

MOŽNOSTI VYUŽITÍ RHAMNOLIPIDŮ PRO ZVÝŠENÍ BIODOSTUPNOSTI NEOBVYKLÝCH ZDROJŮ UHLÍKU

RICHARD JEŽDÍK^a, MARKÉTA KOUKALOVÁ^a,
OLGA MAŤÁTKOVÁ^a, LUCIA GHARWALOVÁ^a,
ALENA ČEJKOVÁ^a, TOMÁŠ ŘEZANKA^b
a IRENA KOLOUCHOVÁ^a

^a Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^b Ústav mikrobiologie, AV ČR, Videňská 1083, 142 20
Praha

Irena.kolouchova@vscht.cz

Došlo 27.11.17, přijato 5.1.18.

Klíčová slova: rhamnolipidy, *n*-alkany, *Candida* sp.,
mikrobiální lipidy

Úvod

Rhamnolipidy se řadí mezi aniontové biosurfaktanty z řad glykolipidů. Jsou produkovány kmeny *Pseudomonas aeruginosa* a vyznačují se nízkou toxicitou a snadnou biodegradabilitou. Využívají se při bioremediacích hydrofobních polutantů a odstraňování těžkých kovů¹. Jejich účinku je možné využít pro lepší biodostupnost hydrofobních substrátů, které mohou sloužit jako zdroje uhlíku pro mikroorganismy². Některé druhy kvasinek dokáží využívat neobvyklé zdroje uhlíku, jako např. *n*-alkany³ přímo přeměnou na mastnou kyselinu bez degradace na acetat⁴. Mezi kvasinky, které jsou schopné růst na uhlovodících, patří rody *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula* a u některých kmenů *Candida maltosa* bylo zjištěno, že využívají *n*-hexadekan rychleji než glukosu⁵. Alkany jako zdroje uhlíku mohou ovlivnit růst kvasinkových buněk a zastoupení mastných kyselin v buněčné biomase. Použití *n*-alkanů s lichým počtem atomů uhlíku může vést k modulaci obsahu mastných kyselin s lichým počtem uhlíků, které jsou zkoumány pro své využití ve stravě lidí^{6,7}. Bylo prokázáno, že kyselina pentadekanová a heptadekanová mají pozitivní účinek na lidské zdraví a přispívají ke snížení rizika vzniku roztroušené sklerózy^{8,9}.

V naší práci jsme se zaměřili na vliv rhamnolipidů na růst *Candida krusei* DBM 2136 a *Candida tropicalis* DBM 2166 v přítomnosti *n*-pentadekanu a *n*-heptadekanu a související změny v obsahu a zastoupení mastných kyselin v buňkách.

Experimentální část

Mikroorganismy a kultivační podmínky

Ve studii byly použity kvasinky *Candida krusei* (DBM 2136) a *Candida tropicalis* (DBM 2166). V komplexním YPD médiu (100 ml, kvasničný extrakt 10 g l⁻¹, pepton 20 g l⁻¹, glukosa 20 g l⁻¹) byla kultivována biomasa (24 h, 30 °C, 100 rpm), která po separaci centrifugací (9000 g, 10 min) byla použita jako inokulum pro 100 ml minerálního média (g l⁻¹): KH₂PO₄ 0,17; K₂HPO₄ 0,13; (NH₄)₂SO₄ 0,71; MgCl₂·6 H₂O 0,34; MnCl₂·4 H₂O 1; CaCl₂·2 H₂O 0,26; FeSO₄·7 H₂O 0,6; Na₂MoO₄·2 H₂O 2, pH 6. Jako zdroj uhlíku bylo využito 1 nebo 3 g l⁻¹ *n*-alkanu (*n*-pentadekan nebo *n*-heptadekan). Inokulace minerálního média byla provedena na základě měření optické denzity na počáteční hodnotu OD₆₀₀ = 0,2 ± 0,005. Následná kultivace probíhala do dosažení stacionární fáze růstu buněk. Výtěžnost kultivace byla po dvojnásobném promytí fosfátovým pufrům stanovena jako buněčná sušina. Biomasa byla zmrazena na -70 °C a lyofilizována.

