i>Pseudomonas fulva</i>	D ₃	m ₂ X
<i>Pseudomonas gessardii</i>	D ₂	m ₂ X

Tab. 12: Složení roztoku stopových prvků MES

Látka	m [g]	V [ml]
FeCl ₃	9,7	
CaCl ₂	7,8	
CuSO ₄	0,156	
CoCl ₂	0,119	
NiCl ₂	0,118	
CrCl ₂	0,062	
0,1 M HCl		1 000

Tab. 13: Složení roztoku stopových prvků TES

Látka	m [g]	V [ml]
ZnSO ₄	0,1	
MnCl ₂	0,03	
H ₃ BO ₃	0,3	
CoCl ₂	0,2	
CuSO ₄	0,02	
NiCl ₂	0,02	
Na ₂ MoO ₄	0,03	
Destilovaná voda		1 000

3.2.2 Složení produkčních médií

Složení produkčního média m₂X pro kultivaci bakterií *Cupriavidus necator* (CnH16), *Pseudomonas putida* (PP), *Pseudomonas fulva* (D₃), *Pseudomonas gessardii* (D₂) je uvedeno v Tab. 14. Kultivace bakterií PP a D₃ na tomto médiu byla provedena i s obměnou cukru, kdy byla fruktóza nahrazena glukózou. Takto upravené médium je potom označeno jako mG.

Tab. 14: Složení produkčního média m₂X

Látka	m [g]	V [ml]
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1	
KH ₂ PO ₄	1,05	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	
Fruktóza	20	
MES		1
Destilovaná voda		1 000

Složení produkčního média m₂Y pro kultivaci bakterií *Burkholderia cepacia* (BuCe), *Burkholderia sacchari* (BuSa) je uvedeno v Tab. 15.

Tab. 15: Složení produkčního média m₂Y

Látka	m [g]	V [ml]
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9,02	
KH ₂ PO ₄	1,5	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1	
NH ₄ Fe ^{III} citrát	0,06	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	
Glukóza	20	
TES		1
Destilovaná voda		1 000

Složení produkčního média m_2Z pro kultivaci bakterií *Halomonas halophila* (HH), *Halomonas organivorans* (HO), *Halomonas salina* (HS) a *Halomonas elongata* (HE) je uvedeno v Tab. 16. *NaCl byla přidávána do produkčního média u jednotlivých bakterií v tomto množství: HH 66 g/l, HE 30 g/l, HS a HO 81 g/l.

Tab. 16: Složení produkčního média m_2Z

Látka	m [g]	V [ml]
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1	
KH ₂ PO ₄	1,05	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	
NaCl	*	
Glukóza	20	
MES		1
Destilovaná voda		1 000

Složení produkčního média m_2HXM pro kultivaci bakterie *Haloferax mediterranei* (HXM) je uvedeno v Tab. 17.

Tab. 17: Složení produkčního média m_2HXM

Látka	m [g]	V [ml]
NaCl	150	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,69	
KCl	4	
NH ₄ Fe ^{III} citrát	0,063	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	20	
NaHCO ₃	0,25	
NaBr	0,5	
Yeast extract	6,25	
Glukóza	20	
SL6		1,25
Destilovaná voda		1 000

3.2.3 Příprava produkčních médií pro vybrané bakterie

Na základě předchozích výsledků byly pro podrobnější studium vybrány bakterie *Pseudomonas putida* (PP) a *Pseudomonas fulva* (D₃) k podpoření jejich produkce přidavky různých zdrojů uhlíků, dusíků a ovlivňováním jejich vzájemného poměru C:N.

Nejprve byly připraveny jejich inokulační NB média do 100 ml Erlenmeyerových baněk v objemu 50 ml. Ta byla kultivována po dobu 24 hodin, při 30 °C a při 180 rpm.

Celkem byly připraveny čtyři druhy produkčních médií, přičemž základní složení produkčního média mG je uvedeno v Tab. 18. Do Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml bylo připraveno vždy 100 ml daného produkčního média.

Z mG média zbývající tři média vždy vycházela. Médium mGY bylo doplněno pouze o 1 g/l yeast extractu. Médium mGO bylo doplněno po sterilaci o 1 g/l oleje a médium mGYO bylo doplněno ještě před sterilací o 1 g/l yeast extractu a po jeho sterilaci o 1 g/l oleje.

Roztok glukózy a roztok stopových prvků MES, jehož složení je uvedeno v Tab. 12 byly připraveny předem a byly přidány v laminárním boxu vždy až po sterilaci produkčního média. Rovněž bylo po sterilaci do produkčních médií sterilně zaočkováno 20 % objemu připravených inokulačních médií.

Připravená produkční média byla kultivovaná po dobu 24, 48 a 72 h při optimální teplotě kultivace na temperované třepačce při 180 rpm.

Ve 24, 48 a 72 hodinových intervalech bylo vždy odebráno 40 ml produkčního média, to bylo následně zcentrifugováno při 6 000 rpm a výsledný supernatant byl uchován pro další práci.

Tab. 18: Základní složení produkčního média mG

Látka	m [g]	V [ml]
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1	
KH ₂ PO ₄	1,05	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	
Glukóza	20	
MES		1
Destilovaná voda		1 000

3.3 Stanovení obsahu biomasy

Bylo stanovováno množství biomasy u jednotlivých druhů bakterií a to jak po jejich kultivaci v inokulačním médiu, tak po jejich kultivaci v médiu produkčním.

3.3.1 Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Pro stanovení obsahu biomasy bylo odebráno z Erlenmeyerových baněk obsahujících příslušnou kulturu do centrifugačních zkumavek 10 ml vzorku, a to vždy ve dvou paralelních sadách. Suspenze byla zcentrifugována při 6 000 rpm po dobu 5 minut, supernatant byl slit. Následně bylo k sedimentu přidáno 5 ml destilované vody. Pomocí vortexu byla směs rozsuspendována a opět stočena za stejných podmínek s opětovným slitím supernatantu. Takto připravená biomasa byla v otevřených centrifugačních zkumavkách umístěna do termostatu a vysušena při 60 °C do konstantní hmotnosti. Po úplném vysušení byla biomasa zvážena na analytických vahách a průměrem dvou odebraných vzorků bylo určeno výsledné množství biomasy (g/l).

3.3.2 Spektrofotometrické stanovené obsahu biomasy

Obsah biomasy byl stanovován i spektrofotometrickou metodou, jejíž princip spočívá v měření zákalu. Intenzita zákalu byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 630 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda.

3.4 Optimalizace metod

Ve všech níže uvedených metodách byl použit jako pozitivní kontrola 5 obj. % roztok Tritonu X-100 a jako negativní kontrola byla použita destilovaná voda.

5 % roztok Triton X-100 byl připraven napipetováním 5 ml Tritonu X-100 ze zásobní láhve do odměrné baňky a doplněním po rysku destilovanou vodou na 100 ml.

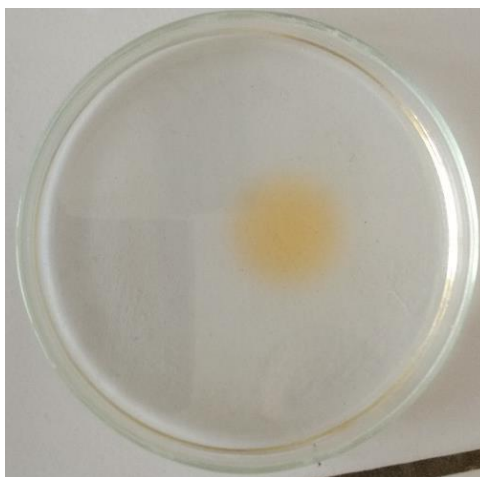
Jako testované vzorky byly ve všech metodách použity supernatanty, které byly získány po kultivacích jednotlivých bakterií na různých typech médií.

3.4.1 Metoda rozšiřování oleje – „Oil spreading assay“

Petriho misky byly naplněny 40 ml destilované vody, následně bylo na povrch každé misky aplikováno vždy 100 μ l oleje a 50 μ l testovaného vzorku. Pro srovnání výsledků byla vždy použita pozitivní a negativní kontrola.

Byla pozorována schopnost vyvolat vznik „čistící zóny“ na povrchu oleje, jakožto důkaz přítomnosti biosurfaktantů [54].

Na Obr. 11 je zachycena Petriho miska naplněná destilovanou vodou po přidání oleje.



Obr. 11: Petriho miska naplněná destilovanou vodou po přidání oleje

3.4.2 Stanovení aktivity emulze – „Emulsification capacity assay“

Do skleněných zkumavek o stejné velikosti byly přidány 3 ml n-hexanu a 3 ml testovaného vzorku. Tyto zkumavky byly zazátkovány a každá promíchána po dobu jedné minuty na vortexu. Stejným způsobem byla pro srovnání připravena pozitivní i negativní kontrola.

Takto připravené vzorky byly ponechány po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Po 24 hodinách byla změřena pomocí pravítka výška stabilizované emulzní vrstvy a byl vypočítán emulgační index E_{24} podle níže uvedené rovnice (4):

$$E_{24} = \frac{h_{emulze}}{h_{tot}} \cdot 100 \% \quad (4)$$

kde h_{emulze} označuje výšku emulzní vrstvy a h_{tot} celkovou výšku kapaliny. Emulgační index E_{24} koreluje s koncentrací surfaktantu. Přítomnost biosurfaktantu je tedy průkazná v případě vytvoření emulgační vrstvy [43].

3.4.3 Solubilizace krystalického antracenu – „Solubilization of crystalline anthracene“

5 ml testovaného vzorku bylo napipetováno do centrifugačních zkumavek obsahující krystaly hydrofobního antracenu. Stejným způsobem byla pro srovnání připravena pozitivní i negativní kontrola. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě na třepačce po dobu 24 hodin. Poté byly vzorky zcentrifugovány při 6 000 rpm po dobu 5 minut.

Takto připravené vzorky byly proměřeny fotometricky při 354 nm v křemenných kyvetách, přičemž koncentrace rozpuštěného antracenu souvisela s produkcí biosurfaktantů. Jako blank byla použita negativní kontrola [50].

3.4.4 Penetrační test – „Penetration assay“

Dutiny 96 jamkové destičky byly naplněny 150 μ l hydrofobní pasty sestávající z rostlinného oleje a silikagelu. Takto připravená pasta byla překryta 20 μ l rostlinného oleje. 90 μ l testovaného vzorku bylo obarveno smícháním s 10 μ l nilské červeně a umístěno na povrch pasty. Stejným způsobem byla pro srovnání připravena pozitivní i negativní kontrola.

Pokud je biosurfaktant přítomen, vede kontakt dvou nerozpustných fází ke změně barvy z červené na zakalenou bílou, jelikož dochází k prolomení olejové bariéry a tedy adsorpci barvy na silikagel. Popsaný efekt spočívá v tom, že silikagel proniká do hydrofilní fáze z hydrofobní pasty mnohem rychleji, jestliže je biosurfaktant přítomen. V případě, že testovaný vzorek biosurfaktant neobsahuje, ke změně barvy nedochází [43].

3.4.5 Orcinolová metoda – „Orcinol assay“

Do mikrozkušavek typu Eppendorf bylo napipetováno 400 μ l testovaného vzorku. Toto množství bylo dvakrát extrahováno se 750 μ l diethyletheru a následně promícháno na vortexu po dobu 3 minut. Frakce byly odpařeny do sucha a bylo přidáno 400 μ l fosfátového pufru o pH 8, znovu promícháno na vortexu. Dále bylo z takto připravené směsi odebráno 100 μ l do nové mikrozkušavky typu Eppendorf a bylo přidáno 900 μ l orcinolového činidla (0,19 % orcinol v 53 % obj. kyselině sírové). Vzorky byly následně zahřívány ve vodní lázni po dobu 30 minut při 80 °C a poté ochlazeny při pokojové teplotě. Stejným způsobem byla pro srovnání připravena pozitivní a negativní kontrola, která sloužila jako blank.

Pomocí spektrofotometru byla měřena optická hustota takto připravených vzorků při vlnové délce 421 nm za účelem stanovení přímého množství rhamnolipidů v testovaných vzorcích [55].

3.4.6 Metoda Du-Nouy-Ring

Tato metoda byla provedena za pomoci automatizovaného tenziometru Sigma 701, který je zachycen na Obr. 12. Nastavení dílčích parametrů bylo provedeno pomocí aplikačního softwaru SGSERVER. K měření bylo potřeba 30 ml testovaného vzorku, přičemž měření jednoho vzorku trvalo přibližně 10 minut a bylo z něj získáno 10 hodnot. Naměřené hodnoty jednotlivých vzorků byla pro jejich vyhodnocení exportována do MS Excel.

Metoda Du-Nouy-Ring je založena na interakci platinového kroužku s testovaným vzorkem, přičemž je měřena síla potřebná k oddělení platinového kroužku z rozhraní nebo povrchu kapaliny. Tato síla je úměrná povrchovému napětí. Přítomnost produkce biosurfaktantu danou kulturou je průkazná, pokud dojde ke snížení kapalného média na 40 mN/m nebo méně. Aby nedošlo k jakékoliv kontaminaci vzorků vzájemně mezi sebou, byl platinový kroužek před každým měřením řádně opálen v ohni [48].



Obr. 12: Automatizovaný tenziometr, KSV, Sigma 701

3.4.7 CTAB agarový test – „CTAB agar assay“

Byly připraveny dva druhy agarových minerálních médií doplněné vždy o 0,5 mg/ml cethyltrimethylamoniumbromidem (CTAB) a 0,2 mg/ml methylenovou modří (MB). Jako jedno z minerálních médií bylo použito produkční médium m₂X jehož složení je uvedeno v Tab. 14 doplněné pouze o 17 g/l agaru. Složení druhého minerálního média je uvedeno v Tab. 19.

Roztok fruktózy a stopových prvků MES byly do jednotlivých médií přidány až po jejich sterilaci.

Oba typy minerálních médií byly nality do sterilních Petriho misek a byly ponechány ke zchladnutí. Následně do nich byla vytvořena jamka a pomocí bakteriologické kličky byly

zaočkovány jednotlivé bakteriální izoláty. Takto připravené vzorky byly ponechány po dobu čtrnácti dní v inkubátoru při 30 °C.

Tvorba tmavě modrého kruhu kolem kultury je považována jakožto důkaz tvorby biosurfaktantů, jelikož tvoří nerozpustnou iontovou dvojici s CTAB a methylenovou modří [53].

Tab. 19: Složení minerálního média pro CTAB agarový test

Látka	m [g]	V [ml]
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1	
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	0,9	
KH ₂ PO ₄	0,7	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,4	
NaNO ₃	2	
Agar powder	17	
Fruktóza	20	
MES		2
Destilovaná voda		1 000

3.5 Extrakce rozpouštědly

Pro extrakci biosurfaktantů rozpouštědly byly vybrány supernatanty bakterie PP a D₃.

Jako extrakční rozpouštědla byla zvolena ethylacetát, diethylether a methanol-chloroform v poměru 1:1 a 1:3. Testovaný vzorek a extrakční činidlo byly vždy v poměru 1:1, v našem případě tedy 5 ml každého z nich. Vzorky byly ponechány po dobu 24 hodin na třepačce. Poté z nich byla vždy odebrána organická fáze.

