

Mikrobiologiese produksie van biosurfaktante vanaf organiese industriële-uitvloei

W.L. Mahne
B.Sc Hons

Skripsie voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir die graad
Magister Scientiae in Mikrobiologie aan die Fakulteit Natuurwetenskappe by
die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.

Studieleier: Professor P.J. Pretorius
Potchefstroom
Februarie 2001

Inhoudsopgawe

INHOUDSOPGAWE	I
ABSTRACT	III
OPSOMMING	IV
LYS VAN FIGURE	V
LYS VAN TABELLE	VI
BEDANKINGS	VII
HOOFSTUK 1 INLEIDING	1
HOOFSTUK 2 LITERATUUR	2
2.1 INLEIDING	2
2.2 STRUKTUUR EN EIENSAPPE VAN BIOSURFAKTANTE	4
2.2.1 <i>Glikolipiede</i>	4
2.2.2 <i>Vetsure, fosfolipiede en neutrale lipiede</i>	6
2.2.3 <i>Polimeriese biosurfaktante</i>	6
2.2.4 <i>Lipopeptiede en lipoproteïene</i>	7
2.2.5 <i>Partikulêre biosurfaktante</i>	7
2.2.6 <i>Antibiotika</i>	7
2.3 BAKTERIEË WAT BIOSURFAKTANTE PRODUSEER	8
2.4 BIOSURFAKTANTE SE FUNKSIE IN DIE NATUUR	10
2.5 PRODUKSIE VAN BIOSURFAKTANTE	11
2.6 GEBRUIKE VIR BIOSURFAKTANTE	14
2.6.1 <i>Spesifisiteit</i>	14
2.6.2 <i>Mikrobiese de-emulsifikasie</i>	14
2.6.3 <i>Biodispersaan</i>	15
2.6.4 <i>Biosurfaktante in die farmaseutiese-, kosmetiese- en voedselbedrywe</i>	15
2.6.5 <i>Toepassing in die olie industrie</i>	16
2.6.7 <i>Verwydering van metale uit grond</i>	17
2.6.8 <i>Ander</i>	18
2.6.9 <i>Die voor- en nadele van biosurfaktante</i>	19
2.7 DOELSTELLINGS EN BENADERING	21
HOOFSTUK 3 MATERIALE EN METODEDES	22
3.1 ISOLERING VAN BAKTERIEË	22
3.1.1 <i>Inokula</i>	22
3.1.2 <i>Media</i>	22
3.1.3 <i>Koolstofbron</i>	23
3.1.4 <i>Kweking</i>	23
3.2 IDENTIFIKASIE VAN ORGANISMES	23
3.3 TOETS VIR SURFAKTANTPRODUKSIE	24
3.3.1 <i>Emulsifikasie-indeks oor 24 uur (E24)</i>	24
3.4 ISOLERING VAN BIOSURFAKTANTE	25
3.5 CHEMIESE ANALISE	26
3.5.1 <i>Proteïenbepaling</i>	26
3.5.2 <i>Koolhidraatbepaling</i>	26

3.6 KRITIESE MISELKONSENTRASIE (CMC)	27
3.7 KARAKTERISERING VAN SURFAKTANTE.....	28
3.7.1 <i>pH stabiliteit</i>	28
3.7.2 <i>Temperatuur stabiliteit</i>	28
3.7.3 <i>Stabiliteit by verskillende NaCl-konsentrasies</i>	28
3.8 CHEMIKALIEË EN REAGENSE.....	28
HOOFSTUK 4 RESULTATE.....	29
4.1 ISOLERING VAN BAKTERIEË.....	29
4.2 SELEKSIE EN IDENTIFIKASIE VAN ORGANISMES	30
4.2.1 <i>Emulsifikasie indeks</i>	30
4.3 KARAKTERISERING VAN SURFAKTANTE.....	39
4.3.1 <i>Chemiese-analise</i>	40
4.3.2 <i>Kritiese miselkonsentrasies (CMC)</i>	41
4.3.3 <i>pH</i>	42
4.3.5 <i>NaCl</i>	43
4.3.6 <i>Temperatuur</i>	44
4.4. SAMEVATTING	45
HOOFSTUK 5 BESPREKING	46
5.1 INLEIDING	46
5.2 SELEKTERING VAN BAKTERIEË.....	46
5.3 KARAKTERISERING VAN SURFAKTANTE.....	47
5.3.1 <i>Emulsifikasie van paraffien</i>	47
5.3.2 <i>Chemiese samestelling van die surfaktante</i>	49
5.3.3 <i>Kritiese miselkonsentrasie (CMC)</i>	50
5.4 STABILITEIT VAN SURFAKTANTE.....	52
5.4.1 <i>NaCl-stabiliteit</i>	52
5.4.2 <i>pH-stabiliteit</i>	53
5.4.3 <i>Temperatuur stabiliteit</i>	54
5.5 SAMEVATTING	55
BYLAAG A.....	65
BYLAAG B.....	67

Abstract

The objective of this study was to isolate bacteria capable of growing on organic industrial effluents and producing biosurfactants from these effluents and the characterisation of the produced surfactants. Three organisms were isolated and tested for biosurfactant production during growth on the effluents. The influence of different effluents as well as the influence of two different media was investigated. The results show that the effluents can be used for biosurfactant production. Proteïen, lipid en carbohydrate analyses were done on isolated biosurfactant and showed that two different biosurfactants were produced. The surfactant of organism 6 function optimally at lower pH values and organism k's surfactant is relatively pH stable. The surface tension of organism 6's surfactant rises with the salt concentration and organism k's rises with the concentration up to a 10% salt concentration. Both surfactants are temperature sensitive and lose activity above 40°C. The results show that two biosurfactants with unique properties were produced from the industrial effluents.

Opsomming

Die doelstelling van die studie was om bakterieë te isoleer wat op spesifieke organiese industriële-uitvloeisels kan groei, en biosurfaktante vanaf die uitvloeisel produseer en om die geproduseerde biosurfaktant te karakteriseer. Drie organismes is getoets vir biosurfaktantproduksie gedurende groei op die uitvloeisel. Die invloed van verskillende uitvloeisels sowel as die invloed van twee verskillende media op biosurfaktant produksie is bepaal. Die resultate toon dat die uitvloeisels wel gebruik kan word vir biosurfaktantproduksie. Proteïen-, lipied- en koolhidraatbepalings is gedoen op geïsoleerde surfaktante en dit dui daarop dat twee verskillende biosurfaktante geïsoleer is. Die surfaktant vanaf organisme 6 funksioneer optimaal by lae pH's en die van organisme k is redelik pH stabiel. Die oppervlak-aktiwiteit van organisme 6 se surfaktant styg soos wat die sout konsentrasie. Die van organisme k styg ook saam met die sout konsentrasie maar slegs tot by 'n konsentrasie van 10%. Albei surfaktante is temperatuur sensitief en verloor aktiwiteit bo 40°C. Die resultate toon dat biosurfaktante met unieke eienskappe vanaf die spesifieke uitvloeisels vervaardig kan word.