Kultivace s rhamnolipidy

Rhamnolipidy vyprodukované bakterií *Pseudomonas aeruginosa* DBM 3777 byly použity pro kultivace v kritické micelární koncentraci 56 mg l⁻¹ a připraveny dle Hošková a spol.¹⁰. Stručně, po kultivaci *P. aeruginosa* byly rhamnolipidy izolovány ze supernatantu kyselým srážením a čištěny extrakcí a TLC. Složení přečištěného rhamnolipidového extraktu bylo stanoveno tandemovou hmotnostní spektrometrií a bylo zjištěno, že se skládá ze 27 kongenerů ze všech čtyř skupin rhamnolipidů (RhaFA, RhaFAFA, RhaRhaFA, RhaRhaFAFA), které obsahovaly pět typů mastných kyselin (C8, C10, C10:1, C12, C12:1). Rhamnolipidy obsahující kyselinu dekanovou tvořily hlavní složku (60 %). Pro experimenty byla použita purifikovaná směs rhamnolipidů. Rhamnolipidy byly přidány v kritické micelární koncentraci 56 mg l⁻¹. Kultivace *C. krusei* a *C. tropicalis* s rhamnolipidy probíhala za stejných kultivačních podmínek popsaných výše. Po kultivaci byly buňky centrifugovány (9000 g, 10 min) a dvakrát promyty fosfátovým pufrům. Výtěžnost kultivace byla stanovena po dvojnásobném promytí fosfátovým pufrům jako buněčná sušina. Biomasa byla zmrazena na -70 °C a lyofilizována.

Stanovení obsahu lipidů a mastných kyselin

Lyofilizovaná biomasa byla smíchaná s 2 ml 0,1 mol l⁻¹ Na₂CO₃ (> 99%, Sigma-Aldrich) a směs byla krátce míchaná se skleněnými ballotinkami (průměr 0,2 mm), zalita kapalným dusíkem a znovu míchána. Tento postup byl opakován třikrát a nakonec bylo přidáno 50 ml 0,1 mol l⁻¹ Na₂CO₃. Lipidy byly extrahovány směsí chloroformu a methanolu. Vzorek byl centrifugován a spodní fáze byla odpařena do sucha a stanovena hmotnost sušiny lipidů. Analýza jednotlivých vzorků byla provedena metodou GC-MS FAME. Každý ze vzorků byl proměřen a vyhod-

nocen $3\times$ a ve výsledcích je pak uvedena vždy průměrná hodnota 3 měření. Odchylka měření byla 8–10 %. Metodika stanovení lipidů a mastných kyselin byla použita dle Kolouchová a spol.⁶

Výsledky a diskuse

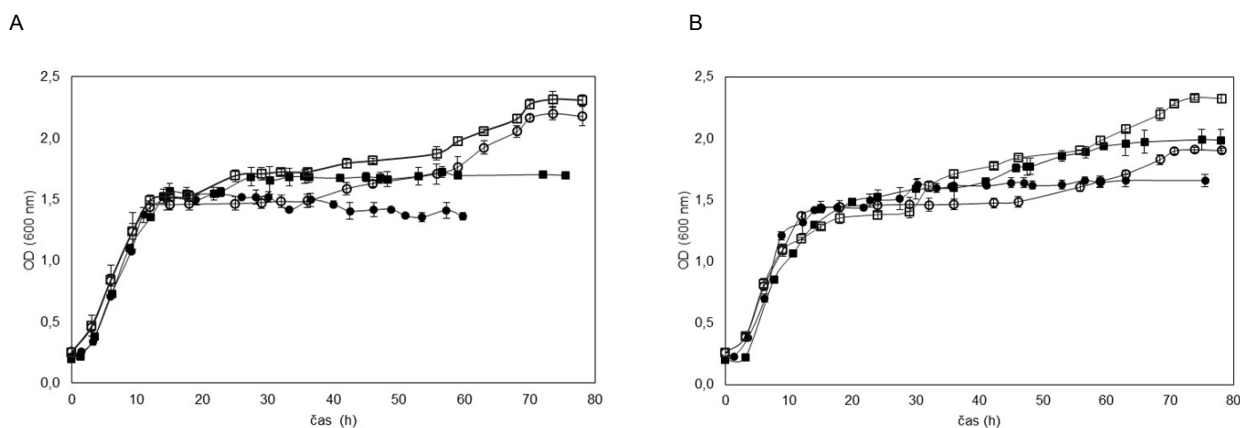
Vliv rhamnolipidu a *n*-alkanů na mikrobiální růst