Pro získání vyššího výtěžku byl supernatant bakterie PP v poměru 1:1 a tedy o objemu 90 ml každého z nich, extrahován v dělicí nádobě s ethylacetátem a následně methanol-chloroformem (1:1). Organická fáze byla ihned odebrána a do sucha odpařena [56]. Extrakci methanol-chloroform (1:1) se supernatantem PP je možné vidět na Obr. 13.



Obr. 13: Extrakce methanol-chloroform (1:1) se supernatantem PP

3.6 Extrakce srážením

Pro extrakci biosurfaktantů srážením byly vybrány supernatanty bakterie PP a D₃.

Postupných přidávkem HCl bylo sníženo pH supernatantů získaných produkcí vybraných bakterií na pH = 2. Takto připravené vzorky byly ponechány po dobu 24 hodin v lednici při 4 °C.

Poté byly zcentrifugovány při 6 000 rpm po dobu 5 minut, supernatant byl slit a vzniklá sraženina byla vysušena v termostatu při 60 °C [56].

3.7 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Pro detekci biosurfaktantů pomocí TLC byly použity vzorky získané extrakcí supernatantu PP v ethylacetátu a metnanol-chloroformu (1:1). Takto připravené vzorky a komerční rhamnolipidový extrakt byly rozpuštěny v 99,8 % ethanolu. Na hliníkovou destičku pokrytou silikagelem bylo vždy nanášeno 5 µl daného vzorku. Komerční rhamnolipidový extrakt obsahujícího mono- a di-rhamnolipidy byl použit jako standard.

Vyvíjecí směs byla připravena podle Tab. 20.

Tab. 20: Jednotlivé složení a poměry vyvíjecí směsi

Látka	Poměr
Chloroform:Methanol:20 % kyselina octová	65:15:2
Chloroform:Methanol:voda	65:15:2
Chloroform:Methanol:20 % kyselina octová	15:65:2
Chloroform:Methanol:20 % kyselina octová	40:40:2
Chloroform:Methanol:80 % kyselina octová	65:15:2

Pro vizualizaci rhamnolipidů na TLC destičkách bylo připraveno detekční činidlo složené z 0,15 g orcinolu, 8,2 ml kyseliny sírové (60%) a 42 ml destilované vody.

Po vyvzlínání byly TLC destičky usušeny a následně byly postříkány detekčním činidlem. Poté byly inkubovány 10 minut při 110 °C [29].

3.8 Infračervená spektroskopie

Pro infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR) byly pomocí extrakce rozpouštědly a srážením připraveny vzorky PP a D₃ podle výše uvedeného postupu. Takto připravené vzorky byly měřeny pomocí infračervené spektroskopie, metodou úplného zeslabeného odrazu (jednoodrazový diamantový ATR nástavec).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část byla zaměřena na produkci biosurfaktantů vybraných bakteriálních kmenů a jejich následnou charakterizaci. Mezi vybrané bakteriální kmeny patřily bakterie rodů *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Halomonas*, *Haloferax*, *Cupriavidus* a přírodní izoláty získané z půdy zamořené ropou. Všechny zkoumané bakterie mají schopnost kumulovat PHA.

V rámci práce byly použity kultivační, spektroskopické, screeningové a separační metody, přičemž převážná část experimentů byla věnována právě screeningovým metodám. Jednotlivé screeningové metody byly vždy otestovány na pozitivní i negativní kontrole a optimalizovány. Rovněž byly porovnány s ohledem na jejich časovou a finanční náročnost, množství vzorku, opakovatelnost a další. Byla porovnána mikrobiální produkce biosurfaktantů, jak se liší v inokulačních a v jejich produkčních médiích.

4.1 Kultivace v inokulačních médiích

Pro primární screening biosurfaktantů bylo použito jedenáct testovaných vzorků supernatantů získaných po kultivacích jednotlivých bakterií v komplexních inokulačních médiích. Složení médií pro jednotlivé testované kmeny i postup kultivace je uveden v kapitolách 3.2.1 a 3.2.2.

4.1.1 Metoda rozšiřování oleje (OSM)

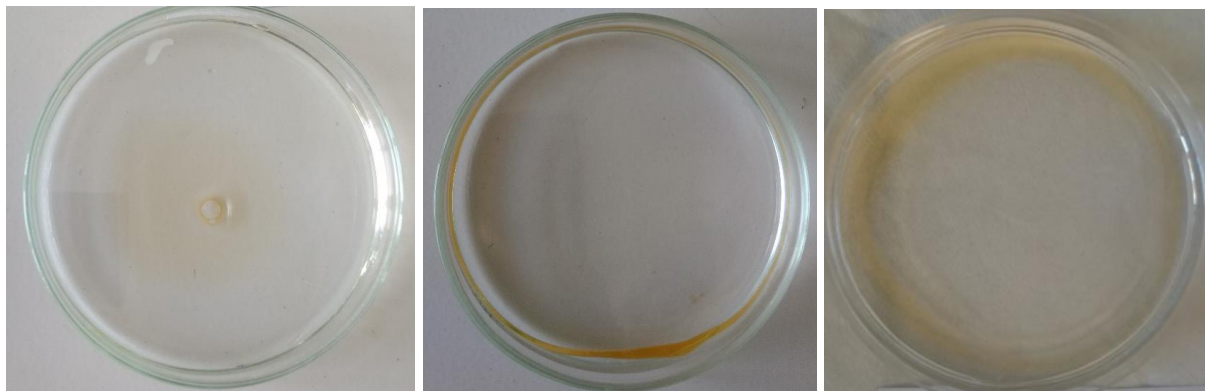
Metoda rozšiřování oleje je založena na schopnosti vyvolat „čisticí zónu“ na povrchu oleje. Jedná se o nepřímé měření povrchové aktivity vzorku, přičemž čím je zóna větší, tím vyšší povrchovou aktivitu by měl vzorek vykazovat. Velikost zón testovaných vzorků byla porovnána s velikostí zón pozitivní (Triton X-100) a negativní kontroly (destilovaná voda).

Biosurfaktant je amfifilní sloučenina, která je tvořena polární a nepolární částí. V případě, že byl v testovaném vzorku biosurfaktant přítomen, došlo po jeho aplikaci doprostřed kapky oleje, který je nepolární sloučeninou k inverznímu uspořádání micel a tedy k „navazování“ molekul vody na polární konce biosurfaktantů. Přičemž čím byl daný biosurfaktant koncentrovanější, tím větší „čisticí zónu“ byl schopen vyvolat a tím větší množství molekul vody byl na sebe schopen navázat.

Supernatanty všech testovaných vzorků vykazovaly přítomnost povrchově aktivních látek, jelikož došlo ke zvětšení zóny ve srovnání s negativní kontrolou ve všech případech. Z jedenácti testovaných vzorků jich šest vytvořilo výraznou „čisticí zónu.“ Jednalo se o vzorky supernatantů získané po kultivaci bakterií PP, D₃, D₂, HH, CnH16 a HO. Přičemž nejvýraznějšího výsledku dosáhla PP, jejíž „čisticí zóna“ se téměř shodovala s „čisticí zónou“ pozitivní kontroly. Supernatanty získané po kultivaci bakterií HS, HE, HXM, BuSa a BuCe rovněž vykazovaly přítomnost povrchově aktivních látek ve srovnání s negativní kontrolou, avšak jejich „čisticí zóny“ nebyly na první pohled tak výrazné.

Jedná se o citlivou kvalitativní metodu testování produkce biosurfaktantů. Metoda rozšiřování oleje je rychlou a snadnou metodou, nevyžadující žádné specializované vybavení a je zapotřebí pouze malý objem vzorku v řádu µl.

Na Obr. 14 je možné vidět vyvolané čistící zóny po aplikaci destilované vody, Tritonu X-100 a supernatantu získaného po kultivaci bakterie PP.



Obr. 14: Čistící zóny vyvolané po aplikaci destilované vody (vlevo), Tritonu X-100 (uprostřed) a supernatantu získaného po kultivaci bakterie PP (vpravo)

4.1.2 Stanovení emulgační aktivity

Jedná se o kvalitativní test vizualizovaný tvorbou krémové emulze. Přičemž emulzi můžeme definovat jako heterogenní systém složený z nemísitelné kapaliny dispergované jako mikroskopické kapičky v jiné kapalné kontinuální fázi. Stanovení emulgační aktivity je jedním z kritérií, jak vybrat potenciálního producenta biosurfaktantů, přičemž by mělo platit, že čím méně je emulze průhledná, tím je biosurfaktant koncentrovanější. Provedení testu emulgační aktivity je popsáno v kapitole 3.4.2.

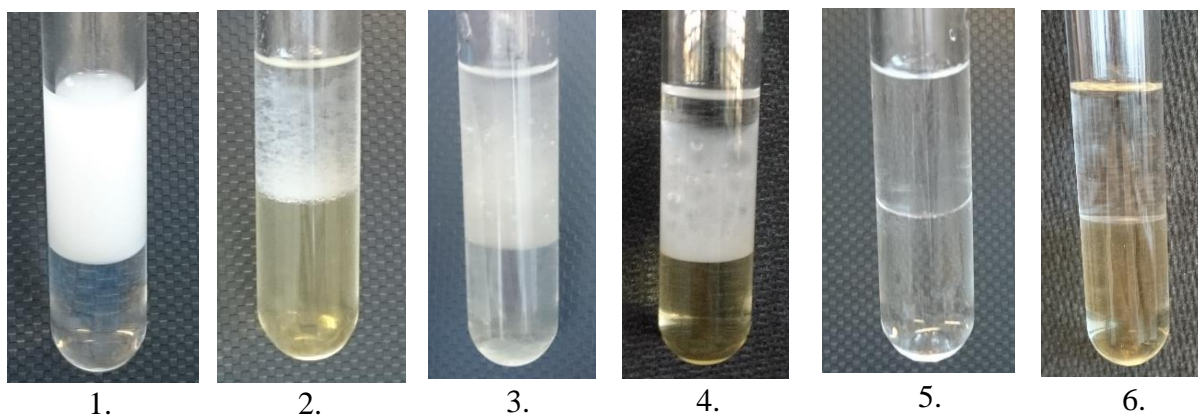
Emulgační aktivita byla vyhodnocena na základě výpočtu emulgačního indexu podle výše uvedené rovnice (4). Emulgační index pozitivní kontroly odpovídal 58 %, přičemž emulgovaná vrstva byla zcela kompaktní, neprůhledná v celém svém objemu. V případě negativní kontroly k tvorbě emulgační vrstvy nedošlo a hodnota emulgačního indexu tedy odpovídala 0 %. Hodnoty jednotlivých emulgačních indexů a vzhled emulgované vrstvy po aplikaci supernatantů získaných po kultivaci jednotlivých bakterií jsou uvedeny v Tab. 21.

Tab. 21: Emulgační indexy a vzhled emulgované vrstvy po aplikaci supernatantů získaných po kultivacích jednotlivých bakterií v inokulačních médiích

MO	Emulgační index, E_{24} [%]	Vzhled emulgované vrstvy
PP	41,2	kompaktní neprůhledná, bílá vrstva
D ₂	44,0	vrstva nebyla zcela kompaktní, nejhutnější byla na rozhraní fází, dále byla hodně perforovaná
D ₃	36,7	vrstva nebyla zcela kompaktní, nejhutnější byla na rozhraní fází, dále se podobala spíše pěně
HH	1,0	velmi nepatrná, bílá emulgační vrstva na rozhraní fází
HE	44,0	vrstva nebyla zcela kompaktní, nejhutnější byla na rozhraní fází, dále se podobala spíše pěně
HS	30,0	vrstva nebyla zcela kompaktní, nejhutnější byla na rozhraní fází, dále byla hodně perforovaná
HO	42,0	vrstva nebyla zcela kompaktní, nejhutnější byla na rozhraní fází, dále byla hodně perforovaná
HXM	0,0	nedošlo k tvorbě žádné emulgované vrstvy
Buce	13,2	celá vrstva byla hodně perforovaná
BuSa	54,9	kompaktní neprůhledná, bílá vrstva
CnH16	19,6	celá vrstva byla hodně perforovaná
PK	58,0	kompaktní, neprůhledná, bílá vrstva

Z tabulky je patrné, že pouze bakterie HXM v rámci emulgačního testu nevykazovala žádnou emulgační aktivitu. Bakterie HH sice pravděpodobně produkovala látky vykazující emulgační aktivitu, ale oproti ostatním producentům se zdá tato hodnota jako zanedbatelná. Velmi výrazného výsledku v rámci tohoto testu dosáhla bakterie BuSa se svojí hodnotou E_{24} 54,9 % a velmi kompaktní neprůhlednou emulgovanou vrstvou se tak nejvíce přiblížila PK. Nicméně v tomto případě je možné, že emulgační aktivita média nebyla důsledkem produkce biosurfaktantu bakteriální kulturou, ale spíše přítomností kaseinu, který je součástí kultivačního média. Další výborných výsledků, které je třeba zmínit, dosáhla PP se svým E_{24} 41,2 %. Ačkoliv bakterie D₂, HE a HO vykazovaly vyšší E_{24} , jak PP, jejich emulgační vrstva byla hodně perforovaná a ne příliš kompaktní. Lze tedy říci, že přes jejich vysoký E_{24} , nejsou jimi produkované látky vykazující emulgační aktivitu tak silné. Na Obr. 15 je možné vidět příklady některých testovaných vzorků.

Stanovení emulgační aktivity je jednoduchou metodou, nevyžadující žádné speciální vybavení, využívající množství vzorku v řádu ml. Je vhodnou metodou pro určení přítomnosti biosurfaktantů v testovaném vzorku. V rámci přípravy se jedná o rychlou metodu, avšak její vyhodnocení je možné až za 24 hodin.



Obr. 15: Emulgační aktivity jednotlivých testovaných vzorků: 1. PK, 2. D₃, 3. BuSa, 4. PP 5. HXM, 6. NK

4.1.3 Orcinolová metoda

Pro stanovení přímého množství rhamnolipidů, jakožto nejčastějších bakteriálních biosurfaktantů, byly testované vzorky měřeny pomocí spektrofotometru při vlnové délce 421 nm. Vzorky byly pro měření připravovány vždy v paralelní sadě. Jak je však z Tab. 22 patrné, nepodařilo se nám nachystat vzorky tak, aby jejich hodnoty vycházely stejně a bylo tak možné určit, zda byl rhamnolipid produkován nebo ne.

Orcinolová metoda vyžaduje množství vzorku v rámci μl a co se časového hlediska týká, je třeba přípravě věnovat několik hodin. Problematická je také její reprodukovatelnost, protože při opakování měření téhož vzorku nebylo možné získat srovnatelné hodnoty, v některých případech se od sebe paralelní měření lišili o více než 300 %.

Tab. 22: Hodnoty absorbancí ve dvou paralelně připravených vzorcích

MO	A ₁	A ₂
HE	0,000	0,008
HS	0,000	0,000
HO	0,209	0,027
HXM	0,425	0,000
PP	0,053	0,222
BuCe	0,062	0,245
BuSa	0,138	0,213
HH	0,033	0,140
D ₂	0,005	0,000
D ₃	0,309	0,000
CnH16	0,018	0,007

4.1.4 Penetrační test

Tento test je založen na kontaktu dvou nerozpustných fází vedoucích ke změně barvy z červené na zakalenou bílou. Ačkoliv byl tento test popsán jakožto jednoduchá, kvalitativní technika screeningu velkého množství potenciálních biosurfaktantů využívající pouze malé množství testovaného vzorku v řádu μl . Nebyl v našem případě pozorován žádný jasný rozdíl testovaných vzorků ve srovnání s pozitivní a negativní kontrolou, na základě kterého by bylo možné určit, jestli daný vzorek biosurfaktant obsahoval nebo ne.