Lys van figure

HOOFSTUK 2

FIGUUR 2.1 KARBOKSIELSURE EN ANDER LIPIEDE HET DIESELFDE AMFIPATIESE STRUKTUUR AS SURFAKTANTE (COOPER 1986).	3
FIGUUR 2.2 MEGANISME WAARVOLGENS METALE DEUR SURFAKTANTE VANAF GRONDPARTIKELS VERWYDER WORD (FRAZER, 2000).	18

HOOFSTUK 3

FIGUUR 3.1 METODE VIR DIE ISOLERING VAN DIE BIOSURFAKTANTE (PRUTHI EN CAMEOTRA, 1995).	25
---	----

HOOFSTUK 4

FIGUUR 4.1 DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME 5 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET PROPYLOL AS KOOLSTOFBRON.	32
FIGUUR 4.2 DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME 5 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET ETHYLOL AS KOOLSTOFBRON.	33
FIGUUR 4.3 DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME 5 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N PROPYLOL/ETHYLOL-MENGSEL AS KOOLSTOFBRON.	34
FIGUUR 4.4 DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME K OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N PROPYLOL AS KOOLSTOFBRON.	35
FIGUUR 4.5 DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME K OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N ETHYLOL AS KOOLSTOFBRON.	36
FIGUUR 4.6 DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME K OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N 1:1 PROPYLOL/ETHYLOL-MENGSEL AS KOOLSTOFBRON.	37
FIGUUR 4.7 DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME 6 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N ETHYLOL AS KOOLSTOFBRON.	37
FIGUUR 4.8 DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME 6 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N PROPYLOL: ETHYLOL-MENGSEL AS KOOLSTOFBRON.	39
FIGUUR 4.9 CHEMIESE SAMESTELLING VAN DIE SURFAKTANTE.	40
FIGUUR 4.10 KRITIESE MISELKONSENTRASIE.	41
FIGUUR 4.11 INVLOED VAN PH OP SURFAKTANT-AKTIWITEIT.	42
DIE FIGUUR DUI DIE VERLAGING IN OPPERVLAKSPANNING AAN BY SPESIFIEKE PH'S	42
FIGUUR 4.12 INVLOED VAN SOUT OP SURFAKTANT-AKTIWITEIT.	43
FIGUUR 4.13 INVLOED VAN TEMPERATUUR OP SURFAKTANT-AKTIWITEIT.	44

Lys van tabelle

HOOFSTUK 2

TABEL 2.1

FIGUUR 4.8 DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME 6 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N PROPYLLOL: ETHYLOL-MENGSSEL AS KOOLSTOFBRON. 8

HOOFSTUK 3

TABEL 3.1

TSI TOETS..... 24

HOOFSTUK 5

FIGUUR 5.1

DIE SAMESTELLING VAN ANDER SURFAKTANTE..... 49

FIGUUR 5.2

EIENSKAPPE VAN SURFAKTANTE UIT DIE LITERATUUR IN VERGELYKING MET DIE EIENSKAPPE VAN DIE GEÏSOLEERDE SURFAKTANTE. 55

Bedankings

Aan die einde van die studie wil ek graag die volgende persone bedank:

- My hemelse Vader wat my instaat gestel het om die studie te voltooi.
- Professor P.J. Pretorius onder wie se leiding die studie onderneem is.
Dankie vir al u leiding en raad.
- My ouers vir hul ondersteuning.

Hoofstuk 1

Inleiding

Die wêreldmark vir surfaktante groei baie vinnig, en daar is geskat dat 10 miljard ton surfaktante in die jaar 2000 gebruik sou word (Ochner *et al.*, 1995). Surfaktante word vir 'n verskeidenheid van toepassings gebruik, maar vir baie jare was die meeste chemies gesintetiseer.

Die gebruik van biosurfaktante neem egter toe soos wat dit chemiese surfaktante vervang in belangrike industriële toepassings, dit is veral die feit dat dit biodegradeerbaar is wat die gebruik daarvan bevorder. Die produksie vanaf hernubare bronne en funksionaliteit onder ekstreme kondisies bevorder ook die gebruik van biosurfaktante (Banat, 1995).

Biosurfaktante se eienskappe is soortgelyk aan die van chemies gesintetiseerde surfaktante en het die potensiaal om chemies gesintetiseerde surfaktante te vervang (Banat, 1995).

Biosurfaktante is van industriële belang weens die wye verskeidenheid van potensiële toepassings wat insluit emulsifikasie faseskeiding, benatting, skuiming, oplossing emulsie-stabilisering, de-emulsifikasie, korrosie-inhibisie en verlaging van viskositeit. Stowwe met hierdie eienskappe is nodig in landbou, konstruksie, elastomeer- en plastiekproduksie, kos en drank stabilisering en kosmetiek, reiniging, metaal, leer en papier industrieë (Ochner *et al.*, 1995).

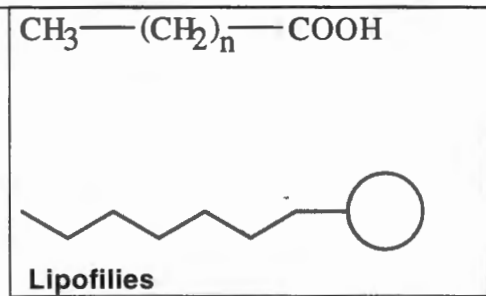
Hoofstuk 2

Literatuur

2.1 Inleiding

Die term surfaktante verwys na water-oplosbare, oppervlak-aktiewe stowwe wat gebruik word vir benatting, was, emulsifisering en dispersie. Surfaktante word hoofsaaklik gekarakteriseer deur hul vermoë om oppervlakspanning te verlaag (Bock *et al*, 1982). Surfaktante verander die toestande wat voorkom tussen twee fases en om hierdie eienskap te vertoon, moet daar hidrofobiese en hidrofiliese gebiede op dieselfde molekule voorkom en dit word 'n amfipatiese struktuur genoem (Hommel *et al*, 1994; Pruthi en Cameotra, 1995; Healy *et al.*, 1996). Dit gee aan hierdie molekule ongewone eienskappe, soos om die oppervlakspanning van water te verlaag. Die meeste lipiede het die amfipatiese eienskappe van surfaktante (kyk figuur 2.1)(Cooper, 1986; Desai en Banat, 1997). Surfaktante word ook gekarakteriseer deur die lading wat op die hidrofiliese deel van die molekule voorkom. Negatief gelaaiete surfaktante is anionies, hierdie surfaktante word die meeste in die industrie gebruik. Kationiese surfaktante is positief gelaai, amfoteriese surfaktante het beide 'n positiewe en negatiewe lading op dieselfde molekule en nie-ioniese surfaktante besit geen lading nie (Bock *et al*, 1982).

Die oplosbaarheid van surfaktante in 'n vloeistof word deur sy kritiese miselkonsentrasie (CMC) beskryf. By konsentrasies bo die CMC assosieer die molekules van die surfaktante met mekaar om supramolekulêre strukture te vorm, soos miselle, bilae en vesikels. Hierdie strukture word gehandhaaf deur hidrofobiese-, van der Waals-, elektrostatiese kragte en waterstofbindings (Georgiou *et al.*, 1992).



FIGUUR 2.1
KARBOKSIELSURE EN ANDER LIPIEDE HET DIESELFDE AMFIPATIESE STRUKTUUR AS SURFAKTANTE
(COOPER 1986).

Die oppervlakspanning van 'n vloeistof verander min by konsentrasies hoër as die CMC van 'n surfaktant. By die CMC is die oppervlak bedek met 'n monomolekulêre laag van die surfaktante en by hoër konsentrasies word miselle gevorm (Georgiou *et al.*, 1992).

Mikrobiologies gevormde stowwe met hoë oppervlak aktiwiteit word geklassifiseer as biosurfaktante. Baie biologiese molekules soos karboksielsure is amfipaties en kom voor tussen lae met verskillende polariteit (kyk figuur 2.1) (Georgiou *et al.*, 1992). Biosurfaktante stel organismes in staat om op water-onoplosbare substrate te groei deur dit oplosbaar en dus biobeskikbaar te maak (Healy *et al.*, 1996).

Mikro-organismes produseer baie potensieël bruikbare oppervlak-aktiewe molekules en hierdie surfaktante het 'n wye verskeidenheid van toepassings (Cameotra en Makkar, 1998). Biosurfaktante kom in verskeie vorms voor vanaf eenvoudige vetsure, sikliese strukture en groot polimere (Cooper, 1986, Desai en Banat, 1997, Cameotra en Makkar, 1998).

Baie surfaktante is aanvanklik ontdek vir ander eienskappe wat dit vertoon het, bv. hemolitiese en antibiotiese eienskappe. Die verbindings is egter herontdek as surfaktante gedurende later studies (Rosenberg, 1986).