Pokud se literatura věnuje možnosti mikrobiálního růstu na *n*-alkanech, tak je nejčastěji ve spojení s druhem *Candida maltosa* a *Yarrowia lipolytica*^{11,12}. *n*-Alkany jsou pouze omezeně rozpustné ve vodě, kdy s rostoucí délkou řetězce klesá jejich rozpustnost¹³. Některé mikroorganismy jsou schopny produkce vlastních biosurfaktantů, kterými zpří-

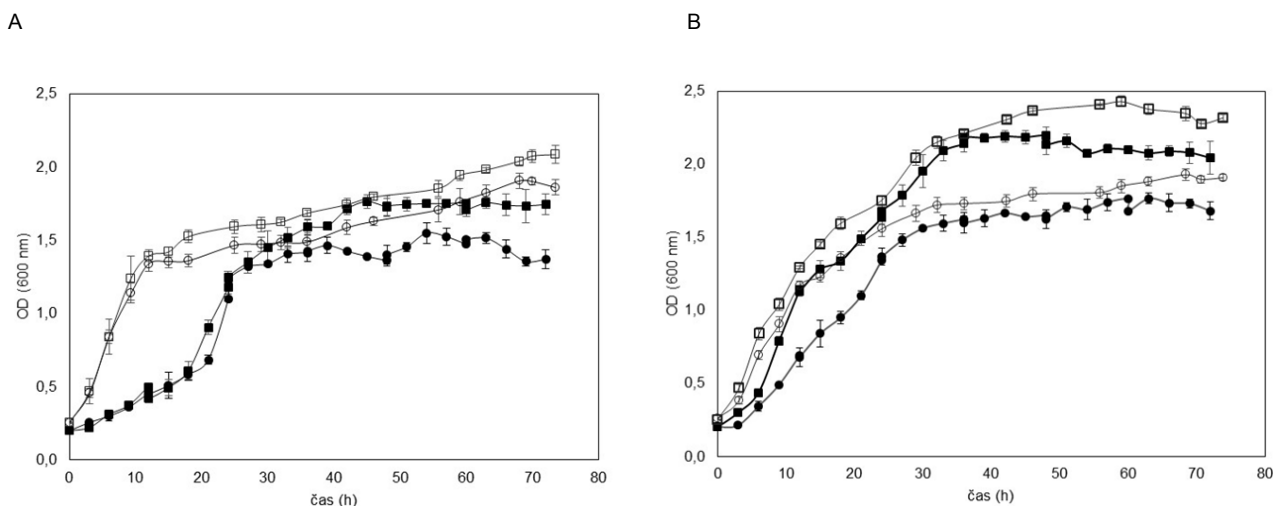
stupňují tyto substráty pro své využití^{14,15} nebo je možné do media přidávat buď syntetické nebo mikrobiální surfaktanty¹⁶.

Oba druhy kvasinek *Candida* byly schopné růstu na *n*-alkanech jako jediném zdroji uhlíku. Jak znázorňuje obr. 1 a 2, mělo přidání rhamnolipidů pozitivní efekt na nárůst biomasy. V případě zvýšení vstupní koncentrace *n*-alkanu z 1 g l^{-1} na 3 g l^{-1} došlo k signifikantnímu nárůstu biomasy jak pro pentadekan a heptadekan, tak pro *Candida krusei* i *Candida tropicalis*.