4.1.5 CTAB agarový test

Tento test je založen na tvorbě tmavě modrého kruhu kolem kultury, ke kterému dochází, pokud přítomný biosurfaktant vytvoří nerozpustnou iontovou dvojici s CTAB a MB. Pro možnost porovnání vhodnějšího média pro růst kultury byly připraveny dva druhy agarových minerálních médií, které byly vždy doplněné o CTAB a MB. Avšak ačkoliv došlo k nárůstu kultur téměř u všech testovaných bakterií, ani v jednom případě nedošlo k tvorbě tmavě modrého kruhu kolem kultury, prokazující produkci biosurfaktantů.

CTAB agarový test nemusí být vhodný pro všechny druhy mikroorganismů, protože CTAB růst některých mikroorganismů inhibuje. Lze ho však nahradit jiným kationtově povrchově aktivním činidlem. Tento test se neřadí k příliš rychlým metodám, jelikož vyžaduje poměrně dlouhou dobu kultivace v řádu několika dní až týdnů.

4.1.6 Solubilizace krystalického antracenu

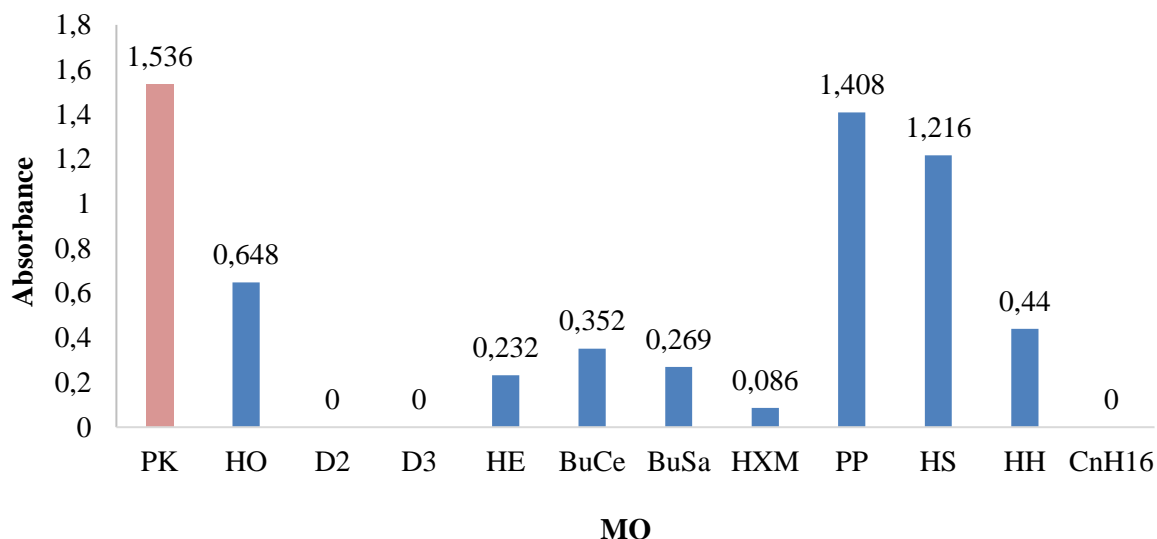
Pro stanovení koncentrace rozpuštěného antracenu byly připravené vzorky měřeny fotometricky při 354 nm, přičemž koncentrace antracenu souvisela s produkcí biosurfaktantů.

Všechny naměřené absorbance jednotlivých testovaných vzorků získané po odečtu absorbance jejich médií jsou znázorněny v Grafu 1. Solubilizace s čistými médii a její odečet byl proveden proto, že i samotné médium může solubilizovat antracen.

Antracen je nepochopitelná látka, která je v čistém vodném prostředí nerozpustná. Právě solubilizace je vhodnou metodou se schopností rozpouštět látky v čistém disperzním prostředí jinak nerozpustné. V našem případě tedy k včleňování nerozpustného antracenu do jádra micel biosurfaktantů. Z čehož tedy vyplývá, že čím koncentrovanější biosurfaktant vzorek obsahoval, tím vyšší hodnotu absorbance vykazoval.

Z Grafu 1 tedy vyplývá, že supernatanty všech bakterií, kromě D₂, D₃ a CnH16, vykazovaly přítomnost solubilizovaného antracenu a tedy i přítomnost povrchově aktivní látky v supernatanu. Jednoznačně nejvyšší hodnoty absorbance vykazovala PP se svojí hodnotou absorbance 1,408 v porovnání s hodnotou absorbance PK, která obsahovala komerčně dostupný surfaktant Triton X – 100 a jejíž hodnota byla 1,536. Lze tedy usuzovat, že PP nejenže biosurfaktant produkovala, ale rovněž lze hovořit o jeho přítomnosti ve značně koncentrované podobě. Za zmínku stojí jistě i výborný výsledek bakterie HS, jejíž absorbance odpovídala hodnotě 1,216. Poměrně pěkného výsledku dosáhla i bakterie HO s hodnotou absorbance 0,648.

Tuto metodu lze považovat za poměrně jednoduchou a rychlou, co se přípravy týká. Avšak vzhledem k tomu, že je třeba nechat vzorky 24 hodin inkubovat na temperované třepačce, je třeba počítat s časovou prodlevou mezi přípravou a získáním výsledků. Tato metoda vyžaduje množství vzorku v řádu ml.



Graf 1: Absorbance jednotlivých testovaných vzorků po odečtu absorbance jejich médií

4.1.7 Metoda Du-Nouy-Ring

K měření povrchového napětí připravených vzorků byl využit automatizovaný tenziometr. Jedná se o jeden z nejběžněji používaných způsobů testování produkce biosurfaktantů za využití mikroorganismů. Naměřené hodnoty povrchového napětí jednotlivých supernatantů získaných po kultivaci mikroorganismů v inokulačním médiu a jejich čistých médií před zaočkováním MO jsou uvedeny v Tab. 23. D. Cooper a spol. považovali ve své publikaci za kulturu produkující biosurfaktanty tu, která byla schopna snížit povrchové napětí kapalného média na 40 mN/m nebo méně [49].

Tab. 23: Naměřené hodnoty povrchového napětí jednotlivých supernatantu získaných po kultivaci mikroorganismů v inokulačním médiu a jejich čistých médií před zaočkováním MO

MO	$\sigma_{\text{supernatant}}$ [mN/m]	$\sigma_{\text{čistě médium}}$ [mN/m]	Rozdíl
D ₂	49,4	49,4	≈
D ₃	48,1	49,4	≈
HS	56,4	54,8	≈
HXM	54,8	54,9	≈
HE	54,3	55,7	≈
HO	51,6	54,8	≈
HH	48,3	45,2	≈
PP	30,4	49,4	↓
CnH16	50,2	49,4	≈
BuCe	46,8	49,4	≈
BuSa	49,4	48,7	≈
PK	32,3	72,0	

Z uvedené Tab. 23 je na první pohled patrné snížení povrchového napětí média vyvolané v případě bakterie PP, která dokázala snížit povrchové napětí svého čistého média ze 49,4 mN/m na 30,4 mN/m. Z čehož lze usuzovat, že bakterie PP produkuje biosurfaktant, jelikož dokázala snížit povrchové napětí výrazně pod hranici 40 mN/m, kterou ve svém článku publikoval D. Cooper a spol. Dalším zajímavým faktem je, že biosurfaktant produkovaný PP dokázal snížit povrchové napětí kapaliny dokonce ještě více jak komerčně dostupná povrchově aktivní látka Triton X-100, jejíž hodnota odpovídala 32,3 mN/m. V našem případě použita jako PK.

Pokud se podíváme na hodnoty povrchového napětí, které vykazovaly měřené supernatanty ostatních bakterií, vidíme, že u většiny zůstalo povrchové napětí stejné nebo se jen velmi málo snížilo, což mohlo být způsobeno i v rámci chyby měření.

K výhodám metody Du-Nouy-Ring patří přesnost, jednoduchost použití a výsledek v řádu minut. Vyžaduje však speciální vybavení. Nevýhodou je, že měření různých vzorků nelze provést současně a objem vzorku požadovaného pro analýzu zahrnuje několik desítek mililitrů.

4.1.8 Přehled výsledků po kultivaci mikroorganismů v inokulačních médiích

Pro lepší porovnání je v Tab. 24 uveden přehled výsledků jednotlivých testů. Jak je možné vidět, nejlepších výsledků bylo dosaženo v případě produkce bakterie PP. Jako jediná nejenže obstála ve všech provedených testech, ale rovněž v nich dosáhla zcela jednoznačně nejlepších výsledků potvrzujících produkci biosurfaktantů. Bakterie HS a HO dosáhly poměrně slušných výsledků ve třech ze čtyř provedených testů. Ačkoliv například oproti bakterii PP jejich emulgační vrstva nebyla zcela tak kompaktní a byla spíše více perforovaná. Ostatní bakterie uspěly ve všech případech alespoň ve dvou testech. Nejhorších výsledků dosáhla bakterie HXM. Jelikož se jedná o silně halofilní bakterii žijící v prostředí s vysokým obsahem soli. Pravděpodobně tak ke svému životu produkovat biosurfaktanty vůbec nepotřebuje.

Tab. 24: Přehled výsledků po kultivaci mikroorganismů v inokulačních médiích

MO	OSM	E_{24} [%]	Solubilizace antracenu	Du-Nouy-Ring [mN/m]
PP	+	41,2	1,408	30,4
D ₂	+	44,0	0,000	49,4
D ₃	+	36,7	0,000	48,1
HH	+	1,0	0,440	48,3
HE	+	44,0	0,232	54,3
HS	+	30,0	1,216	56,4
HO	+	42,0	0,648	51,6
HXM	+	0,0	0,086	54,8
Buce	+	13,2	0,352	46,8
BuSa	+	54,9	0,269	49,4
CnH16	+	19,6	0,000	50,2
PK	+	58,0	1,536	32,3

4.2 Kultivace v produkčních médiích

Pro primární screening biosurfaktantů bylo použito jedenáct testovaných vzorků supernatantů získaných po kultivacích jednotlivých bakterií v produkčních médiích standardně využívaných k produkci polyhydroxyalkanoátů. Složení médií pro jednotlivé testované kmeny i postup kultivace je uveden v kapitolách 3.2.1 a 3.2.2.

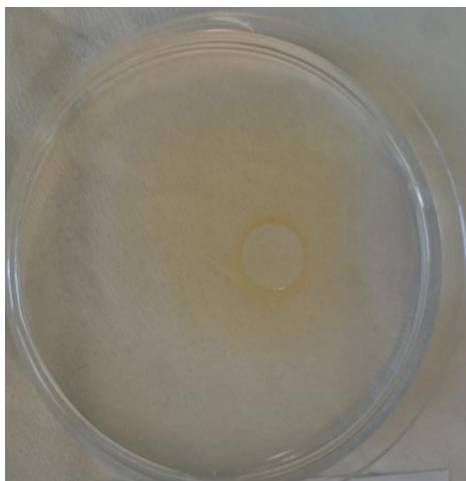
Produkční média na rozdíl od inokulačních médií ve většině případů neobsahují komplexní složku, která sama o sobě může vykazovat emulgační případně povrchovou aktivitu. Obecně jsou koncipována jako minerální média a hlavní důraz je kladen na celkovou cenu kultivačního média.

Vzhledem k tomu, že se některé metody použité na získaných supernatantech po kultivaci MO v inokulačních médiích neosvědčily, nebyly na supernatantech po kultivaci MO v produkčních médiích dále testovány. Jedná se o orcinolovou metodu, penetrační a CTAB agarový test.

4.2.1 Metoda rozšiřování oleje

Vzhledem k úspěšnosti metody po kultivaci bakterií v inokulačních médiích, byla tato metoda použita i po kultivaci bakterií v produkčních médiích k prokázání produkce biosurfaktantů u daných bakterií. Supernatanty získané po kultivaci bakterií v produkčních médiích byly rovněž srovnány s PK a NK.

Navzdory prokázání přítomnosti povrchově aktivních látek metodou rozšiřování oleje u všech testovaných bakterií v inokulačních médiích, po kultivaci bakterií v jejich produkčních médiích došlo ke zvětšení „čistící zóny“ pouze u PP. Supernatanty všech ostatních testovaných bakterií na přítomnost povrchově aktivních látek zůstaly bez odezvy. Ačkoliv PP zvětšila svoji „čistící zónu“ oproti NK, v porovnání s jejím zvětšením po její kultivaci v inokulačním médiu bylo toto zvětšení výrazně menší. Obr. 16 je zachycena „čistící zóna“ vyvolaná po aplikaci supernatantu PP získaného její kultivací v produkčním médiu.

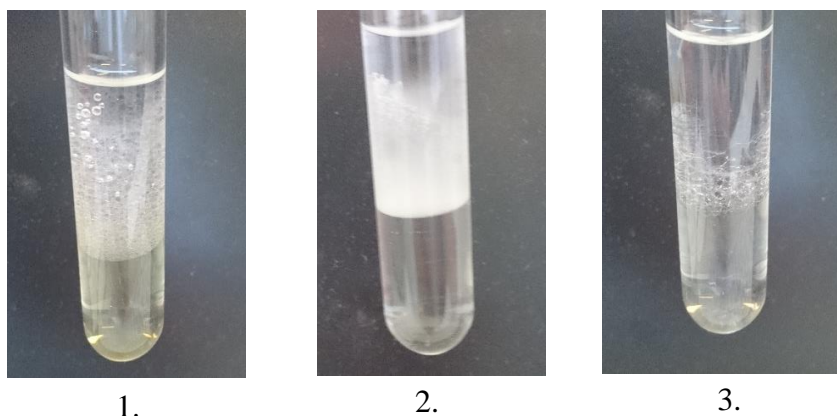


Obr. 16: „Čistící zóna“ PP vyvolaná po aplikaci supernatantu získaného její kultivací v produkčním médiu

4.2.2 Stanovení emulgační aktivity

V případě testu emulgační aktivity se supernatanty získanými kultivací bakterií v produkčních médiích na přítomnost látek vykazujících emulgační aktivitu byly nejvyšší hodnoty stanoveny u bakterie HE se svým E_{24} 41,8 % a PP se svým E_{24} 32,7 %. HE vykazovala sice vyšší emulgační index ve srovnání s PP, avšak její emulgační vrstva nebyla zcela kompaktní, nejhutnější zastoupení emulze bylo na rozhraní fází. Oproti tomu PP vytvořila krásnou kompaktní neprůhlednou vrstvu. Jak je z Tab. 25 patrné, ostatní bakterie vykazovaly buď poměrně malé emulgační indexy, které nemusí nutně potvrzovat přítomnost biosurfaktantů, nebo dokonce v pěti případech žádné. Na Obr. 17 je možné vidět příklady některých testovaných vzorků.