2.2 Struktuur en eienskappe van biosurfaktante

Biosurfaktante word deur verskeie mikro-organismes vervaardig veral gedurende die groei op water-onoplosbare substrate (Rosenberg, 1986) en word geklassifiseer volgens die chemiese struktuur en mikrobiële oorsprong (Cooper, 1986). Die lipofiliese gedeelte is gewoonlik 'n alkielstert van een of meer vetsure wat versadig, onversadig, gehidroksileer of vertak kan wees. Die vetsuur word gebind aan die hidrofiliese groep deur 'n glikosied-ester of amienverbinding (Cameotra en Makkar, 1998). Die meeste biosurfaktante is neutraal of negatief gelaaie (Cooper, 1986; Cameotra en Makkar, 1998) en die negatiewe lading is te wyte aan 'n karboksilaat-, fosfaat- en soms sulfaatgroepe wat op die molekules voorkom. Daar is egter 'n klein hoeveelheid kationiese surfaktante met amien-groepe wat die lading veroorsaak (Cooper, 1986).

Biosurfaktante kan geklassifiseer word op grond van die lipiedtipes waaruit dit bestaan. Die neutrale surfaktante sluit in mono-, di-, en trigliseriede. Die fosfolipiede bevat digliseriede, fosfaat en 'n verskeidenheid van polêre groepe. Glikolipiede wissel van glukosiel gliseriede tot meer komplekse molekules (Cooper, 1986).

2.2.1 Glikolipiede

Die meeste bekende biosurfaktante is glikolipiede. Glikolipiede word onderverdeel in ramnolipiede, trehalolipiede en soforolipiede (Georgiou *et al.*, 1992). Dit bestaan hoofsaaklik uit alifatiese-sure of uit hidroksie-alifatiese-sure wat gebind is aan koolhidrate deur 'n eter- of estergroep (Healy *et al.*, 1996).

2.2.1.1 Ramnolipiede

Een van die bes bestudeerde surfaktante is die ramnolipiede van *Pseudomonas aeruginosa* (Georgiou *et al.*, 1992). Ramnolipiede bestaan uit een of twee ramnosemolekules wat gebind is aan een of twee vetsure (Desai en Banat, 1997). *P. aeruginosa* maak verskillende tipes ramnolipiede op 'n keer met die verskil dat 'n molekule een of twee vetsure en een of twee ramnosemolekules kan hê (Ochner *et al.*, 1995).

2.2.1.2 Trehalolipiede

Saam met die ramnolipiede is die trehalolipiede van *Rhodococcus erythropolis* die surfaktante wat nog die meeste bestudeer is (Georgiou *et al.*, 1992). Trehalolipiede bestaan uit diskariede van trehalose wat gebind is aan mikoliensuur. Die mikoliensuur in verskillende surfaktante van hierdie tipe verskil in grootte, struktuur, aantal koolstofatome en aantal onversadigde bindings (Desai en Banat, 1997).

2.2.1.3 Soforolipied

Hierdie surfaktante word hoofsaaklik deur giste vervaardig en bestaan uit dimeriese-soforose en is gebind aan langketting-hidroksie-vetsure (Desai en Banat, 1997). Die soforose is gebind aan 'n T-hidroksie-vetsuur deur die hidroksielgroep. Dit het 'n surfaktant met 'n hidrofobiese gebied in die middel en twee polêre groepe aan die kante tot gevolg (Cooper 1986). Hierdie verbindings kan oppervlakspanning effektief verlaag maar geen emulsifikasie aktiwiteit is al waargeneem nie (Desai en Banat, 1997).

2.2.2 Vetsure, fosfolipiede en neutrale lipiede

Verskeie bakterieë en giste is in staat om groot hoeveelhede vetsure en fosfolipiede vanaf *n*-alkane te produseer. Hierdie verbindings is oppervlak-aktief en kan dus as biosurfaktante geklassifiseer word (Desai en Banat, 1997). Versadigde vetsure met 'n koolstof-kettinglengte van 12 tot 14 is die beste surfaktante in hierdie vetsuurgroep. Behalwe vir reguitketting vetsure, is mikro-organismes in staat om komplekse vetsure te produseer met hidroksiel- en alkielkettings. Die oppervlakaktiwiteit van twee-hidroksie-vetsure en komplekse vetsure is relatief pH onsensitief (Rosenberg, 1986).

Fosfolipiede is komponente van die mikrobiese membrane en bestaan uit 'n lipiedgroep en 'n fosfaat wat gebind is deur 'n estergroep wat ontstaan tussen die fosfaat - en alkoholgroep van die lipied (Healy *et al.*, 1996).

2.2.3 Polimeriese biosurfaktante

Die meeste surfaktante is polimere en is gewoonlik polisakkariede (Cooper en Goldenberg, 1987). Die polimeer kan ook uit vetsure, koolhidrate, peptiede en selfs proteïene bestaan (Desai en Banat, 1997). Baie proteïene is oppervlak-aktief en veroorsaak skuim in waterige oplossings. Hierdie eienskappe van proteïene kom vanaf die alfa heliese struktuur van proteïene waar hidrofobiese en hidrofiliese aminosure in verskillende rigtings wys. Sommige polipeptiede word spesifiek deur selle vervaardig om te dien as surfaktante (Georgiou *et al.*, 1992)

Die emulsifiseerder van *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 Emulsan is 'n sterk suur anioniese hetero-polisakkaried wat baie D-galaktose-amien bevat en het baie unieke eienskappe wat in afdeling 2.6.1 beskryf word (Zuckerberg *et al.*,

1979, Goldman *et al.*, 1982). Biodispersaan is ook 'n anioniese polimeriese polisakkaried (Ekeles *et al.*, 1994).

2.2.4 Lipopeptiede en lipoproteïene

Lipopeptiede en lipoproteïene bestaan uit 'n lipied wat geheg is aan 'n polipeptiedketting (Healy *et al.*, 1996). Surfaktien is 'n sikliese peptied wat deur *Bacillus subtilis* vervaardig word (Peypoux *et al.*, 1999) en is suur en oplosbaar in alkaliese water maar onoplosbaar in neutrale en suur water (Arima *et al.*, 1968). *Bacillus licheniformes* produseer molekules wat soortgelyk is aan Surfaktien met eienskappe wat ooreenstem (Desai en Banat, 1997).

2.2.5 Partikulêre biosurfaktante

Ekstrasellulêre membraanvesikels maak mikro-emulsies van verskillende koolwaterstowwe en dit speel 'n belangrike rol in die opneem van koolwaterstowwe in die mikrobiese sel (Rosenberg, 1986; Desai en Banat, 1997). Komponente van die sel-oppervlak van bakterieë dra by tot die surfaktant-aktiwiteit, byvoorbeeld, M-proteïen en lipoteïgoïensuur van groep A streptokokke, proteïen A in *Staphylococcus aureus*, laag A in *Aeromonas salmonicida*, prodigiosien in *Serratia* spesies, gramisidien in *Bacillus brevis* spore en die fimbria van *Acinetobacter calcoaceticus* (Desai en Banat, 1997).

2.2.6 Antibiotika

Verskeie antibiotika is bekende amfipatiese molekules en vertoon daarom surfaktant-aktiwiteit. Voorbeelde van antibiotika met surfaktant eienskappe: Polymyxine is lipopeptiede wat selle liseer (Rosenberg, 1986). Surfaktien is

ook 'n lipopeptied met sterk anti-fungale aktiwiteit (Banat, 1995). Antibiotikum TA inhibeer die sintese van peptidoglikaan (Rosenberg, 1986).

2.3 Bakterieë wat biosurfaktante produseer

Bakterieë met 'n hoë oppervlak tot volume verhouding vervaardig 'n groot verskeidenheid van oppervlak-aktiewe verbindings (Rosenberg, 1986). Neu en Poralla (1990) het gevind dat selle met 'n hidrofobiese oppervlak, asook selle met 'n affiniteit vir koolwaterstowwe, in staat is om surfaktante te produseer.