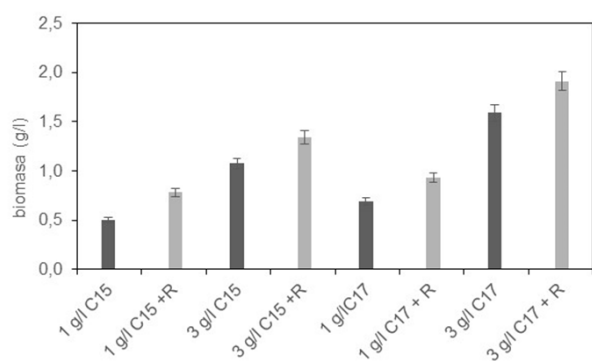
Výtěžnost biomasy je závislá na kultivačních podmínkách, v závislosti na nich pak dochází k ovlivnění syntézy a poměrovému zastoupení mastných kyselin. Z důvodu velkého povrchového napětí použitých *n*-alkanů jako zdrojů uhlíku dochází k tvorbě druhé fáze na povrchu vodního media a *n*-alkany tak nemusí být dostatečně využity kva-



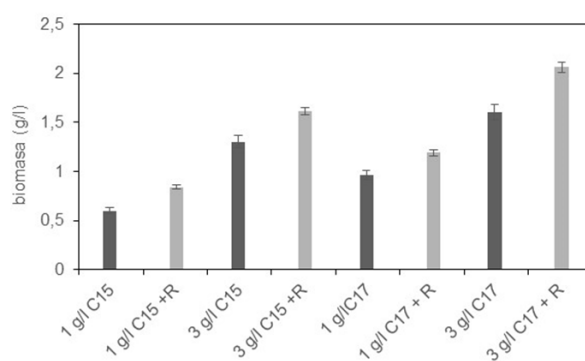
Obr. 1. Vliv přidavku rhamnolipidu na růstové křivky kvasinky *Candida krusei* na pentadekanu (A) a heptadekanu (B). C15: pentadekan, C17: heptadekan, R: rhamnolipid; ● 1 g l^{-1} C15, ■ 3 g l^{-1} C15, □ 3 g l^{-1} C15 + rhamnolipid, ○ 1 g l^{-1} C15 + rhamnolipid



Obr. 2. Vliv přidavku rhamnolipidu na růstové křivky kvasinky *Candida tropicalis* na pentadekanu (A) a heptadekanu (B). C15: pentadekan, C17: heptadekan, R: rhamnolipid; ● 1 g l^{-1} C15, ■ 3 g l^{-1} C15, □ 3 g l^{-1} C15 + rhamnolipid, ○ 1 g l^{-1} C15 + rhamnolipid



Obr. 3. Výťažnost biomasy kvasinky *Candida krusei* na *n*-alkanu C15 a C17 s přidavkem ■ nebo bez ■ rhamnolipidu



Obr. 4. Výťažnost biomasy kvasinky *Candida tropicalis* na *n*-alkanu C15 a C17 s přidavkem ■ nebo bez ■ rhamnolipidu

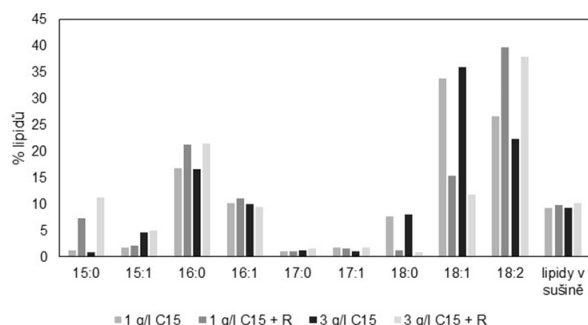
sinkami pro růst. Přidavek rhamnolipidů, jako přírodních surfaktantů snižuje povrchové napětí *n*-alkanů, zlepšuje tak jejich dispergaci v médiu a jejich dostupnost pro mikroorganismy, čímž se vytváří podmínky ke zvýšení nárůstu biomasy kvasinek a taktéž k podpoření výtěžnosti lipidů. Z obr. 3 a 4 vyplývá, že přidavek rhamnolipidu do minerálního media vedl k nárůstu výtěžnosti biomasy v rozmezí 120–150 rel.% a je tedy vidět, že i když je rod *Candida* schopen produkce vlastních surfaktantů¹⁷, tak externí přidavek surfaktantu zvýší biodostupnost hydrofobního zdroje uhlíku.