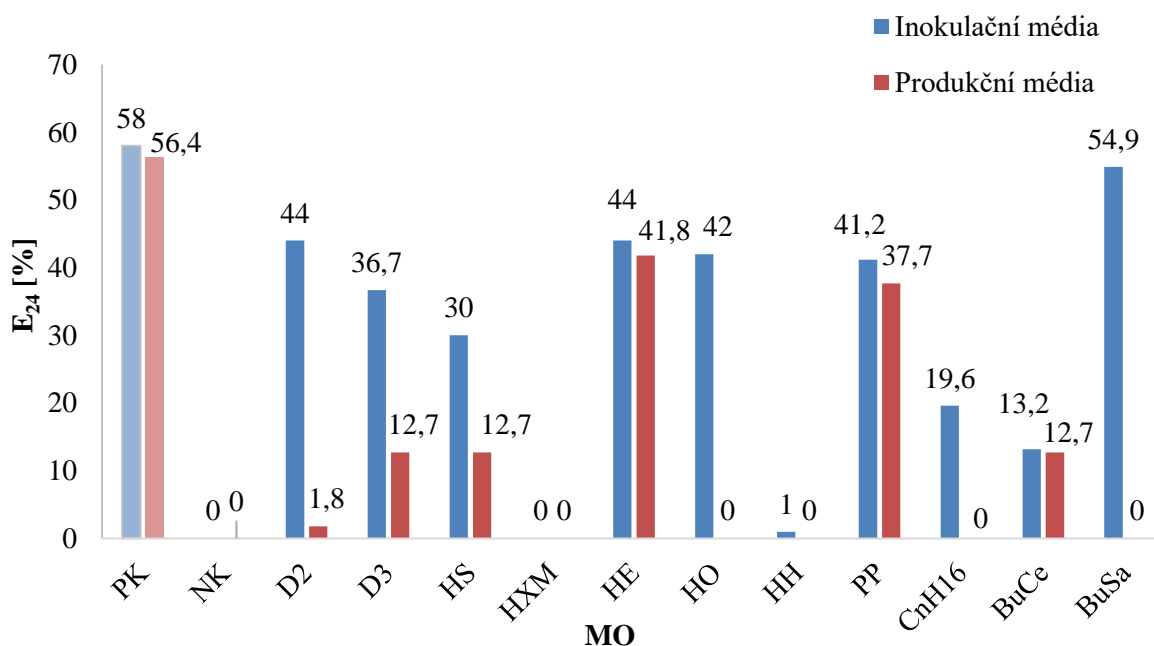
Pro srovnání emulgačních indexů po kultivaci bakterií v inokulačním a produkčním médiu byl vytvořen Graf 2. Pouze u třech bakterií a to HE, PP a BuCe byly hodnoty E_{24} v obou typech médií skoro srovnatelné. V ostatních případech nedošlo buď ke tvorbě žádné emulgační vrstvy, nebo k velmi rapidnímu rozdílu v emulgačních indexech mezi inokulačním a produkčním médiem jednoho druhu bakterie. Jelikož všechny testované bakterie jsou producenty PHA, mohly tak právě využít svůj zdroj uhlíku na jejich produkci místo produkce biosurfaktantů, případně produkce biosurfaktantů nejsou schopny.



Obr. 17: Emulgační aktivity jednotlivých testovaných vzorků: 1. HE, 2. PP a 3. D₃

Tab. 25: Emulgační indexy a vzhled emulgované vrstvy po aplikaci supernatantů získaných po kultivacích jednotlivých bakterií v produkčních médiích

MO	Emulgační index, E_{24} [%]	Vzhled emulgované vrstvy
PP	32,7	kompaktní neprůhledná, bílá vrstva
D ₂	1,8	nepatrná, bílá emulgační vrstva na rozhraní fází
D ₃	12,7	celá vrstva byla hodně perforovaná
HH	0,0	nedošlo k tvorbě žádné emulgované vrstvy
HE	41,8	vrstva byla kompaktní, bílá, podobající se pění
HS	12,7	celá vrstva byla hodně perforovaná
HO	0,0	nedošlo k tvorbě žádné emulgované vrstvy
HXM	0,0	nedošlo k tvorbě žádné emulgované vrstvy
Buce	12,7	celá vrstva byla hodně perforovaná
BuSa	0,0	nedošlo k tvorbě žádné emulgované vrstvy
CnH16	0,0	nedošlo k tvorbě žádné emulgované vrstvy
PK	56,4	kompaktní, neprůhledná, bílá vrstva

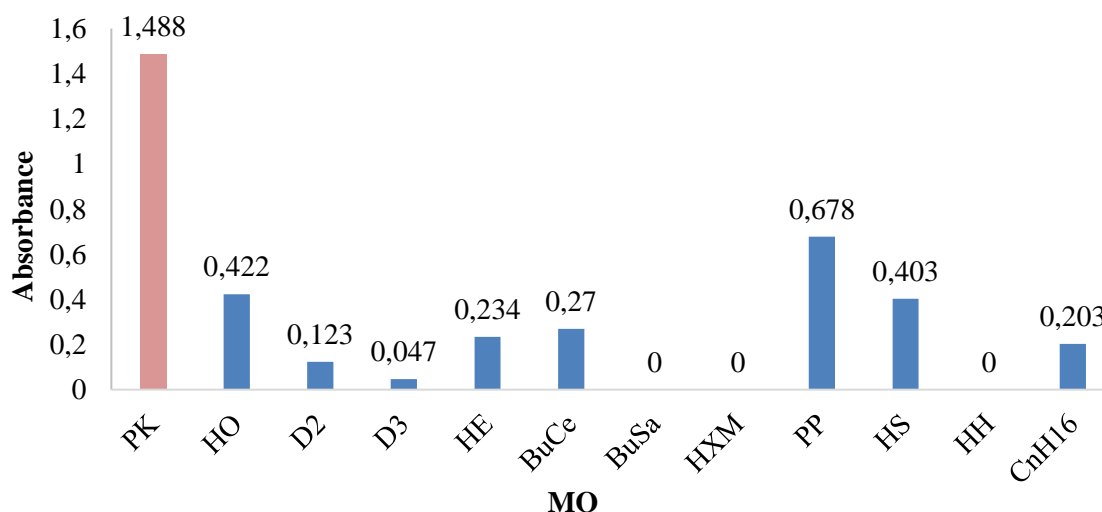


Graf 2: Srovnání E_{24} po kultivaci bakterií v inokulačních a produkčních médiích

4.2.3 Solubilizace krystalického antracenu

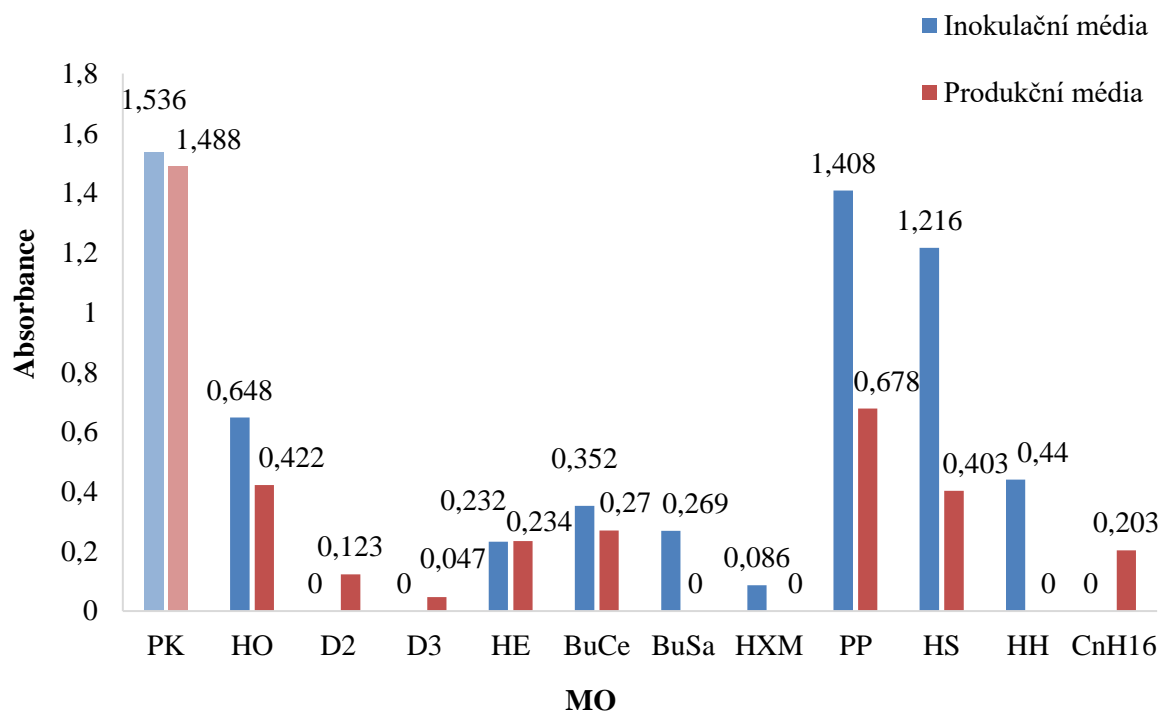
Všechny naměřené absorbance jednotlivých testovaných vzorků získané po odečtu absorbance jejich médií jsou zobrazeny v Grafu 3.

Z Grafu 3 vyplývá, že za těchto kultivačních podmínek všechny bakterie, až na BuSa, HXM a HH vykazovaly přítomnost solubilizovaného antracenu. Nejlepší hodnoty absorbance bylo dosaženo u bakterie PP, přičemž její hodnota byla 0,678. Další poměrně vysoké hodnoty absorbance v rámci kultivace bakterií v produkčních médiích vykazovaly bakterie HO se svojí hodnotou 0,422 a HS s hodnotou absorbance 0,403.



Graf 3: Absorbance jednotlivých testovaných vzorků po odečtu absorbance jejich médií

Pro srovnání absorbancí bakterií kultivovaných v inokulačním a produkčním médiu byl vytvořen Graf 4. Jak je možné vidět, až na absorbanci bakterie HE, došlo vždy k poklesu absorbance v produkčním médiu oproti inokulačnímu médiu. V případě PP na poloviční hodnotu a v případě HS dokonce až na třetinovou hodnotu, oproti jejich absorbanci v inokulačním médiu. Bakterie BuSa, HXM a HH dokonce nevykazovaly za těchto kultivačních podmínek v produkčním médiu žádnou hodnotu přítomnosti solubilizovaného antracenu. V případě bakterií D₂, D₃ a CnH16 došlo naopak k nárůstu absorbance a to z nulových hodnot, které tyto bakterie vykazovaly po kultivaci v inokulačním médiu.



Graf 4: Srovnání solubilizace antracenu po kultivaci bakterií v inokulačních a produkčních médiích

4.2.4 Metoda Du-Nouy-Ring

Naměřené hodnoty povrchového napětí jednotlivých supernatantů získaných po kultivaci mikroorganismů v produkčním médiu a jejich čistých médií před zaočkováním MO jsou uvedeny v Tab. 26. Jak už bylo několikrát uvedeno, D. Cooper a spol. považovali ve své publikaci za kulturu produkující biosurfaktanty tu, která byla schopna snížit povrchové napětí kapalného média na 40 mN/m nebo méně [49].

Z uvedené Tab. 26 tedy vyplývá, že snížit povrchové napětí pod hodnotu 40 mN/m a prokázat tak přítomnost biosurfaktantu se podařilo pouze bakterii PP a to velmi výrazně oproti jejímu čistému médiu, které vykazovalo hodnotu povrchového napětí 60,6 mN/m na 29,4 mN/m. Velmi zajímavého snížení dosáhla i bakterie D₃ oproti svému čistému médiu, které dokázala snížit rovněž z 60,6 mN/m na 45,6 mN/m. Hodnota jejího povrchového napětí se sice hodnotě 40 mN/m blížila nejvíce oproti všem ostatním měřeným bakteriím, ale této hranice nedosáhla. Další výrazných snížení oproti jejich čistému produkčnímu médiu bylo

dosaženo v případě bakterií HO a CnH16. V případě bakterií HH a BuCe došlo naopak k nárůstu jejich povrchových napětí, oproti jejich čistému produkčnímu médiu.

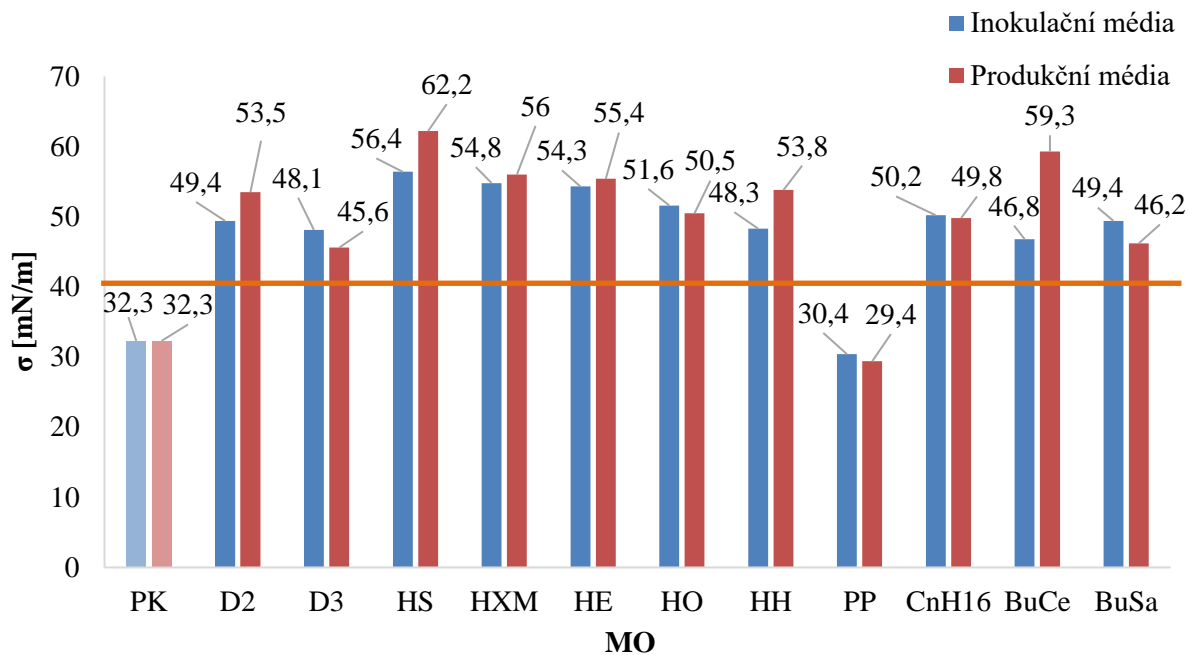
Tab. 26: Naměřené hodnoty povrchového napětí jednotlivých supernatantu získaných po kultivaci mikroorganismů v produkčním médiu a jejich čistých médií před zaočkováním MO

MO	$\sigma_{\text{supernatant}}$ [mN/m]	$\sigma_{\text{čisté médium}}$ [mN/m]	Rozdíl
D ₂	53,5	60,6	≈
D ₃	45,6	60,6	↓
HS	62,2	62,8	≈
HXM	56,0	49,8	≈
HE	55,4	48,8	≈
HO	50,5	62,8	↓
HH	53,8	43,9	↑
PP	29,4	60,6	↓
CnH16	49,8	60,6	↓
BuCe	59,3	56,6	↑
BuSa	46,2	56,6	≈
PK	32,3	72,0	

Pro srovnání povrchových napětí bakterií kultivovaných v inokulačním a produkčním médiu byl vytvořen Graf 5. Jak je možné vidět, snížení povrchového napětí pod hranici 40 mN/m se v obou případech podařilo pouze bakterii PP. Přičemž oproti její hodnotě povrchového napětí 30,4 mN/m po kultivaci v inokulačním médiu, dokázala po kultivaci v jejím produkčním médiu snížit povrchové napětí až na 29,4 mN/m. Nutno podotknout, že v případě jejího inokulačního média se jednalo o snížení povrchového napětí ze 49,4 mN/m na 30,4 mN/m a v případě produkčního média se jednalo o snížení povrchového napětí z 60,6 mN/m na 29,4 mN/m.