Emulsan van *Acinetobacter calcoaceticus*¹ word altyd in die medium vrygestel selfs as dit op water-oplosbare substraat soos etanol of asetaat groei (Goldman *et al.*, 1982). Die meeste *Acinetobacter* spesies produseer biosurfaktante. Alhoewel die samestelling verskil, is daar duidelike ooreenkomste (Star en Rosenberg, 1983). In tabel 2.1 word 'n lys van die tipes biosurfaktante wat voorkom gegee asook die organismes wat dit vervaardig.

Tabel 2.1
Mikrobiëse biosurfaktante

Mikrobiëse surfaktante		
<i>Groep</i>	<i>Biosurfaktante</i>	<i>Organisme</i>
<i>Glikolipiede</i>		
	Ramnolipiede	<i>P. aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
	Trehalolipiede	<i>R. erytropolis</i> <i>N. erytropolis</i>
		<i>Mycobacterium sp.</i>

(Cooper 1986)

¹ *Acinetobacter calcoaceticus* was eers verkeerd geklasifiseer as *Athrobacter* RAG1 en die emulsifiseerder wat die organisme produseer was aanvanklik EF-RAG1 genoem maar later hernoem na Emulsan (Kaplan en Rosenberg 1982)

	Soforolipiede	<i>T.bombicola</i>
		<i>T.apicola</i>
		<i>T.petrophilum</i>
	Cellobiolipiede	<i>U.zea, U.maydis</i>
Lipopeptiede en lipoproteïene		
	Peptiedlipied	<i>B.licheniformis</i>
	Serrawettin	<i>S.Marcescens</i>
	Viscosin	<i>P. fluorescens</i>
	Surfactin	<i>B.subtilus</i>
	Subtilisin	<i>B.subtilis</i>
	Gramicidins	<i>B.brevis</i>
	Polimyxins	<i>B.polymyxa</i>
Vetsure, neutrale lipiede en fosfolipiede		
	Vetsure	<i>C.lepus</i>
	Neutrale lipiede	<i>N.erythropolis</i>
	Fosfolipiede	<i>T.thiooxidans</i>
Polimeriese surfaktante		
	Emulsan	<i>A.calcoaceticus</i>
	Biodispersaan	<i>A.calcoaceticus</i>
	Mannan-lipied-proteïen	<i>C.tropicalis</i>
	Liposan	<i>C.lipolitica</i>
	Koolhidraat proteïen lipied	<i>P. fluorescens</i>
		<i>D.polymorphis</i>
	Proteïen PA	<i>P. aeriginosa</i>
Partikulêre biosurfaktante		
	Vesikels en fimbriae	<i>A.calcoaceticus</i>
	Heel selle	Verskeie bakterieë

2.4 Biosurfaktante se funksie in die natuur

Die laer molekulêre gewig surfaktante het amfipatiese, eienskappe wat 'n rol mag speel in die hegting en onthechting van bakterieë aan oppervlakke en kan die sel-oppervlak voorberei vir verskillende tipes substrate (Rosenberg, 1986; Bar-Nes *et al.*, 1988). Biosurfaktante is dikwels betrokke by koolwaterstof opname en word daarom hoofsaaklik vervaardig deur organismes wat in staat is om koolwaterstowwe te metaboliseer (Banat, 1995).

Bakterieë gebruik biosurfaktante om aan oppervlakke te heg waar daar voedingstowwe voorkom. Na 'n ruk word die oppervlakke waaraan bakterieë heg egter ongunstig vir groei en die organisme desorbeer dan om ander oppervlakke te vind om te koloniseer. Daar is gevind dat *A.calcoaceticus* Emulsan vrystel sodra die oppervlak waaraan dit geheg is ongunstig raak vir groei. Dit veroorsaak dat die organisme desorbeer vanaf die oppervlakke en vry is om aan nuwe oppervlakke te heg (Star en Rosenberg, 1983).

Deur water-onoplosbare substrate te emulsifiseer is organismes in staat om groter oppervlakke beskikbaar te stel vir groei (Rosenberg, 1986). Die fisiologiese rol van mikrobiese surfaktante is nog nie duidelik nie maar daar is al voorgestel dat surfaktante die oplosbaarheid van sekere koolwaterstofsubstrate verhoog en bevorder dus die groei van bakterieë op koolwaterstowwe. Die hipotese is bewys in die geval van *Pseudomonas aeruginosa*. Die organisme vervaardig baie minder surfaktant indien dit op 'n water-oplosbare koolstofbron groei (Lin, 1996). Daar is egter ook gevind dat mutante van die organisme wat nie ramnolipiede vervaardig nie tog in staat is om op heksadekaan te groei. Die mutante groei egter stadiger, die ramnolipiede is dus nie nodig vir groei op water-onoplosbare substrate nie maar fasiliteer dit eerder (Ochner *et al.*, 1995).

Bacillus subtilis produseer net surfaktante as dit op 'n water-oplosbare koolstofbron groei. Die produksie van surfaktien is ook noodsaaklik vir die ontwikkeling van DNA transformasie kompetensie in *Bacillus subtilis* alhoewel geen invloed van surfaktien op DNA onder natuurlike toestande nog waargeneem is nie (Nakano *et al.*, 1991).

Streptococcus thermophilus produseer surfaktante as 'n hegtingsmiddel. Sommige surfaktante, hoofsaaklik lipopeptiede en glikolipiede, het biosidiese eienskappe en werk hoofsaaklik op die beginsel dat dit die selmembrane oplos (Lin, 1996).

Fosfolipiede vanaf *Thiobacillus thiooxidans* is in staat om swawel te benat. Swawel is 'n element wat noodsaaklik is vir groei. Dit is egter nie duidelik of die lipiede deur die sel vrygestel word vir die doel nie (Rosenberg, 1986).

P. aeruginosa se ramnolipied kan moontlik hidrofobiese proteïene meer oplosbaar maak en fasiliteer moontlik die beweging daarvan oor die hidrofobiese selmembraan in die medium in (Mulligan *et al.*, 1989).

Sommige biosurfaktante word geproduseer om spesifiek oppervlakspanning te verlaag. Die beste voorbeeld is pulmonêre surfaktante wat noodsaaklik is vir normale respirasie by die mens (Georgiou, 1992).

2.5 Produksie van biosurfaktante

Die fermentasieproses hou die sleutel tot meer ekonomiese produksie van surfaktante. Voedingstowwe is verantwoordelik vir 10 – 30 % van produksiekoste. Die meeste van die biosurfaktante word vrygestel tydens die stasionêre of eksponensiële groei-fases. Daar is verskeie fermentasie tegnieke wat ingespan word in die grootskaalse produksie van biosurfaktante (Cameotra en Makkar, 1998). Verskeie biosintese weë word gebruik in die

produksie van biosurfaktante en is te wagte, gesien die wye strukturele verskeidenheid van biosurfaktante (Georgiou, 1992).

Die produksie van suiwer biosurfaktante kan verhoog word deur die ensieme te isoleer wat verantwoordelik is vir die vervaardiging van die surfaktante. Hierdie ensieme kan geïmmobiliseer word en die substraat word daarvoor laat loop. Biosurfaktant word aan die einde van die proses verkry. Die produk wat so verkry word, is baie suiwerder en die substraat wat gebruik word kan meer effektief omgeskakel word na surfaktante sonder om enige daarvan af te staan aan die produksie van biomassa (Ducret *et al.*, 1995).