Vliv rhamnolipidu a *n*-alkanů s lichým počtem uhlíků na obsah lipidů a zastoupení mastných kyselin

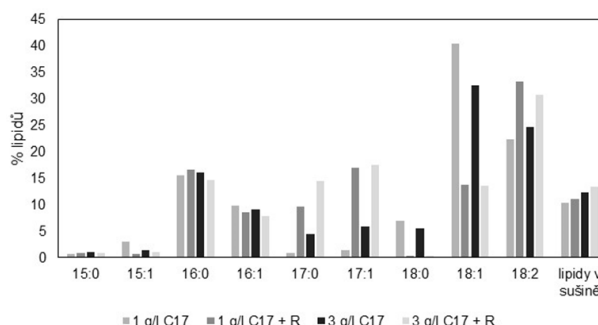
Typ substrátu, délka kultivace, velikost inokula, teplota a další faktory přímo ovlivňují obsah mikrobiálních lipidů^{18,19}. Kultivační teplota byla zvolena 28 °C a počáteční pH media bylo upraveno na 6, dle výsledků⁶. Kultivace probíhala do stacionární fáze růstu. Kultivace mikro-

organismů na hydrofobních substrátech vede k *ex novo* akumulaci lipidů^{20,21}. Jak je vidět na obr. 5 a 6, i když rod *Candida* patří mezi oleogenní kvasinky, tedy takové, které jsou schopny akumulace více než 20 % lipidů v sušině, tak za podmínek kultivace na *n*-alkanech dosahuje obsah lipidů v sušině přibližně 10 %, což odpovídá i literatuře²². Přidavek rhamnolipidů obsah lipidů zvýšil pouze mírně. Ale vzhledem ke schopnosti utilizace *n*-alkanů jako samostatných zdrojů uhlíku lze tento relativně levný zdroj využít pro biotransformaci na mikrobiální lipidy stejně jako používané „volatile fatty acids“, např. kyselinu octovou. Na obr. 5 pro *C. krusei* a na obr. 6 pro *C. tropicalis* je vidět, že při kultivaci na samotném *n*-alkanu je nejvíce zastoupena kyselina olejová (18:1), palmitová (16:0) a linolová (18:2), tak jako za obvyklejších růstových podmínek^{19,20,22,23}. Klíčovým krokem při biosyntéze mastných kyselin je tvorba acetyl-CoA, kdy tvorba mastných kyselin s lichým počtem uhlíků probíhá z prekurzorů s lichým počtem uhlíků, tedy např. z propionyl-CoA nebo zkrácením sudé mastné kyseliny α -oxidací. Výživově zajímavou