V případě bakterie D₃, D₂ a CnH16 rovněž došlo k výraznému poklesu, kdy po kultivaci v inokulačním médiu, které odpovídalo hodnotě 49,4 mN/m nedošlo buď k žádnému snížení, nebo jen velmi nepatrnému. Avšak po jejich kultivaci v produkčním médiu, které odpovídalo hodnotě 60,6 mN/m ho dokázaly snížit výrazně. D₃ na hodnotu odpovídající 45,6 mN/m, D₂ na 53,5 mN/m a CnH16 na 49,8 mN/m. Dané bakterie zde tedy vykazovaly daleko vyšší aktivitu. Další zajímavých snížení v rámci jejich kultivace v inokulačním a produkčním médiu bylo dosaženo u bakterií HO a BuSa.

Pokud ovšem porovnáme mezi sebou hodnoty povrchového napětí po kultivaci bakterií v inokulačním médiu a v produkčním médiu bez ohledu na to, o kolik snížily svoje čistá média. Zjistíme, že ve více jak polovině případů došlo k nárůstu povrchového napětí u měřených supernatantů po kultivaci bakterií v produkčních médiích. Pouze v případě D₃, HO, PP, CnH16 a BuSa došlo k poklesu povrchového napětí oproti jejich měřeným supernatantům po kultivaci bakterií v inokulačním médiu.



Graf 5: Srovnání povrchových napětí po kultivaci bakterií v inokulačních a produkčních médiích

4.2.5 Přehled výsledků po kultivaci mikroorganismů v produkčních médiích

V rámci lepšího zhodnocení výsledků jednotlivých testů byla vytvořena Tab. 27, kde se nachází přehled výsledků po kultivaci mikroorganismů v produkčních médiích. Jako už po kultivaci bakterie PP v inokulačním médiu, tak i po její kultivaci v produkčním médiu bylo v jejím případě dosaženo zcela jednoznačně nejlepších výsledků a to v rámci všech testů. Jako jediná prokázala svoji aktivitu v rámci metody rozšiřování oleje.

Další bakterie, která dosáhla po PP v rámci testů nejlepších výsledků, byla HE. Její emulgační index byl dokonce i o dost vyšší, jak v případě PP, ale opět je nutno podotknout, že ve srovnání s ní byla její emulgační vrstva perforovanější.

Naopak zcela negativní výsledky ve všech provedených testech měly bakterie HH, HXM a BuSa, tedy v žádném z testů nepotvrdily jakoukoliv přítomnost biosurfaktantů.

Tab. 27: Přehled výsledků po kultivaci mikroorganismů v produkčních médiích

MO	OSM	E_{24} [%]	Solubilizace antracenu	Du-Nouy-Ring [mN/m]
PP	+	32,7	0,678	29,4
D ₂	-	1,8	0,123	53,5
D ₃	-	12,7	0,047	45,6
HH	-	0,0	0,000	53,8
HE	-	41,8	0,234	55,4
HS	-	12,7	0,403	62,2
HO	-	0,0	0,422	50,5
HXM	-	0,0	0,000	56,0
Buce	-	12,7	0,270	59,3
BuSa	-	0,0	0,000	46,2
CnH16	-	0,0	0,203	49,8
PK	+	56,4	1,488	32,3

4.3 Kultivace vybraných bakterií PP a D₃ v produkčních médiích

Na základě vynikajících výsledků PP v obou typech médií ve všech provedených testech byla vybrána k podrobnějšímu prozkoumání společně s bakterií D₃, která dosahovala v rámci testů zajímavých výsledků. Vzhledem k tomu, že se však v obou případech jedná o bakterie stejného rodu a to *Pseudomonas*, avšak v případě D₃ o přírodní izolát z půdy zamořené ropou bylo zajímavé porovnat jejich vlastnosti a pokusit se v obou případech ještě více podpořit produkci biosurfaktantů.

4.3.1 Stanovení emulgační aktivity PP a D₃

Tento test byl proveden v 24, 48 a 72 hodinovém intervalu, přičemž bylo pozorováno, zdali má doba kultivace vliv na velikost emulgačního indexu a tedy produkci biosurfaktantu. Jak je z Tab. 28 patrné, v případě kultivace bakterie D₃ na různých typech produkčního média je zde vidět lineární nárůst emulgačního indexu s časem v rámci každého typu média. Rovněž můžeme vidět i lineární závislost s časem týkající se nárůstu kompaktnosti emulgační vrstvy v rámci každého typu média. Bezesporně nejlepší produkce látek vykazujících emulgační aktivitu bylo dosaženo při růstu D₃ na médiu mGY, kdy bylo médium doplněno kvasničním extraktem o komplexní zdroj uhlíku. Rovněž velmi dobrých výsledků bylo dosaženo i v případě, že bylo použito médium mG, kde byl použit pouze zdroj uhlíku ve formě glukózy. V případě kultivace D₃ na médiích mGO a mGYO, kdy byl v obou produkčních médiích použit

olej, který by měl produkci biosurfaktantů podporovat. Nedošlo ke vzniku příliš velkých emulgačních vrstev v porovnání s kultivací D₃ na médiích mG a mGY.

Tab. 28: Emulgační indexy a vzhled emulgované vrstvy bakterie D₃ po aplikaci supernatantů získaných po kultivacích jednotlivých bakterií v produkčních médiích

Doba kultivace	Použité médium	Emulgační index, E ₂₄ [%]	Vzhled emulgované vrstvy
24 hodin	mG	16,4	celá vrstva byla hodně perforovaná
	mGY	3,6	celá vrstva byla hodně perforovaná
	mGO	0,9	velmi nepatrná, bílá emulgační vrstva na rozhraní fází
	mGYO	0,9	velmi nepatrná, bílá emulgační vrstva na rozhraní fází
48 hodin	mG	25,5	vrstva byla kompaktní, bílá, podobající se pění
	mGY	41,8	celá vrstva byla perforovaná
	mGO	9,4	vrstva byla kompaktní, bílá, podobající se pění
	mGYO	14,5	vrstva byla kompaktní, bílá, podobající se pění
72 hodin	mG	38,2	vrstva byla kompaktní, bílá, podobající se pění
	mGY	49,1	vrstva byla kompaktní, bílá, podobající se pění
	mGO	18,2	vrstva byla kompaktní, nejhutnější byla na rozhraní fází, dále byla spíše perforovaná
	mGYO	23,6	vrstva byla kompaktní, bílá, podobající se pění
PK		56,4	kompaktní, neprůhledná, bílá vrstva

Ačkoliv PP dosahovala ve srovnání s D₃ ve všech předcházejících testech lepších výsledků. V případě jejího růstu na různých typech produkčních médií byla poněkud „slabší“, co se týká produkce látek vykazujících emulgační aktivitu v typech médií jako mGY, mGO a mGYO jak je patrné z Tab. 29. Nejenže, zde není vidět přímá závislost času na výšce její emulgační vrstvy,

ale rovněž při její kultivaci u těchto typů médií vykazovala i velmi nízké hodnoty emulgačního indexu.

Co se týká její kultivace v případě média mG, kde byla obsažena jako zdroj uhlíku pouze glukóza vykazovala vysoké emulgační indexy ve všech měřených časových intervalech. Ačkoliv ani zde nebyla dodržena lineární závislost růstu emulgačního indexu na čase. Nutno však vyzdvihnout její výsledek po 72 hodinách kultivace na tomto médiu, kdy její emulgační index odpovídal hodnotě 56,4 % a naprosto se shodoval s emulgačním indexem PK. Přičemž emulgovaná vrstva byla kompaktní, neprůhledná a bílá, přesně jak v případě PK.

Tab. 29: Emulgační indexy a vzhled emulgované vrstvy bakterie PP po aplikaci supernatantů získaných po kultivacích jednotlivých bakterií v produkčních médiích

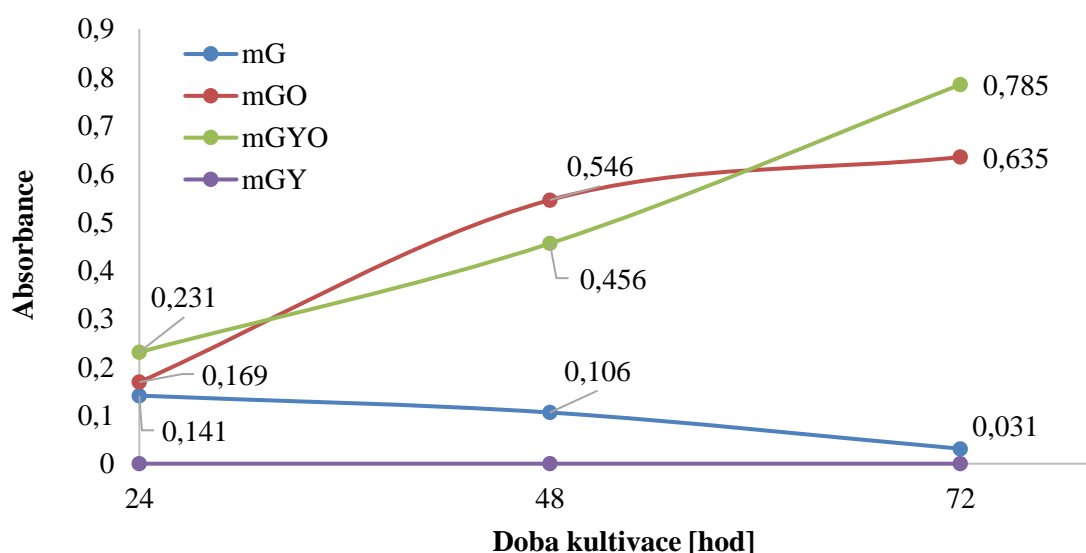
Doba kultivace	Použité médium	Emulgační index, E_{24} [%]	Vzhled emulgované vrstvy
24 hodin	mG	45,5	vrstva byla kompaktní, bílá, nejhutnější byla na rozhraní fází, dále se podobala spíše „cukrové vatě“
	mGY	7,3	kompaktní, neprůhledná, bílá vrstva
	mGO	5,5	nepatrná, bílá emulgační vrstva na rozhraní fází
	mGYO	1,8	velmi nepatrná, zakalená, perforovaná emulgační vrstva na rozhraní fází
48 hodin	mG	41,8	kompaktní, neprůhledná, bílá vrstva
	mGY	27,3	kompaktní, neprůhledná, bílá vrstva
	mGO	1,8	velmi nepatrná, bílá emulgační vrstva na rozhraní fází
	mGYO	3,6	nepatrná, bílá emulgační vrstva na rozhraní fází
72 hodin	mG	56,4	kompaktní, neprůhledná, bílá vrstva
	mGY	0,9	velmi nepatrná, bílá emulgační vrstva na rozhraní fází
	mGO	5,5	nepatrná, bílá emulgační vrstva na rozhraní fází
	mGYO	3,6	nepatrná, bílá emulgační vrstva na rozhraní fází
PK		56,4	kompaktní, neprůhledná, bílá vrstva

4.3.2 Solubilizace krystalického antracenu

Pro vzorky získané po různých kultivačních časech při kultivaci bakterií D₃ a PP na různých kultivačních médiích byla také provedena analýza solubilizace antracenu.

Absorbance vzorků D₃ po její kultivaci na různých typech produkčních médií, po odečtení absorbance jejich čistých médií je znázorněna v Grafu 6. Všechny uvedené hodnoty, až na hodnotu získanou po 48 hodinové kultivaci bakterie D₃ na médiu mGO nebylo v rámci měření nutné ředit.

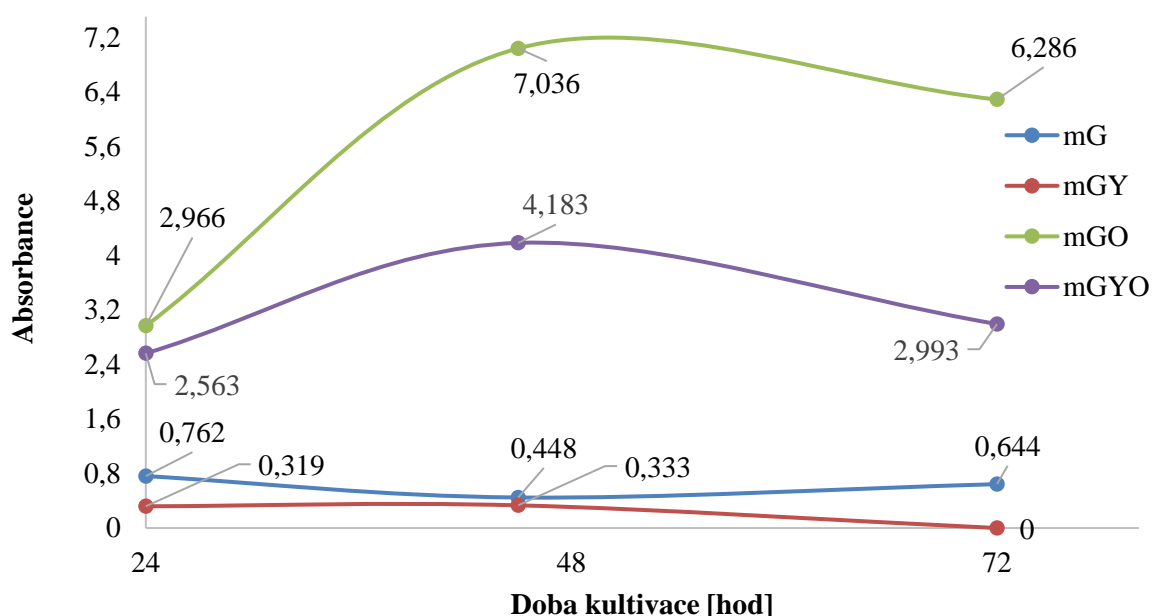
Pokud se tedy zaměříme na výsledky bakterie D₃, kterých dosáhla v rámci její kultivace na různých typech produkčních médií. Jak můžeme z Graf 6 vidět, největší absorbanci tato bakterie vykazovala po její kultivaci na médiu mGO a mGYO. Přičemž zde vidíme i lineární nárůst její absorbance s časem, který byl tedy po 72 hodinách kultivace největší. Tato informace je v souladu s literaturou, protože biosurfaktanty jsou ze své podstaty spíše sekundární produkt, a proto je jejich produkce obvykle spojena s pozdějšími fázemi kultivace. Nejhorší výsledek naopak vykazovala při její kultivaci na médiu mGY, kdy nedošlo k žádné solubilizaci antracenu. V případě její kultivace na médiu mG nebylo dosaženo příliš vysokých hodnot absorbance, naopak tato bakterie vykazovala pokles absorbance s časem. Z těchto výsledků je zřejmé, že přítomnost oleje v kultivačním médiu výrazně stimuluje produkci biosurfaktantů u bakterie D₃, což je opět logické. Většina bakterií produkuje biosurfaktanty právě za účelem zvýšení dostupnosti a tím i zlepšení utilizace ve vodě nerozpustných substrátů jako je právě rostlinný olej.