Stikstof is 'n reguleerder van lipogenese in sommige organismes. Onder stikstofbeperking verhoog die produksie van trigliseriede en vrye-vetsure in die medium. Die biomassa en soforolipiede-sintese van *Candida apicola* word sterk beïnvloed deur hoër konsentrasies van ammonium ione. Hierdie surfaktant se produksie verhoog onder hierdie toestande in kontras met wat verwag sal word as daar gekyk word na die invloed van ammonium op lipogenese (Hommel *et al.*, 1994). Daar is gevind dat nitrate beter produksie van ramnolipiede lewer as ammonium (Ochner *et al.*, 1996).

Biosurfaktantsintese deur *Bacillus licheniformis* JF2 word geïnhibeer deur hoë konsentrasies NaCl en suboptimale fosfaatkonsentrasie. Gliserol kan ook nie as substraat vir biosurfaktantproduksie dien nie (Lin *et al.*, 1993). *Bacillus subtilis* produseer nie surfaktante wanneer dit op water-onoplosbare substrate gegroei word nie, maar slegs as die substraat water oplosbaar is (Lin, 1996).

Die produksie van Emulsan word geïnhibeer deur die teenwoordigheid van hoë konsentrasies fosfaat en etanol. Dit is dus belangrik om hierdie stowwe by optimum konsentrasies in die kultuurmedium te hou aangesien die koolstofbron en fosfaat nodig is vir selgroei maar te hoë konsentrasies kan die gewenste produk se produksie onderdruk (Choi *et al.*, 1996).

Ramnolipiede se struktuur word beïnvloed deur omgewingsfaktore, en groeikondisies maar veral deur die samestelling van medium. Die produksie verhoog ook indien daar 'n stikstofbeperking in die medium is. Daar is ook gevind dat hoë konsentrasies yster die produksie van ramnolipied-surfaktante onderdruk. Die beperking van yster verhoog gevolglik die produksie. Ramnolipiede kan vanaf onverwante substrate geproduseer word soos molasse (Patel en Desai, 1997) asook gliserol, mannitol, glukose en fruktose (Robert *et al.*, 1989). Industriële afval kan ook gebruik word byvoorbeeld wei water (Babu *et al.*, 1996). Fosfaatbeperking onderdruk die produksie van ramnolipied-surfaktante in *Pseudomonas aeruginosa*. Die ramnolipiede word waarskynlik saam met die buitenste membraan geproduseer, maar die produksie daarvan hou aan nadat groei gestop het. Daar is ook gevind dat sel-hidrofobisiteit verlaag sodra groei stop en ramnolipiede in die kultuurmedium vrygestel word. Dit word toegeskryf aan selstres as gevolg van stikstofbeperking wat ontwinging van die selmembraan tot gevolg het asook die vrystelling van ramnolipiede (Mulligan *et al.*, 1989). Die beste kondisies vir ramnolipiedproduksie is tussen pH 6 en 6,5. Bo pH 7 is daar egter 'n skerp afname in die produksie van ramnolipiede en die temperatuur optimum is tussen 31 en 34 °C. Onder 30°C en bo 37°C neem die produksie skerp af (Ochner *et al.*, 1995).

In *Nocardia erythropolis* sal 'n verhoging in die spoed waarteen die organisme geskud word die konsentrasie van biosurfaktante verlaag as gevolg van sleurkragte. Die produksie van biosurfaktante in gisselle verhoog namate die skudspoed verhoog word (Desai en Banat, 1997).

2.6 Gebruike vir biosurfaktante

2.6.1 Spesifisiteit

Emulsan vanaf *Acinetobacter calcoaceticus*-RAG1 is slegs in staat om 'n mengsel van sikliese en alifatiese verbindings te emulsifiseer, die alifatiese kettings kan reguit of vertak wees en die sikliese komponent kan aromaties of nie-aromaties wees. Dit is egter ook moontlik om sikliese verbindings met alkiel sykettings te emulsifiseer. Die emulsifiseerder is in staat om ru-olie te emulsifiseer maar sodra die olie gefraksioneer word volgens polariteit, is dit nie in staat om enige van die fraksies te emulsifiseer nie en is dus afhanklik van 'n mengsel van sikliese en alifatiese verbindings om te emulsifiseer (Rosenberg *et al.*, 1979a). Emulsan toon slegs emulsifikasie aktiwiteit bo 'n pH van 7 indien divalente katione (bv. Mg^{2+}) in die mengsel teenwoordig is (Rosenberg *et al.*, 1979b).

2.6.2 Mikrobiiese de-emulsifikasie

Biosurfaktante is in staat om olie-in-water en water-in-olie emulsies te skep. Die aktiwiteit kom in die bakteriese sel-oppervlak voor en bly stabiel selfs na autoklavering. De-emulsifikasie werk op eenvoudige emulsies, soos keroseen in water, en komplekse emulsies, soos verkry in verhoogde olie herwinningstegnieke (Korsaric, 1992).

Emulsan wat deur *Acinetobacter calcoaceticus* geproduseer word is 'n poli-anioniese-hetero-polisakkaried. Die verbinding is nie in staat om die oppervlakspanning veel te verlaag nie maar is een van die kragtigste emulsie stabiliseerders wat bekend is. Dit is moontlik om emulsies wat Emulsan bevat te destabiliseer deur die byvoeging van emulsanases. Hierdie ensiem verteer Emulsan en destabiliseer die emulsie, dit maak die effektiewe beheer van de-

emulsifikasie moontlik sonder die gebruik van hitte of chemikalieë (Hayes *et al.*, 1986).

2.6.3 Biodispersaan

Biodispersaan is 'n unieke biosurfaktant wat in staat is om kalksteen te disperseer. Deur Biodispersaan by kalksteen te voeg tydens die maal daarvan, word die tyd wat die proses neem met 50% verkort en 'n meer eweredig gemaalde produk word verkry. Dit maak dit moontlik om dit in papier as 'n vuller te gebruik want die kwaliteit van die papier word deur die byvoeging van kalksteen verhoog. Proteïene kom egter in die Biodispersaane-ekstrak voor en dit kan ongewenste kleur en reuk in die papier veroorsaak aangesien dit die groei van bakterieë bevorder. Die probleem is opgelos deur die selektering van mutante wat minder proteïene in die medium vry stel (Elkeles *et al.*, 1994).

2.6.4 Biosurfaktante in die farmaseutiese-, kosmetiese- en voedselbedrywe

Baie biosurfaktant eienskappe kan deur die kosmetiese industrie gebruik word byvoorbeeld, emulsifikasie en de-emulsifikasie, skuimvorming en waterbindingskapasiteit, verspreidings- en benattingseienskappe (Korsaric, 1992). Die kosmetiek bedryf benodig ook surfaktante wat nie die vel sal irriteer nie, wat biosurfaktante baie aantreklik maak vir hierdie toepassings.

Surfaktante het verskeie moontlike toepassings in die farmaseutiese bedryf waarvan die gebruik as antibiotika seker die bekendste is. Surfaktantien is ondersoek as 'n antikanker, antivirale en anti-*Mycoplasma* middel. Daar is ook gevind dat dit bloedstolling inhibeer en bloed-cholesterol kan verlaag. Daar is ook gevind dat die verbinding gebruik kan word om tussen virale selle

van *Mycoplasma* te onderskei (Peypoux *et al.*, 1999). Dit inhibeer proteïen denaturasie en liseer ook Grampositiewe en -negatiewe bakterieë (Arima *et al.*, 1968).

Polmyxine versteur die selmembrane van bakterieë en is in staat om sekere membraan ensieme oplosbaar te maak. Antibiotikum TA is 'n breë-spektrum antibiotikum en voorkom die polimerisering van lipied disakkariëdpentapeptiede en inhibeer dus die sintese van peptidoglikaan. Hierdie antibiotikum kan ook aan weefsel en ander oppervlakke bind terwyl die antiobiotiese eienskappe behou word onder hierdie toestande en kan daarom terapeuties toegepas word aangesien patogene organismes aan weefsel en ander oppervlakke heg (Rosenberg *et al.*, 1986). Die groei van die MIVirus in leukosiete word geïnhibeer deur biosurfaktante (Desai en Banat, 1997).