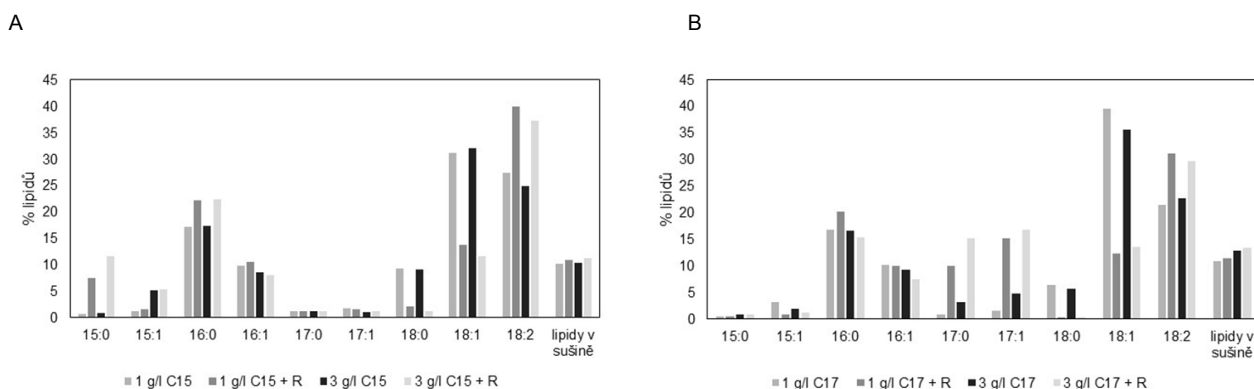
A



B



Obr. 5. Zastoupení mastných kyselin v kvasince *Candida krusei* v kultivaci na různých *n*-alkanech (C15 – A, C17 – B) a v přítomnosti nebo nepřítomnosti rhamnolipidu



Obr. 6. Zastoupení mastných kyselin v kvasince *Candida tropicalis* v kultivaci na různých *n*-alkanech (C15 – A, C17 – B) a v přítomnosti nebo nepřítomnosti rhamnolipidu

lichou mastnou kyselinou je kyselina heptadecenová (17:1), která se vyskytuje v mléku a tuku savců²⁴ a v semenech rostlin rodu *Malvaceae*²⁵. Obsah mastných kyselin s lichým počtem uhlíků se výrazně zvyšoval při kultivacích v přítomnosti rhamnolipidů. V případě přítomnosti pentadekanu došlo k významnému nárůstu C15 mastných kyselin a v případě kultivace s heptadekanem k nárůstu mastných kyselin C17 (obr. 5 a 6). Celkový obsah C15 a C17 mastných kyselin se v případě kultivace s rhamnolipidy zvýšil z původních 10 rel.% na více než 30 rel.%. Zaměříme-li se na kyselinu heptadecenovou, tak v případě kultivace s rhamnolipidy byl její relativní obsah v rozmezí 15–17 rel.% ze všech mastných kyselin. Z jiných výživově zajímavých mastných kyselin je možné zmínit kyselinu palmitolejovou (16:1) a linolovou (18:2). Obsah kyseliny palmitolejové se pohyboval okolo 10 % všech mastných kyselin bez významného ovlivnění přidanými rhamnolipidy. Naproti tomu kyselina linolová dosahovala až 40 rel.% v případě kultivací s rhamnolipidy, kdy jejich přidavek zvyšoval obsah této kyseliny až o 50 % oproti kultivaci se samotnými *n*-alkany.

Závěr

Aplikací vhodných surfaktantů je možné zvýšit biodostupnost hydrofobních substrátů na mikrobiální buňky. Námi použité rhamnolipidy zvyšovaly zastoupení mastných kyselin s lichým počtem uhlíků a kyseliny linolové o desítky procent oproti kultivacím na samotných *n*-alkanech. Obsah nenasycených mastných kyselin se pohyboval okolo 70 % jak pro *C. krusei*, tak *C. tropicalis*. Použití rhamnolipidu může vést k modulaci poměrného zastoupení mastných kyselin s lichým počtem uhlíků v celkovém obsahu mastných kyselin.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (GAČR) 17-00027S.