Graf 6: Absorbance bakterie D₃ po její kultivaci na různých typech produkčních médií, po odečtení absorbance jejich čistých médií

V případě kultivace PP na produkčních médiích mG, mGY, mGO a mGYO, jak můžeme z Grafu 7 vidět, vykazovaly vzorky schopnost solubilizace antracenu ve všech typech uvedených médií.

Jako i v případě bakterie D₃, bakterie PP dosáhla nejvyšší míry absorbance po její kultivaci na médiích mGO a mGYO, ačkoliv se zde nejednalo o zcela lineární závislost s časem jako v případě bakterie D₃. V obou typech těchto médií byl obsažen olej, který by měl podporovat produkci biosurfaktantů, což bylo v tomto případě prokázáno. Jak můžeme z Grafu 7 vidět, největší nárůst schopnosti solubilizace antracenu u obou typů médií mGO a mGYO vykazovala bakterie PP po její 48 hodinách kultivace. Nutno podotknout, že se v případě těchto dvou typů médií jednalo o výrazně vyšší míru schopnosti solubilizace antracenu oproti PK, která vykazovala hodnotu 1,536 a to ve všech měřených časových intervalech. Oproti takto vysoké míře schopnosti solubilizace antracenu v obou typech těchto médií, bylo v případě kultivace PP na médiu mGY dosaženo nízké schopnosti solubilizace antracenu, po 72 hodinové kultivaci dokonce nulové.



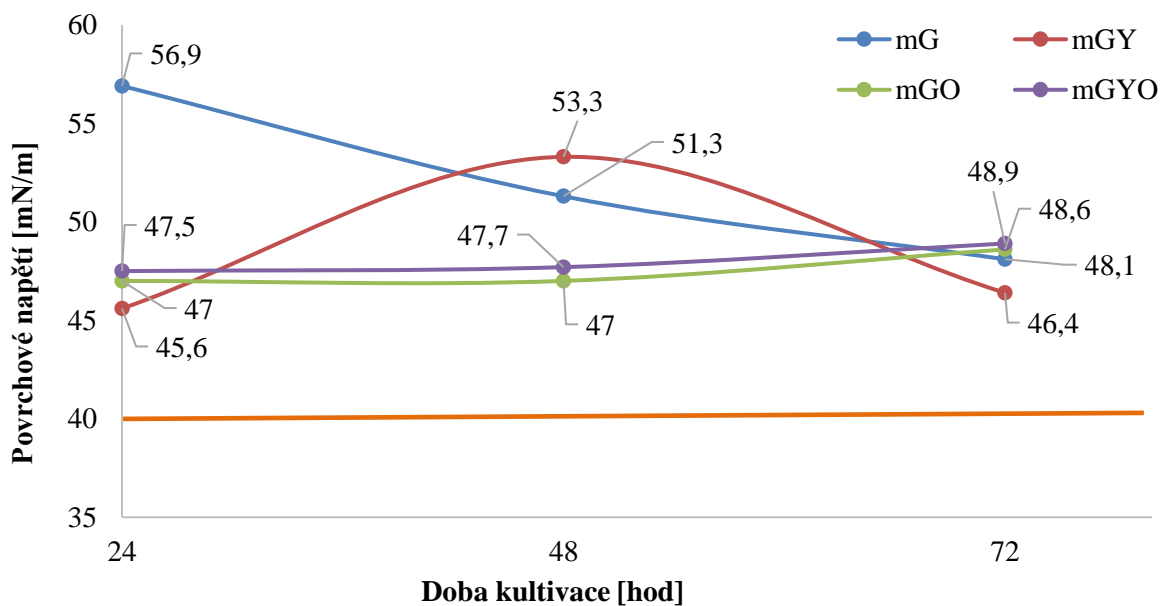
Graf 7: Absorbance bakterie PP po její kultivaci na různých typech produkčních médií, po odečtení absorbance jejich čistých médií

4.3.3 Metoda Du-Nouy-Ring zaměřená na bakterie PP a D₃

Jelikož je měření povrchového napětí popsáno jako jedna z nejvíce používaných a spolehlivých metod na prokázání přítomnosti biosurfaktantů byla použita i v rámci testování bakterií PP a D₃ na různých typech produkčních médií v různém kultivačním čase.

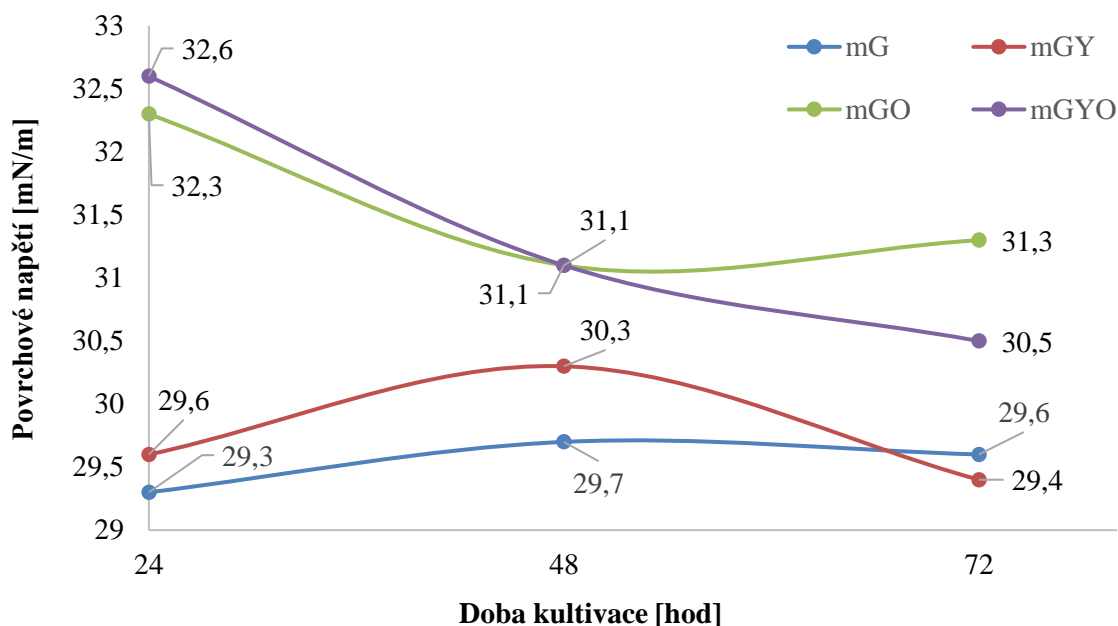
Naměřené hodnoty povrchového napětí jednotlivých supernatantů získaných po kultivaci D₃ v různých typech produkčních médií jsou uvedeny v Grafu 8. V případě měření povrchového napětí u bakterie D₃ nelze příliš hovořit o nějaké lineární závislosti povrchového napětí mezi dobou kultivace a typem produkčního média. Až na kultivaci bakterie D₃ v médiu mG, které obsahovalo jako jediný zdroj uhlíku glukózu. Zde vidíme jednoznačně snižování povrchového napětí s dobou její kultivace. Nicméně žádné kultivační médium nedokázalo podpořit tuto bakterii natolik, aby dokázala snížit hodnotu jeho povrchového napětí až na 40 mN/m.

Největšího snížení na hodnotu 45,6 mN/m bylo dosaženo v případě její kultivace po 24 hodinách na médiu mGY.



Graf 8: Naměřené hodnoty povrchového napětí jednotlivých supernatantů získaných po kultivaci D_3 v různých typech produkčních médií

Co se týká výsledků bakterie PP, jejíž naměřené hodnoty povrchového napětí, získané po její kultivaci na různých typech produkčních médií jsou uvedeny v Grafu 9. Vidíme zde zcela jednoznačně, naprosto průkazné výsledky dokazující přítomnost biosurfaktantu. Jelikož došlo ke snížení povrchového napětí pod hranici 40 mN/m, a to ve všech případech. Rozdíly v rámci jednoho typu média v závislosti na době kultivace jsou místy tak nepatrné, že je lze uvažovat v rámci odchylky. Asi jako jedinou závislost, kterou lze při kultivaci bakterie PP na různých typech produkčních médií vidět je, že při kultivaci na médiích mG a mGY byla vždy až na jeden případ její hodnota povrchového napětí pod hranicí 30 mN/m. Tedy snižovala povrchové napětí ještě více jako v případě její kultivace na mGO a mGYO, kdy byla ve všech případech nad hranicí 30 mN/m, ačkoliv byl v obou typech médií obsažen olej podporující produkci biosurfaktantu.



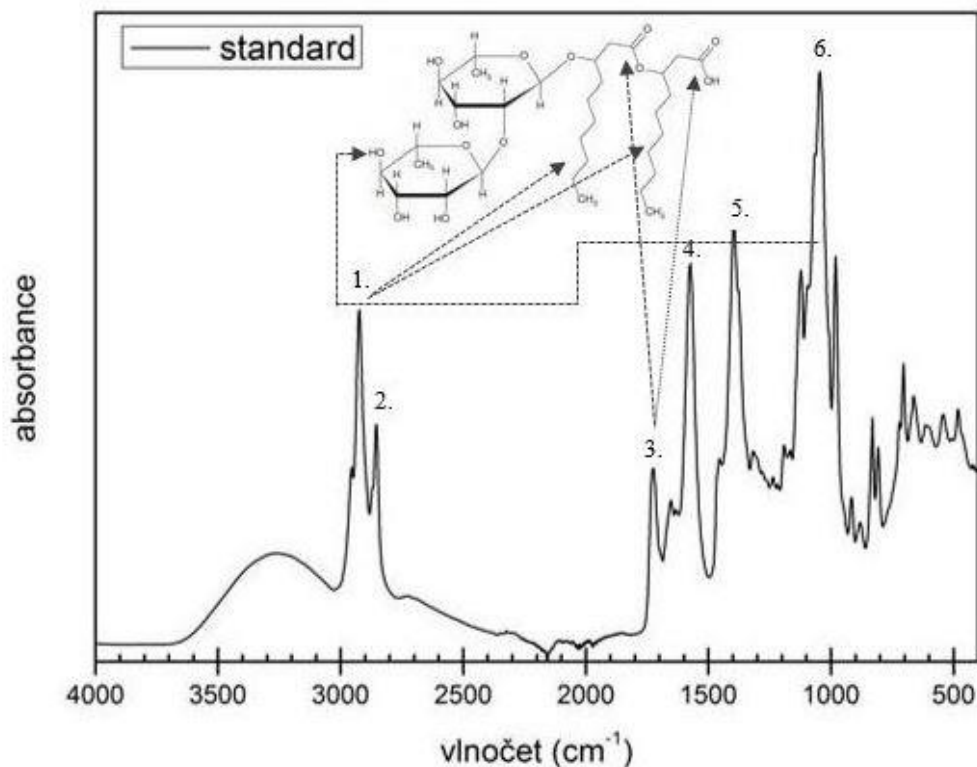
Graf 9: Naměřené hodnoty povrchového napětí jednotlivých supernatantů získaných po kultivaci PP v různých typech produkčních médií

4.4 Vyhodnocení infračervené spektroskopie

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) se řadí mezi rychlé, pohodlné a nedestruktivní analytické metody poskytující velice přesnou identifikaci a charakterizaci izolované látky. Principem metody je absorpce infračerveného záření, kdy dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly vyvolaných změnou jejího dipólového momentu. Různé látky lze kvantifikovat z jediného spektra vzorku.

Na základě možnosti této metody identifikovat a charakterizovat izolované látky byl tento typ analýzy zvolen pro vybrané bakterie D₃ a PP, abychom zjistili, jaké sloučeniny po kultivaci v produkčním médiu mGY tyto bakterie produkovaly. Pro možnost jejich analýzy byly supernatanty získané po jejich kultivaci v produkčním médiu mGY připraveny extrakcí rozpouštědly a také srážením. Podrobný popis přípravy vzorků pomocí extrakce různých typů rozpouštědel a srážení je popsán v kapitole 3.5 a 3.6.

Na základě měření, které bylo provedené v rozsahu 400 – 4 000 cm⁻¹ byla získána infračervená spektra popisující závislost absorpance na vlnové délce dopadajícího záření. Spektra testovaných vzorků byla vždy porovnána se spektrem komerčně dostupné 95 % mono- a dirhamnolipidové směsi, v našem případě dále označované jako standard. Spektrum rhamnolipidového standardu je zobrazeno na Obr. 18.

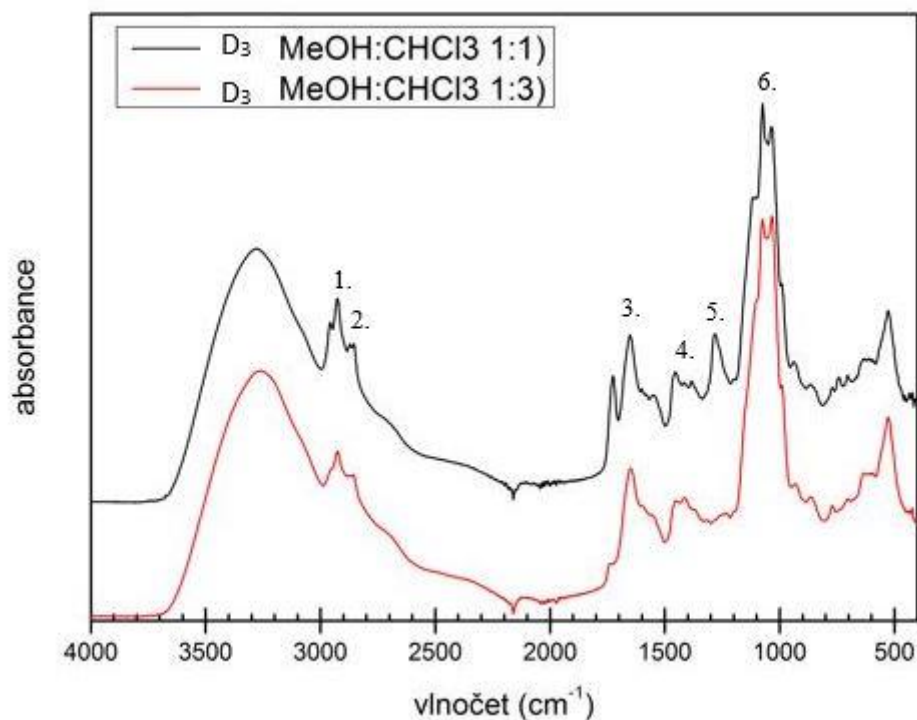


Obr. 18: Spektrum komerčně dostupné rhamnolipidové směsi – standardu

Charakteristické absorpční pásy rhamnolipidového standardu s odpovídajícími skupinami absorpčních frekvencí jsou uvedeny v Tab. 30. Široký absorpční pás nacházející se v oblasti mezi 3 500 – 3 000 cm^{-1} , rovněž pak pás v oblasti mezi 1 600 – 1 520 cm^{-1} , označený ve spektru pod číslem 4., poukazují v měřeném vzorku na přítomnost vody. Valenční vibrace alifatických skupin vykazující ve spektru pásy 1. a 2., poukazují na přítomnost hydroxydekanové kyseliny, která je charakteristická pro rhamnolipidovou sloučeninu. Pás vyskytující se ve spektru pod označením číslem 3. poukazuje na výskyt karboxylové kyseliny a esterové vazby. Oblast mezi 1 400 cm^{-1} – 900 cm^{-1} vykazuje deformační vibrace typické pro sacharidy, jedná se o zobrazení funkčních skupin CH, OH. V oblasti od 800 – 450 cm^{-1} se ve spektru nachází CH, OH a CH_3 funkční skupiny.