In die voedsel industrie word biosurfaktante gebruik vir emulsifisering tydens die verwerking van rou materiale. 'n Verskeidenheid biologiese molekules word in hierdie bedryf vir die doel ingespan (Desai en Banat, 1997).

2.6.5 Toepassing in die olie industrie

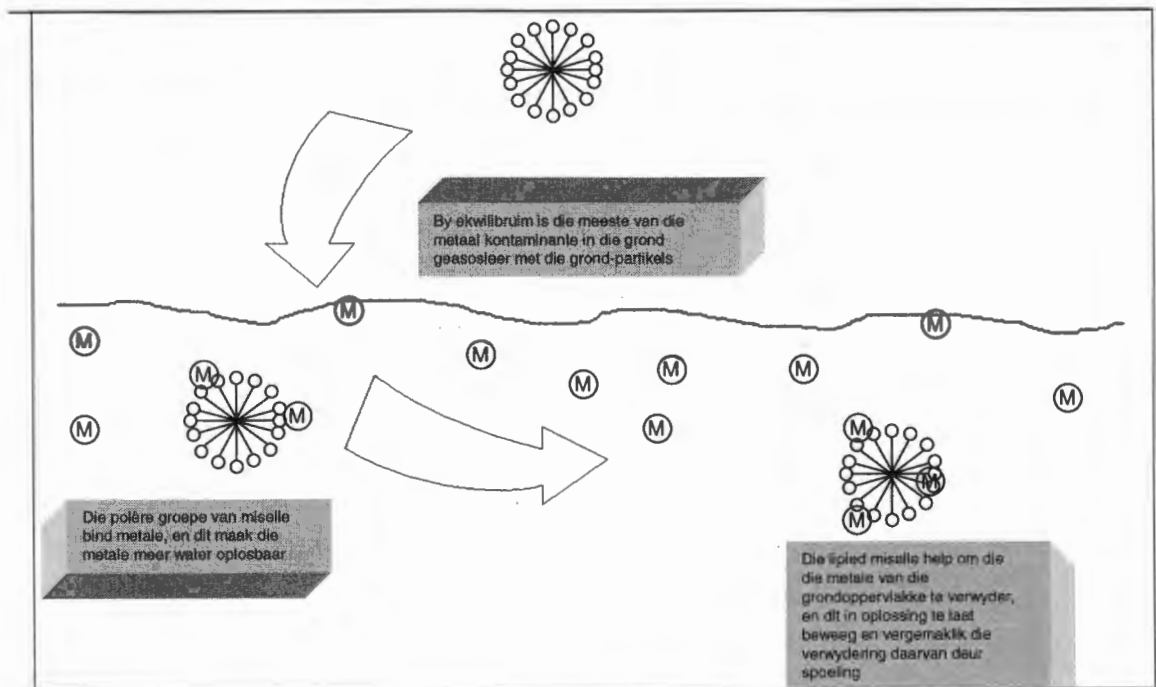
Die fisies-chemiese verwydering van olie vanuit grond word ook deur die surfaktante bevorder (Lang en Wullbrandt, 1999). Chemiese surfaktante is gebruik in die opruiming van olie besoedeling en die verbetering van die olie herwinningsprosesse uit grond. Hierdie verbindings is egter nie biodegradeerbaar nie en is toksies terwyl biosurfaktante soortgelyke emulsifikasie aktiwiteit het en boonop biodegradeerbaar is. Daar is groot belangstelling in die gebruik van biosurfaktante vir die mobilisering van swaar ru-olies, vervoer van petroleum in pyplydings, opruiming van olie besoedeling en die mikrobies verhoogde olie herwinning (MEOR) (Banat, 1995).

Deur gebruik te maak van biosurfaktante was dit moontlik om die tenks waarin olie gestoor word skoon te maak en is daar tussen \$100 000 en \$150 000 se olie herwin. Die skoonmaakproses is noodsaaklik terwyl die gebruik van biosurfaktante dit ekonomies lewensvatbaar en winsgewind maak (Banat, 1995). In 'n studie om die gebruik van ramnolipied in olie besoedeling te ondersoek is gevind dat dit effektief is en minder toksies as konvensionele chemiese surfaktante is, daar is egter gevind dat die ramnolipied meer toksies is as ander biosurfaktante (Lang en Wullbrandt, 1999).

Lichenysin, 'n biosurfaktant wat struktureel baie ooreenstem met surfaktien word deur *Bacillus licheniformis* JF2 vervaardig en is gepatenteer as 'n middel vir verhoogde olie herwinning (Horowitz *et al.*, 1990).

2.6.7 Verwydering van metale uit grond

Daar is gevind dat ramnolipiede komplekse vorm met Cd^{2+} (Tan *et al.*, 1994; Herman *et al.*, 1995) en Pb^{2+} en Zn^{2+} (Herman *et al.*, 1995). Ramnolipied bind aan die Zn^{2+} en Cd^{2+} en kan dus gebruik word om die metale meer oplosbaar te maak om dit uit grond te was. Die gebruik van biosurfaktante vir die verwydering van metale uit grond blyk effektief te wees met metale wat nie gewoonlik deur ionuitruilings meganismes verwyder kan word nie (Herman *et al.*, 1995). Emulsan kan gebruik word vir die herwinning van uraan uit water aangesien die verbinding 'n kompleks met die metaal vorm (Zosim *et al.*, 1983). Figuur 2.2 toon die meganisme waarvolgens biosurfaktante metale uit grond verwyder.



FIGUUR 2.2
MEGANISME WAARVOLGENS METALE DEUR SURFAKTANTE VANAF GRONDPARTIKELS VERWYDER
WORD (FRAZER, 2000).

2.6.8 Ander

Bioremediëring van koolteer, kreosoot en petroleum word reeds toegepas in die detoksifikasie by toksiese afvalhope (Pollard *et al.*, 1994). Ramnolipiede is bestudeer in verskeie studies van poli-aromatiese verbindings en ander toksiese koolwaterstowwe. Daar is gekyk of die kontaminante uit die grond verwyder kan word deur die byvoeging van surfaktante. In 'n studie deur Van Dyke is waargeneem dat die ramnolipiede veral in staat is om laer konsentrasies van hidrofobiese kontaminante baie meer effektief as water te verwyder maar die effektiwiteit neem egter af soos die konsentrasie versadiging nader (Van Dyke *et al.*, 1993).

Organismes wat in ekstreme omgewings voor kom kan moontlik surfaktante met unieke eienskappe produseer wat onder soortgelyke omstandighede aktief is. Termofiele mikro-organismes kan groei en oorleef in temperature vanaf 42 tot 100 °C. Organismes wat surfaktante in hierdie omgewings produseer het veral toepassing in woestyn olievelde. Psigrofiele organismes groei optimaal by temperature van 15 °C of laer en surfaktante vanaf die organismes kan gebruik word in die kosbedryf (*Anthrobacter protophormiae* is 'n psigrofiele organisme wat 'n biosurfaktant produseer). Hierdie biosurfaktante kan moontlik in arktiese olievelde gebruik word by die ontginning van olie. Halofiele organismes groei by soutkonsentrasies van 30 % en hoër, so bv. kan *Bacillus licheniformis* 'n biosurfaktant produseer by soutkonsentrasies van tot en met 13% (Cameotra en Makkar, 1998).

2.6.9 Die voor- en nadele van biosurfaktante

Die produksiekoste van biosurfaktante is tans te hoog om te kompeteer met gevestigde chemiese produkte en die opbrengs is tydens fermentasie gewoonlik baie laag (Korsaric 1992; Lang en Wullbrandt, 1999). Die koste van die substraat kan verlaag word deur geskikte afvalprodukte te gebruik. Nog 'n probleem is die suiwerheid van die produk. Dit is baie moeilik om biosurfaktante te suiwer maar indien die opbrengs van die biosurfaktante in die reaktors egter verhoog kan word, kan dit die probleem oplos (Korsaric, 1992). Daar is egter heelwat voordele verbonde aan die gebruik van biosurfaktante.