LITERATURA

- Chrzanowski L., Kaczorek E., Pijanowska A., Olszanowski A.: *Fresen. Environ. Bull.* 15, 682 (2006).
- Whang L. M., Liu P. W., Ma C. C., Cheng S. S.: *J. Hazard. Mater.* 164, 1045 (2009).
- Labinger J. A., Bercaw J. E.: *Nature* 417, 507 (2002).
- Dunlap K., Perry J.: *J. Bacteriol.* 94, 1919 (1967).
- Beier A., Hahn V., Bornscheuer U. T., Schauer F.: *AMB Express* 4, 75 (2014).
- Kolouchova I., Schreiberova O., Sigler K., Masak J., Rezanka T.: *FEMS Yeast Res.* 15, 1 (2015).
- Rezanka T., Kolouchova I., Sigler K.: *Folia Microbiol.* 60, 457 (2015).
- Jenkins B. J., Seyssel K., Chiu S., Pan P.-H., Lin S.-Y., Stanley E., Ament Z., West J. A., Summerhill K., Griffin J. L.: *Sci. Rep.* 7, 44845 (2017).
- Degwert J., Jacob J., Steckel F.: *PCT Int. Appl.* US 5708028A.
- Hoskova M., Jezdik R., Schreiberova O., Chudoba J., Sir M., Cejkova A., Masak J., Jirku V., Rezanka T.: *J. Biotechnol.* 193, 45 (2015).
- Mishina M., Yanagawa S., Tanaka A., Fukui S.: *Agric. Biol. Chem.* 37, 863 (1973).
- Blasig R., Mauersberger S., Riege P., Schunck W. H., Jockisch W., Franke P., Müller H. G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 589 (1988).
- Garcia Ojeda J. L.: *Dissertation*. Technische Universität Hamburg, Hamburg, Germany, 2014.
- Wentzel A., Ellingsen T. E., Kotlar H. K., Zotchev S. B., Throne-Holst M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1209 (2007).
- Rufino R. D., de Luna J. M., de Campos Takaki G. M., Sarubbo L. A.: *Electron. J. Biotechnol.* 17, 34 (2014).
- Saharan B., Sahu R., Sharma D.: *Genet. Eng. Biotechnol. J.* 2011, 1 (2011).

17. Amaral P. F. F., Coelho M. A. Z., Marrucho I. M. J., Coutinho J. A. P., v knize: *Biosurfactants* (R. Sen, ed.) kap. 18. Springer, New York, NY 2008.
18. Papanikolaou S., Aggelis G.: Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 113, 1052 (2011).
19. Peng W.-F., Huang C., Chen X.-F., Xiong L., Chen Y., Ma L.-L.: Renewable Energy 55, 31 (2013).
20. Fei Q., Chang H. N., Shang L., Choi J. D., Kim N., Kang J.: Bioresour. Technol. 102, 2695 (2011).
21. Donot F., Fontana A., Baccou J. C., Strub C., Schorr-Galindo S.: Biomass and Bioenergy 68, 135 (2014).
22. Fontanille P., Kumar V., Christophe G., Nouaille R., Larroche C.: Bioresour. Technol. 114, 443 (2012).
23. Papanikolaou S., Aggelis G.: Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 113, 1031 (2011).
24. Alves S. P., Marcelino C., Portugal P. V., Bessa R. J.: J. Dairy Sci 89, 170 (2006).
25. Dowd M. K.: J. Am. Oil Chem. Soc. 89, 1599 (2012).

R. Ježdík^a, M. Koukalová^a, O. Mařátková^a, L. Gharwalová^a, A. Čejková^a, T. Řezanka^b, and I. Kolouchová^a (^a *Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague;* ^b *Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Possibilities of Exploitation of Rhamnolipids to Increase the Bioavailability of Unusual Carbon Sources**

Rhamnolipids are anionic biosurfactants produced by the species *Pseudomonas aeruginosa*. They are used for bioremediation of hydrophobic pollutants because they increase the bioavailability of these carbon sources for microorganisms. The use of straight chain alkanes with odd number of carbon atoms can lead to the modulation of the content of odd fatty acid content. Odd fatty acids are examined for their use in human diet and it has been proved that pentadecanoic acid and heptadecanoic acid have a positive effect on human health and contribute to reducing the risk of multiple sclerosis. In our work, we focused on the effect of rhamnolipids on the growth of *Candida krusei* DBM 2136 and *Candida tropicalis* DBM 2166 in the presence of pentadecane and heptadecane. The addition of rhamnolipids to the straight chain alkanes had a positive effect on the growth of biomass (120–150 rel.%) of both *Candida* yeasts. The total C15 and C17 fatty acid content of rhamnolipids was increased from the original 10 rel.% to more than 30 rel.%. Rhamnolipids used in this study considerably increased the representation of odd fatty acids and linoleic acid (by tens of percent) compared to cultivations on the straight chain alkanes alone.

Keywords: rhamnolipids, *n*-alkane, *Candida* sp., microbial lipids