Tab. 30: Charakteristické pásy rhamnolipidové směsi

Číslo pásu	Typ vibrace	Funkční skupiny
1.	valenční asymetrická (CH_2)	$-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-$
2.	valenční symetrická (CH_2)	$-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-$
3.	valenční ($\text{C}=\text{O}$)	$-\text{COOH}$, $-\text{CO}-\text{O}-$
4.	valenční (H_2O)	H_2O
5.	deformační (CH)	$-\text{C}-\text{H}$
6.	valenční (CO)	R-OH

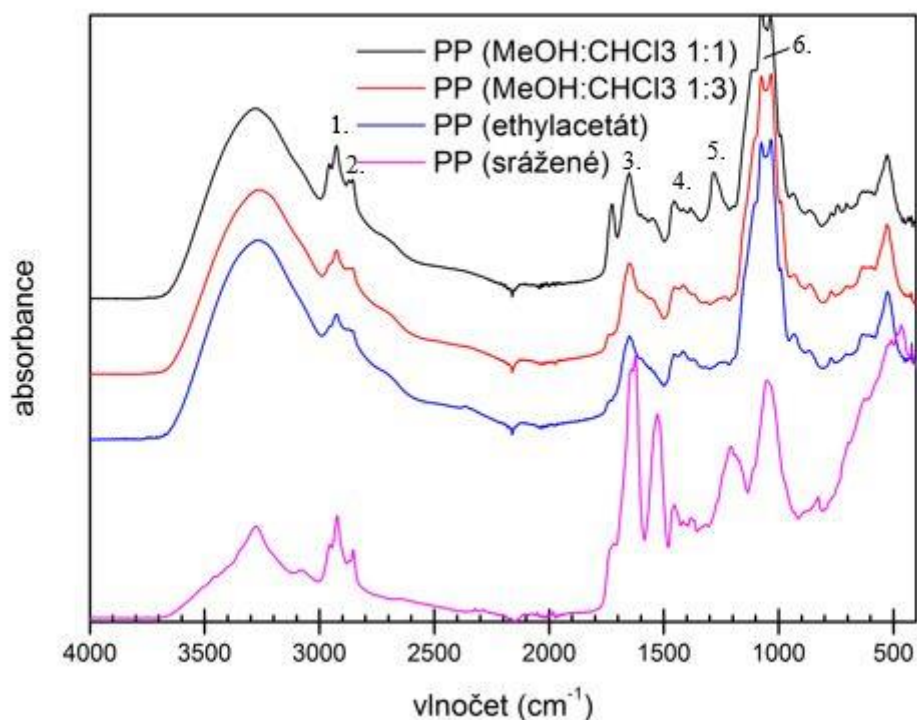


Obr. 19: Spektrum vyextrahovaných látek po kultivaci bakterie D_3 za použití různých typů extrakčních směsí

Ve srovnání se spektrem rhamnolipidového standardu, které je zobrazeno na Obr. 18 vidíme jisté odlišnosti v případě námi vyextrahovaných látek po kultivaci bakterie D_3 . Spektra získané extrakcí supernatantu D_3 v rozpouštědlech methanol:chloroform (1:1) a methanol:chloroform (1:3) jsou zobrazena na Obr. 19.

Na první pohled je patrné, že spektrum získané extrakcí supernatantu bakterie D_3 ve výše zmíněných rozpouštědlech obsahuje menší koncentraci látek, jelikož pásy jsou daleko menší oproti rhamnolipidovému standardu a rovněž nejsou zcela totožné. Avšak i přes tyto drobné nuance z jejich spekter vyplývá, že obsahují funkční skupiny charakteristické pro rhamnolipidy.

Pokud srovnáme spektra D_3 v rámci použitých rozpouštědel, vidíme, že v případě použitého rozpouštědla methanol:chloroform v poměru 1:1 se navíc ve spektru v oblasti 1700 cm^{-1} vyskytuje pás, charakteristický pro funkční skupinu C-Cl_3 . Naopak při použití rozpouštědla methanol:chloroform 1:3 nám chybí pás v oblasti $1200 - 1300\text{ cm}^{-1}$, který je charakteristický pro deformační vibraci a funkční skupinu -C-H .



Obr. 20: Spektrum vyextrahovaných látek po kultivaci bakterie PP za použití různých typů extrakčních směsí a srážení

V případě vyextrahovaných látek z bakterie PP vidíme podobný trend na Obr. 20, jako v případě extrakce u D₃, kdy byla použita extrakční rozpouštědla methanol:chloroform v poměru 1:1 a methanol:chloroform 1:3. Jako i v případě spektra bakterie D₃, kdy byla použita směs methanol:chloroform v poměru 1:1 se projevil pás C-Cl₃ a v případě použití směsi methanol:chloroform 1:3 nám chybí pás charakteristický pro funkční skupinu C-H. Co vyextrahujeme, záleží i zde na extrakční směsi.

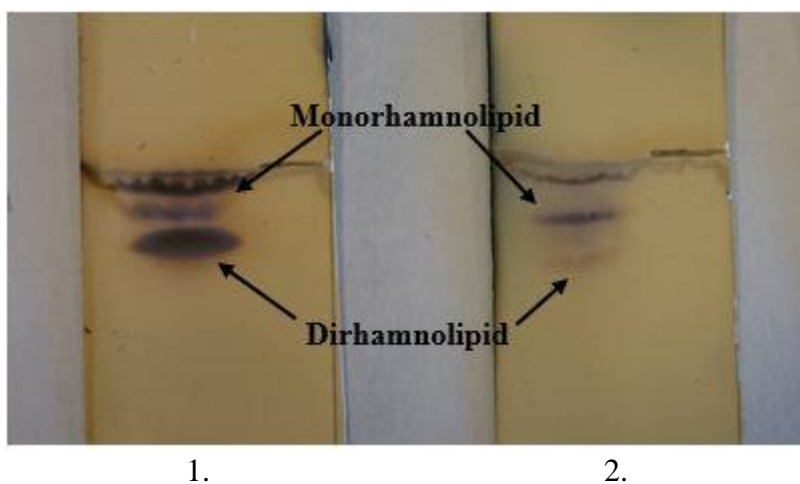
Nejvíce podobná se jeví spektra získaná za využití extrakční směsi methanol:chloroform v poměru 1:3 a za použití ethylacetátu. Výhodou extrakce látek ethylacetátem je jeho netoxicitá a ekologičnost, rozkládá se na ethanol a kyselinu octovou, které nejsou takovou biologickou zátěží jako například chloroform. Jinak naopak vypadá spektrum v případě, že jsme místo extrakčních rozpouštědel použili srážení. Pásky se oproti ostatním spektrům jeví neostré, dokonce se zde v oblasti 1 500 – 1 600 cm⁻¹ vyskytuje deformační vibrace s funkční skupinou -NH₂. Což pravděpodobně naznačuje kontaminaci proteiny, které pravděpodobně ko-precipitovaly společně s rhamnolipidy. Extrakce pomocí srážení je tedy nespecifickou metodou, jelikož může vést k vysrážení řady dalších látek.

Získaná spektra PP se jako v případě D₃ podobají standardnímu spektru rhamnolipidů a z toho tedy lze usuzovat, že se jednalo o sloučeniny na bázi rhamnolipidů, které jsme extrakcí supernatantu PP získaly. Množství a také chemická povaha kontaminantů záleží na použitém

isolačním postupu, nejméně specifická je jednoduchá precipitace, naopak jako velice zajímavé extrakční činidlo se jeví ethylacetát.

4.5 Vyhodnocení chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie se řadí k rychlým analytickým metodám a funguje na principu rozdělování jednotlivých látek mezi postupující mobilní fází rozpouštědla a stacionární fází tenké vrstvy. Jako stacionární fáze se nejčastěji využívá hliníková destička pokrytá sorbentem a mobilní fáze je tvořena rozpouštědly, jedná se o tzv. vyvíjecí směs. Přehled použitých vyvíjecích směsí vybraných na základě literatury je popsán v kapitole 3.7.



Obr. 21: 1. standardní směs mono a dirhamnolipidů, 2. supernatant PP extrahovaný v ethylacetátu

Vzhledem k nejlepším výsledkům, kterých bakterie PP dosáhla v průběhu všech provedených experimentů, byla vybrána k otestování i pomocí tenkovrstvé chromatografie. Její vzorek byl připraven extrakcí v rozpouštědlech ethylacetátu a methanol:chloroformu (1:1). Podrobný popis přípravy je uveden v kapitole 3.5. Vzorky byly porovnány se standardem obsahujícím směs mono- a di-rhamnolipidů.

Ze všech testovaných směsí, jejichž přehled a složení je uvedeno v kapitole 3.7 se extrakt získaný z PP podařilo rozdělit pouze za použití vyvíjecí směsi chloroform:methanol:20 % kys. octová v poměru 65:12:2 a to jenom v případě, že byl vzorek předtím připraven extrakcí v ethylacetátu. V případě jeho extrakce pomocí methanol:chloroformu v poměru 1:1 se získaný extrakt z PP rozdělit nepodařilo. Rozdělení jednotlivých skvrn standardu a vzorku extrahovaném v ethylacetátu jsou zobrazeny na Obr. 21. Vidíme, že umístění a rozdělení jednotlivých skvrn v testovaném vzorku PP se shoduje s pozicí skvrn standardu. Přičemž byly detekovány mono- a di-rhamnolipidy v testovaném vzorku. Na základě porovnání intenzity skvrn je možné konstatovat, že ve srovnání s poměrným zastoupením mono- a di-rhamnolipidy u standardu převažují dirhamnolipidy. V našem vzorku byly také zastoupeny mono- i dirhamnolipidy, ale naopak převažovaly spíše monorhamnolipidy, což může souviset s podmínkami kultivace, které mají vliv na tvorbu rhamnolipidů.

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo otestovat mikrobiální produkci biosurfaktantů vybraných druhů bakterií a určit na základě provedených testů, zda jsou testované bakteriální kmeny producenty biosurfaktantů a následně tyto biosurfaktanty identifikovat.

V rámci experimentální práce byly porovnány screeningové metody testování potenciálních producentů biosurfaktantů, které byly následně optimalizovány. Jednalo se o metodu rozšiřování oleje, stanovení emulgační kapacity, penetrační test, orcinolovou metodu, metodu Du-Nouy-Ring, CTAB agarový test a solubilizaci krystalického antracenu. Z těchto metod se nepodařilo zcela optimalizovat orcinolovou metodu, penetrační a CTAB agarový test. Jelikož nebylo příliš možné v rámci těchto testů dosažené výsledky interpretovat. Naopak další testované metody byly experimentálně i časově nenáročné, jejich interpretace nebyla náročná a zároveň vykazovaly velice solidní reprodukovatelnost. Navíc jejich kombinace je velice vhodná, protože každá identifikuje jinou fyzikálně-chemickou vlastnost detergentu. Při stanovení povrchového napětí je přímo měřen úbytek povrchové napětí na povrchu vodného roztoku, přičemž za pozitivní průkaz přítomnosti biosurfaktantu se považuje pokles povrchového napětí pod hodnotu 40 mN/m. Při emulgačním testu je naopak stanovena schopnost testovaného vzorku emulgovat dvě nemísitelné fáze. Při stanovení solubilizace antracenu je stanovena schopnost převedení hydrofobní sloučeniny do vodného roztoku. V posledních dvou testech je vhodné výsledky porovnat s referenčním vzorkem (tzv. kontrolou).

Všech sedm výše zmíněných metod bylo testováno v rámci produkce vybraných 11 bakteriálních kmenů po jejich kultivaci v komplexních inokulačních médiích. Avšak na základě výsledků dosažených v rámci jednotlivých testů byla schopnost produkce biosurfaktantů prokázána pouze v případě bakterie *Pseudomonas putida* na základě vyhodnocení metody rozšiřování oleje, stanovení emulgační aktivity, solubilizace krystalického antracenu a měření povrchového napětí. V ostatních případech buď k produkci biosurfaktantu vůbec nedošlo, nebo byla jeho produkce velice nízká.

Kromě komplexních médií byla produkce biosurfaktantů testována také v minerálních médiích, které jsou využívány k biotechnologické produkci polyhydroxyalkanoátů. Výsledků, z nichž je možné uvažovat přítomnost produkce biosurfaktantů, bylo i zde dosaženo pouze v případě *Pseudomonas putidy* v rámci jejich výsledků dosažených v metodě rozšiřování oleje, stanovení emulgační aktivity, solubilizace krystalického antracenu a měření povrchového napětí.

Na základě výsledků *Pseudomonas putidy* v obou typech kultivačních médií ve všech provedených testech byla vybrána k podrobnějšímu prozkoumání společně s bakterií *Pseudomonas fulva*, která dosahovala v rámci testů zajímavých výsledků. Obě tyto bakterie byly zkoumány s ohledem na jejich schopnost produkce v různých typech produkčních médií konkrétně pak bylo minerální médium suplementováno glukózou, olejem, kvasničným extraktem nebo kombinací oleje a kvasničného extraktu. Ověřen byl také vliv času kultivace. Testování bylo provedeno s pomocí stejných metod, jako v případě kultivace bakterií v produkčních médiích s výjimkou metody rozšiřování oleje. *Pseudomonas fulva* nedokázala

v rámci těchto testů snížit povrchové napětí pod 40 mN/m, jako bakterie *Pseudomonas putida*, ačkoliv ve zbývajících dvou testech vykazovala poměrně pěkné výsledky. Jednoznačně zcela nejlepších výsledků bylo dosaženo v případě bakteriálního kmene *Pseudomonas putida*, u které jsme si produkci biosurfaktantů tak potvrdili.

Pro chemickou charakterizaci a identifikaci povrchově aktivních látek, produkováných bakteriemi *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas fulva* byla zvolena infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Na základě získaných spekter a při jejich porovnání s komerčním standardem byly izolované sloučeniny identifikované jako rhamnolipidy. Tato skutečnost není překvapující, řada zástupců rodu *Pseudomonas* disponuje schopností produkce těchto biosurfaktantů. Zároveň byly porovnány různé isolační postupy a extrakční směsi pro izolaci biosurfaktantů. Výsledky naznačují, že zvolený isolační postup má výrazný vliv na čistotu produktu, při precipitaci v kyselé oblasti pH byly vzorky biosurfaktantů silně kontaminovány proteiny. Naopak se osvědčila izolace biosurfaktantů pomocí ethylacetátu, což je vzhledem ke své ekologické povaze velice zajímavé rozpouštědlo i kontextu případné průmyslové izolace biosurfaktantů.

Na základě prokázání produkce rhamnolipidů pomocí FTIR byla vybrána *Pseudomonas putida* k bližšímu prozkoumání pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Zde se nám podařilo rozdělit mono- a dirhamnolipidy. Podle našich výsledků produkuje bakterie *Pseudomonas putida* směs mono- a dirhamnolipidů, přičemž v našich vzorcích byly dominantnější frakcí monorhamnolipidy.