1. Hulle is bio-afbreekbaar onder aerobiese en anaerobiese toestande (Korsaric, 1992; Ducret *et al.*, 1995). Waar biodegradasie noodsaaklik is, kan dit die koste regverdig (Lang en Wullbrandt, 1999).
2. Biosurfaktante het lae toksisiteit (Korsaric, 1992; Ducret *et al.*, 1995).
3. Bio-aanpasbaar en verteerbaar (Korsaric, 1992). Hulle irriteer nie die vel soos konvensionele surfaktante nie, is reukloos en smaakloos en gee

-
- normale verteringsprodukte (Ducret *et al.*, 1995). Waar beter bio-aanpasbaarheid van produkte vereis word, kan die voordele die koste daaraan verbonde dit die moeite werd maak (Lang en Wullbrandt, 1999).
4. Besikbaarheid van rou materiale (Korsaric, 1992). Biosurfaktante word vervaardig van hernubare bronne (Cooper, 1986; Ducret *et al.*, 1995). Konvensionele surfaktante benodig relatief suiwer chemiekalieë om die gekose produk te verkry maar biosurfaktante benodig nie spesifieke chemikaliee nie en kan vanaf onverwante produkte vervaardig word (Cooper, 1986).
 5. Aanvaarbare produksie ekonomie. Sommige biosurfaktante kan ekonomies vervaardig word vanaf industriële-uitvloeisels en byprodukte (Korsaric, 1992).
 6. Gebruik in omgewingsbeheer. Gebruik in bioremediëring van gekontamineerde grond, beheer van oliestortings asook die biodegradasie en detoksifisering van industriële-uitvloeisels (Korsaric, 1992).
 7. Spesifisiteit. Baie biosurfaktante is spesifiek in hul werking en kan gebruik word in detoksifikasie van spesifieke besoedeling, de-emulsifikasie van industriële emulsies en verskeie toepassings in die kosmetiese-, farmaseutiese- en voedselbedryf (Korsaric, 1992).
 8. In terme van fisies-chemiese eienskappe soos die verlaging in oppervlakspanning, hitte- en pH-stabiliteit, is baie biosurfaktante vergelykbaar met sintetiese surfaktante (Georgiou *et al.*, 1992).

Dit is ook teoreties moontlik om die chemiese struktuur en fisies eienskappe van biosurfaktante te manipuleer. Dit kan deur genetiese, biologiese en chemiese manipulerings van die biosintese-prosesse geskied.

Biosurfaktante is duurder as chemiese alternatiewe maar die CMC van biosurfaktante is baie laer, en minder surfaktant word dus gebruik om dieselfde effek te verkry en maak biosurfaktante dit dus meer effektief (Ochner *et al.*, 1996)

2.7 Doelstellings en benadering

Die doel van hierdie studie was om bakterieë te isoleer wat in staat is om biosurfaktante vanaf organiese industriële-uitvloeiings te produseer.

Om hierdie doel te bereik is die volgende benaderingswyse geformuleer:

- Isolering van organismes wat in staat is om op hierdie koolstofbronne te groei.
- Toets van die emulsifikasie aktiwiteit van die bakteriese produkte.
- Isolering van die biosurfaktante.
- Karakterisering van die surfaktante deur die chemiese samestelling en fisiese eienskappe daarvan te ondersoek.

Hoofstuk 3

Materiale en Metodes

3.1 Isolering van bakterieë

3.1.1 Inokula

Grond wat vanaf die Sigma- en SASOL-washoop verkry is, is as inokula gebruik. Hierdie grond is vir 'n aantal jare aan die organiese uitvloeisel wat as koolstofbron gebruik is, blootgestel.

3.1.2 Media

In hierdie studie is 'n minimale medium en die *Pseudomonas* PHB-medium gebruik (Atlas en Parks, 1993). Die samestelling is soos volg:

Minimale medium (per 1 liter H₂O)

1.00g NH₄Cl
0.60g K₂HPO₄
0.40g KH₂PO₄
0.50g NaCl
0.20g MgSO₄
0.05g FeSO₄
1l H₂O

Pseudomonas PHB-medium (per 1 liter H₂O)

0.20g MgSO₄
0.4g K₂HPO₄

0.2g KH_2PO_4

0.2g NaCl

3.1.3 Koolstofbron

Die industriële-uitvloeisel wat as enigste koolstofbron gebruik is, was Propylol, Sabutol en Ethylol wat deur SASOL voorsien is.

3.1.4 Kweking

'n Spatelpunt hoeveelheid van die verskillende grondmonsters is by 50 ml medium met 'n konsentrasie van 0.4% van, onderskeidelik, Sabutol en Propylol in 100ml Erlen-Meyer flesse gevoeg. Die kulture is vir 48 uur teen 200 opm by kamertemperatuur geskud en in kulture waar groei waargeneem is, is 1 ml hiervan oorgedra na 'n 0.6 % Sabutol of Propylol medium en is dit vir 'n verdere 48 uur geskud. Die proses is herhaal totdat 'n konsentrasie van 1% Sabutol of Propylol bereik is en groei steeds waargeneem kon word. Na 48 uur is 0.1ml van die kultuur op 1% Sabutol of Propylol minimale agar plate versprei afhangend van die koolstofbron waarin die organismes gekweek is. Die plate is by kamertemperatuur gelaat totdat enkel kolonies sigbaar was. Die enkel kolonies is gesuiwer op dieselfde tipe plate as waarop die kolonies aanvanklik gegroei het.

3.2 Identifikasie van organismes

Die organismes is geïdentifiseer volgens die Biologmetode (Vakgroep Mikrobiologie, PU vir CHO). Dit behels die groei van die organismes in mikroplate met verskillende koolstofbronne in die putjies.

Indien die organisme op die koolstofbron groei, vind 'n kleurverandering plaas en kan die putjies positief of negatief gemerk word. Die resultate word dan in die Biologprogram ingelees wat dit teen 'n data basis vergelyk en 'n identifikasie word gedoen. Voor die mikroplate geïnokuleer kan word, moet die volgende bepaal word: of die organisme Grampositief of –negatief is, oksidase positief of negatief, en enteries of nie-enteries. Die standaardtoets vir Gramkleuring en oksidase is gedoen (Botes, 1998). Die triple suikerystertoets is gebruik om te bepaal of die organismes enteries of nie enteries is. Die sleutel vir die lees van die reaksies wat met die media plaasvind word in tabel 3.1 gegee (Atlas, 1996). Die medium bevat 'n klein hoeveelheid glukose en groot hoeveelhede sukrose en laktose. Die organisme word op die oppervlakke uitgestryk en ook binne die agar deur dit met die inokuleernaald te steek. H₂S-vorming kom voor indien die organisme die proteïene of die tiosulfaat in die medium metaboliseer. Die swart kleur wat gesien word is die reaksie van die H₂S met die yster in die medium (Brock *et al.*, 1994).