6 LITERATURA

- [1] GEYS, Robin, Wim SOETAERT a Inge VAN BOGAERT. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, 30, 66-72. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.002. ISBN 10.1016/j.copbio.2014.06.002. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166914001049>
- [2] HARGREAVES, Tony. Surfactants: the ubiquitous amphiphiles. *Chemistry World* [online]. 2003 [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: <https://www.chemistryworld.com/news/surfactants-the-ubiquitous-amphiphiles/3003838.article>
- [3] SANTOS, Danyelle, Raquel RUFINO, Juliana LUNA, Valdemir SANTOS a Leonie SARUBBO. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17(3). DOI: 10.3390/ijms17030401. ISBN 10.3390/ijms17030401. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/3/401>
- [4] VIJAYAKUMA, S. a V. SARAVANAN. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*. 2015, 10(5), 181-192. DOI: 10.3923/jm.2015.181.192. ISBN 10.3923/jm.2015.181.192. Dostupné také z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jm.2015.181.192>
- [5] PACWA-PLÓCINICZAK, Magdalena, Grażyna A. PŁAZA, Zofia PIOTROWSKA-SEGET a Swaranjit Singh CAMEOTRA. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, 12(1), 633-654. DOI: 10.3390/ijms12010633. ISBN 10.3390/ijms12010633. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/1/633>
- [6] YIN, Hua, Jing QIANG, Yan JIA, Jinshao YE, Hui PENG, Huaming QIN, Na ZHANG a Baoyan HE. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry*. 2009, 44(3), 302-308. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.11.003. ISBN 10.1016/j.procbio.2008.11.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511308003565>
- [7] ROSENBERG, E. a E. Z. RON. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999, 52(2), 154-162. DOI: 10.1007/s002530051502. ISBN 10.1007/s002530051502. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051502>
- [8] LUNA, Juliana M., Raquel D. RUFINO, Leonie A. SARUBBO, Lígia R. M. RODRIGUES, José A. C. TEIXEIRA a Galba M. DE CAMPOS-TAKAKI. Evaluation Antimicrobial and Antiadhesive Properties of the Biosurfactant Lunasan Produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. *Current Microbiology*. 2011, 62(5), 1527-1534. DOI: 10.1007/s00284-011-9889-1. ISBN 10.1007/s00284-011-9889-1. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-011-9889-1>

- [9] MAKKAR, Randhir S, Swaranjit S CAMEOTRA a Ibrahim M BANAT. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*. 2011. DOI: 10.1186/2191-0855-1-5. ISBN 10.1186/2191-0855-1-5. Dostupné také z: <http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/2191-0855-1-5>
- [10] BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1999, **152**(1-2), 41-52. DOI: 10.1016/S0927-7757(98)00684-0. ISBN 10.1016/S0927-7757(98)00684-0. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775798006840>
- [11] SILVA, Rita, Darne ALMEIDA, Raquel RUFINO, Juliana LUNA, Valdemir SANTOS a Leonie SARUBBO. Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, **15**(7), 12523-12542. DOI: 10.3390/ijms150712523. ISBN 10.3390/ijms150712523. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/7/12523>
- [12] CAMPOS, Jenyffer Medeiros, Tânia Lúcia MONTENEGRO STAMFORD, Leonie Asfora SARUBBO, Juliana Moura DE LUNA, Raquel Diniz RUFINO a Ibrahim M. BANAT. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*. 2013, **29**(5), 1097-1108. DOI: 10.1002/btpr.1796. ISBN 10.1002/btpr.1796. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.1796>
- [13] MÜLLER, Markus Michael a Rudolf HAUSMANN. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, **61**(2), 251–264. DOI: 10.1007/s00253-011-3368-2. ISBN 10.1007/s00253-011-3368-2. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3368-2>
- [14] ABDEL-MAWGOUD, Ahmad Mohammad, François LÉPINE a Eric DÉZIEL. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, **86**(5), 1323–1336. DOI: 10.1007/s00253-010-2498-2. ISBN 10.1007/s00253-010-2498-2. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2498-2>
- [15] NUÑEZ, A., R. ASHBY, T. A. FOGLIA a D. K. Y. SOLAIMAN. Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. *Chromatographia*. 2001, **53**(11-12), 673–677. DOI: 10.1007/BF02493019. ISBN 10.1007/BF02493019. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02493019>
- [16] KOSARIC, Naim a Fazilet VARDAR-SUKAN. Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics. *CRC Press*, 2015. ISBN 9781466596696.
- [17] FRANZETTI, Andrea, Isabella GANDOLFI, Giuseppina BESTETTI, Thomas J. P. SMYTH a Ibrahim M. BANAT. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2010, **112**(6), 617-

627. DOI: 10.1002/ejlt.200900162. ISBN 10.1002/ejlt.200900162. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200900162>
- [18] ARIMA, Kei, Atsushi KAKINUMA a Gakuzo TAMURA. *Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by Bacillus subtilis: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1968, **31**(3), 488-494.
- [19] BALTZ, Richard H., Vivian MIAO a Stephen K. WRIGLEY. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Natural Product Reports*. 2005, **22**(6), 717-741. DOI: 10.1039/B416648P. ISBN 10.1039/b416648p. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b416648p>
- [20] ONGENA, Marc a Philippe JACQUES. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. 2008, **16**(3), 115-125. DOI: 10.1016/j.tim.2007.12.009. ISBN 10.1016/j.tim.2007.12.009. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X08000383>
- [21] CHAKRABARTI, S. Bacterial Biosurfactant: Characterization, Antimicrobial and Metal Remediation Properties. Ph.D. Thesis. *National Institute of Technology*. 2012. Dostupné také z: http://ethesis.nitrkl.ac.in/3113/1/Sneha_thesis-_full.pdf
- [22] GAUTAM, K.K. a V.K. TYAGI. Microbial Surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science*. 2006, **55**(4), 155-166. DOI: 10.5650/jos.55.155. ISBN 10.5650/jos.55.155. Dostupné také z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/55/4/55_4_155/_article
- [23] KRETSCHMER, Axel, Hans BOCK a Fritz WAGNER. Chemical and Physical Characterization of Interfacial-Active Lipids from *Rhodococcus erythropolis* Grown on n-Alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982, **44**(4), 864–870.
- [24] DESAI, JITENDRA D. a IBRAHIM M. BANAT. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997, **61**(1), 47–64.
- [25] POREMBA, K., W. GUNKEL, S. LANG a F. WAGNER. Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. *Environmental Toxicology*. 1991, **6**(2), 157-163. DOI: 10.1002/tox.2530060205. ISBN 10.1002/tox.2530060205. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tox.2530060205>
- [26] NITSCHKE, M., S.G.V.A.O. COSTA a J. CONTIERO. Rhamnolipid Surfactants: An Update on the General Aspects of These Remarkable Biomolecules. *Biotechnology Progress*. 2005, **21**(6), 1593-1600. DOI: 10.1021/bp050239p. ISBN 10.1021/bp050239p. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp050239p>
- [27] MAIER, R. M. a G. SOBERÓN-CHÁVEZ. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, **54**(5), 625–633. DOI: 10.1007/s002530000443. ISBN 10.1007/s002530000443. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530000443>

- [28] DEZIEL, E. RhIA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology Society*. 2003, **149**(8), 2005–2013. DOI: 10.1099/mic.0.26154-0. ISBN 10.1099/mic.0.26154-0. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.26154-0>
- [29] WITTEGENS, Andreas, Till TISO, Torsten T ARNDT, et al. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Cell Factories*. 2011. DOI: 10.1186/1475-2859-10-80. ISBN 10.1186/1475-2859-10-80. Dostupné také z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-10-80>
- [30] SALIHU, Aliyu, Ibrahim ABDULKADIR a M. N. ALMUSTAPHA. An investigation for potential development on biosurfactants. *Academic Journals*. 2009, **3**(5), 111-117. ISSN 1538-2273. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/255639047_An_investigation_for_potential_development_on_biosurfactants
- [31] RAHMAN, Pattanathu K.S.M. a Edward GAKPE. Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants-Review. *Biotechnology*. 2008, **7**(2), 360-370. DOI: 10.3923/biotech.2008.360.370. ISBN 10.3923/biotech.2008.360.370. Dostupné také z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=biotech.2008.360.370>
- [32] MATA-SANDOVAL, Juan C., Jeffrey KARNS a Alba TORRENTS. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiological Research*. 2001, **155**(4), 249-256. DOI: 10.1016/S0944-5013(01)80001-X. ISBN 10.1016/S0944-5013(01)80001-X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450130180001X>
- [33] ADAMCZAK, Marek a Włodzimierz BEDNARSKI. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*. 2000, **22**(4), 313–316. DOI: 10.1023/A:1005634802997. ISBN 10.1023/A:1005634802997. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1005634802997>
- [34] ZINJARDE, Smita S. a Aditi PANT. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology*. 2002, **42**(1), 67-73. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1521-4028%28200203%2942%3A1%3C67%3A%3AAID-JOBM67%3E3.0.CO%3B2-M>
- [35] LEE, Baek-Seok a Eun-Ki KIM. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004, **35**(6–7), 639-647. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.08.017. ISBN 10.1016/j.enzmictec.2004.08.017. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022904002388>
- [36] SATPUTE, Surekha K., Arun G. BANPURKAR, Prashant K. DHAKEPHALKAR, Ibrahim M. BANAT a Balu A. CHOPADEV. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010, **30**(2), 127-144. DOI:

- 10.3109/07388550903427280. ISBN 10.3109/07388550903427280. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388550903427280>
- [37] HUSZCZA, Ewa a Bogdan BURCZYK. Biosurfactant production by *Bacillus coagulans*. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2003, **6**(1), 61-64. DOI: 10.1007/s11743-003-0249-2. ISBN 10.1007/s11743-003-0249-2. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11743-003-0249-2>
- [38] LIN, Sung-Chyr a Horng-Jyh JIANG. Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. *Biotechnology Techniques*. 1997, **11**(6), 413–416. DOI: 10.1023/A:1018468723132. ISBN 10.1023/A:1018468723132. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1018468723132>
- [39] BENINCASA, Maria. Rhamnolipid Produced from Agroindustrial Wastes Enhances Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soil. *Current Microbiology*. 2007, **54**(6), 445–449. DOI: 10.1007/s00284-006-0610-8. ISBN 10.1007/s00284-006-0610-8. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-006-0610-8>
- [40] SACHDEV, Dhara P. a Swaranjit S. CAMEOTRA. Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, **97**(3), 1005–1016. DOI: 10.1007/s00253-012-4641-8. ISBN 10.1007/s00253-012-4641-8. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4641-8>
- [41] RODRIGUES, Lígia, Ibrahim M. BANAT, José TEIXEIRA a Rosário OLIVEIRA. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, **57**(4), 609–618. DOI: 10.1093/jac/dkl024. ISBN 10.1093/jac/dkl024. Dostupné také z: <http://academic.oup.com/jac/article/57/4/609/669417/Biosurfactants-potential-applications-in-medicine>
- [42] GHARAEI-FA, Eshrat. Biosurfactants in Pharmaceutical Industry (A Mini-Review). *American Journal of Drug Discovery and Development*. 2011, **1**(1), 58-69. DOI: 10.3923/ajdd.2011.58.69. ISBN 10.3923/ajdd.2011.58.69. Dostupné také z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajdd.2011.58.69>
- [43] SEN, Ramkrishna. *Biosurfactants*. Austin, Tex.: Landes Bioscience, 2010, 358 s. Advances in experimental medicine and biology, v. 672. ISBN 14-419-5978-5.
- [44] WALTER, Vanessa, Christoph SYLDATK a Rudolf HAUSMANN. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. *Biosurfactants*. 2010, 1-13. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_1. ISBN 10.1007/978-1-4419-5979-9_1. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-5979-9_1
- [45] LIN, Sung-Chyr. Biosurfactants: Recent Advances. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 1996, 109-120. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/%28SICI%291097-4660%28199606%2966%3A2%3C109%3A%3AAID-JCTB477%3E3.0.CO%3B2-2>

- [46] BATISTA, S.B., A.H. MOUNTEER, F.R. AMORIM a M.R. TÓTOLA. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*. 2006, **97**(6), 868-875. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.04.020. ISBN 10.1016/j.biortech.2005.04.020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852405002208>
- [47] CHEN, Shan-Yu, Wei-Bin LU, Yu-Hong WEI, Wen-Ming CHEN a Jo-Shu CHANG. Improved Production of Biosurfactant with Newly Isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Biotechnology Progress*. 2007, **23**(3), 661-666. DOI: 10.1021/bp0700152. ISBN 10.1021/bp0700152. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp0700152>
- [48] DAS, Madhusweta, S.K. DAS a R.K. MUKHERJEE. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. *Bioresource Technology*. 1998, **63**(3), 231-235. DOI: 10.1016/S0960-8524(97)00133-8. ISBN 10.1016/S0960-8524(97)00133-8. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852497001338>
- [49] COOPER, David G. Biosurfactants. *Microbiological Sciences*. 1986, **3**(5), 145-9.
- [50] WILLUMSEN, Pia A. a Ulrich KARLSON. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*. 1996, **7**(5), 415-423. DOI: 10.1007/BF00056425. ISBN 10.1007/BF00056425. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00056425>
- [51] VAN DER VEGT, W., H. C. VAN DER MEI, J. NOORDMANS a H. J. BUSSCHER. Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1991, **35**(6), 766-770. DOI: 10.1007/BF00169892. ISBN 10.1007/BF00169892. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00169892>
- [52] ROTENBERG, Y, L BORUVKA a A.W NEUMANN. Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1983, **93**(1), 169-183. DOI: 10.1016/0021-9797(83)90396-X. ISBN 10.1016/0021-9797(83)90396-X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002197978390396X>
- [53] SIEGMUND, Inka a Fritz WAGNER. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*. 1991, **5**(4), 265-268. DOI: 10.1007/BF02438660. ISBN 10.1007/BF02438660. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02438660>
- [54] MORIKAWA, Masaaki, Yoshihiko HIRATA a Tadayuki IMANAKA. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000, **1488**(3), 211-218. DOI: 10.1016/S1388-1981(00)00124-4. ISBN 10.1016/S1388-1981(00)00124-4. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198100001244>
- [55] KOCH, ANDREAS K., OTHMAR KAPPELI, ARMIN FIECHTER a JAKOB REISER. Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production in *Pseudomonas aeruginosa*

Mutants. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*,. 1991, **173**(13), 4212-4219. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC208072/pdf/jbacter00103-0288.pdf>

- [56] KUYUKINA, Maria S., Irena B. IVSHINA, Jim C. PHILP, Nick CHRISTOFI, Sandra A. DUNBAR a Marina I. RITCHKOVA. Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*. 2001, **46**(2), 149-156. DOI: 10.1016/S0167-7012(01)00259-7. ISBN 10.1016/S0167-7012(01)00259-7. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701201002597>

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

CMC	kritická micelární koncentrace
CDM	kritické ředění micel
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
MB	methylenová modř
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PK	pozitivní kontrola
NK	negativní kontrola
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
dF	derivace síly
dl	derivace délky
např.	například
m	hmotnost
p.a.	pro analýzu, chemikálie pro analytické účely
σ	povrchové napětí
V	objem
angl.	anglický
sp.	species
r_1, r_2	poloměr zakřivení kapky
Δp	tlakový rozdíl napříč rozhraním
E_{24}	emulgační index
h_{emulze}	výška emulgační vrstvy
h_{tot}	celková výška kapaliny