Tabel 3.1

TSI toets	
Bodemreaksies	Suur (geel), Gas
Oppervlakreaksies	Suur (Geel) Alkalies(Roof)
H ₂ S-reaksie	Bodem word swart in die afwesigheid van suur 'n suur reaksie in die bodem

(Atlas, 1996)

3.3 Toets vir surfaktantproduksie

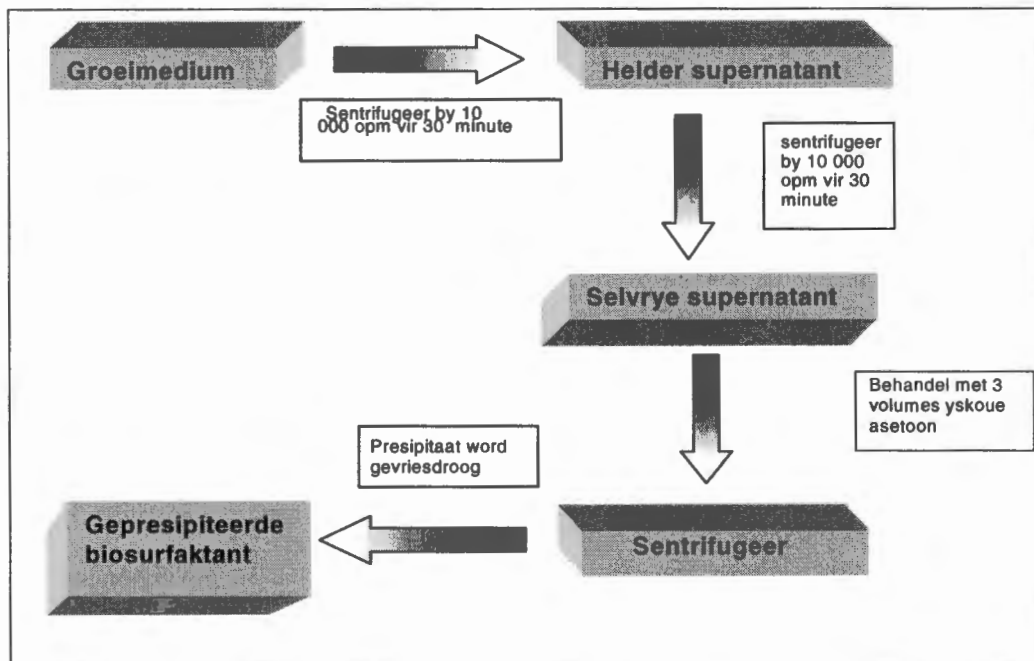
3.3.1 Emulsifikasie-indeks oor 24 uur (E24)

Bakterieë is gekweek in onderskeidelik minimale en *Pseudomonas* PHB-medium by 30°C op 'n skudmasjien teen 150 opm. Propylol, Ethylol en 'n 1:1 Propylol Ethylol-mengsel is as koolstofbronne gebruik. Elke organisme is in albei van die media gegroei en die verskillende koolstofbronne is bygevoeg. Elke 24 uur is 'n monster geneem wat vir 10 minute teen 12 000 opm

gesentrifugeer is om al die selle te verwyder. Vier ml van die supernatant is dan oorgedra na die proefbuis waarby 6ml beligtings paraffien gevoeg is. Die mengsel is dan vir 1 minuut baie deeglik gemeng en dan laat staan vir 24 uur waarna die grootte van die emulsifikasie laag gemeet is. Die persentasie emulsifikasie is dan bereken deur die volgende formule te gebruik (Abu-Rawaida *et al.*, 1991):

$$E\% = \frac{\text{Emulsifikasie laag}}{\text{Totale vloeistoffase}} \times 100$$

3.4 Isolering van biosurfaktante



FIGUUR 3.1
METODE VIR DIE ISOLERING VAN DIE BIOSURFAKTANTE (PRUTHI EN CAMEOTRA, 1995).

Die bakterieë is in die onderskeie mediums en koolstofbron-kombinasies met die beste opbrengs gekweek. Die surfaktante is geïsoleer volgens die metode van Pruthi en Ceomatra (1995) en word in die bostaande vloiediagram geïllustreer (figuur 3.1).

3.5 Chemiese analise

3.5.1 Proteïenbepaling

Die Pierce BCA-metode is uitgevoer. Die metode gebruik bisinkoniesesuur (BCA) vir die spektrofotometriese bepaling van proteïen konsentrasies. Dit behels die reaksie tussen proteïene en Cu^+ in 'n alkaliese medium. Die BCA reageer met die Cu^{2+} , 'n perskleurige produk vorm waneer twee BCA molekules reageer met met een Cu^{2+} . Die Cu^{2+} -BCA-kompleks vertoon sterk absorpsie by 562nm (Healy *et al.*, 1996).

Die volgende standaardreeks van bees serum albumien (BSA) is voorberei:

Buis	1	2	3	4	5	6
[BSA] μg	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
μl BSA	0	2	4	6	8	10
μl H_2O	10	8	6	4	2	0
Totale volume	10	10	10	10	10	10

3.5.2 Koolhidraatbepaling

'n Aangepaste metode van Dubois is gebruik vir hierdie bepaling. Die reaksie berus op die reaksie van fenol en swawelsuur met koolhidrate. Die reaksie gee 'n oranje kleur wat by 488nm gemeet kan word (Dubois *et al.*, 1956).

Fenol- 5g fenol is opgelos in 100ml gedistilleerde water vir die fenol reagens. Swawelsuur is onverdund gebruik. Die standaard oplossing was 'n 1mg/ml glukose oplossing wat 1:10 verdun word om die werkende oplossing van 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ te verkry.

Die volgende reeks is saamgestel:

Buis	1	2	3	4	5	6
Glukose μg	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
μl Glukose	0	2	4	6	8	10
μl H ₂ O	10	8	6	4	2	0
Totale volume	10	10	10	10	10	10

10 μl van die standaard en monster is in aparte Eppendorfbuisies geplaas waarby 50 μl swawelsuur en 10 μl fenolreagens gevoeg is. Die mengsel is dan gemeng en gelaat om vir 10 minute te staan waarna dit vir 15 minute by 25 °C geïnkubeer is. Die absorbansie is dan by 488nm gelees.

3.6 Kritiese miselkonsentrasie (CMC)

Die surfaktante is in verskillende konsentrasies opgelos. Die oppervlakspanning van die water is dan bepaal met behulp van 'n Du Noüy Tensiometer (C655607) en vergelyk met die van 'n surfaktant en water mengsel. Die konsentrasie waar die oppervlakspanning nie meer afneem soos die konsentrasie toeneem is die CMC. Die volgende reeks is saamgestel:

Buis	1	2	3	4	5	6
Surfaktant ml	6	3	1.5	0.75	0.375	0.186
Konsentrasie $\mu\text{g/ml}$	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031
H ₂ O	0	3	4.5	5.25	5.625	5.814
Volume	6	6	6	6	6	6

3.7 Karakterisering van surfaktante

3.7.1 pH stabiliteit

Om die pH van die water in te stel is 0.1 N HCl en NaOH gebruik. Die pH van die water waarin die surfaktant opgelos is, is vooraf ingestel. Die surfaktant is dan bygevoeg waar na die pH weer gemeet is en ooringestel is indien nodig. Die oppervlakspanning is dan gemeet. Die invloed van pH is bepaal vanaf pH 1 tot 11.

3.7.2 Temperatuur stabiliteit

Surfaktante by hul onderskeie CMC's is vir 15 minute aan 'n temperatuur blootgestel waarna die oppervlakspanning gemeet is. Die volgende temperature is toegepas: 25, 40, 60, 80, 100 en 120 °C

3.7.3 Stabiliteit by verskillende NaCl-konsentrasies

Die surfaktante is opgelos by hul onderskeie CMC's waarna verskillende konsentrasies sout bygevoeg is en die oppervlakspanning gemeet is. Die konsentrasies was onderskeidelik 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20% en 25%.

3.8 Chemikalieë en reagentse

Alle glasware is voor gebruik gesteriliseer by 121 °C en 120 Kpa. Alle reagentse was van standaard laboratoriumgraad.

Hoofstuk 4

Resultate

4.1 Isolering van bakterieë

In 'n gepaardgaande studie ten opsigte van die produksie van polihidroksie alkanoate (PHA's) (Eksteen, 2000) is bakterieë wat baie skuim gevorm het waargeneem. Die organismes is op Sabutol en Propylol gegroei, die organismes is in hierdie studie getoets vir biosurfaktant produksie.

In die bogenoemde studie is daar aanvanklik vyf en vyftig organismes vanaf die verskillende koolstofbronne geïsoleer. Sabutol en Propylol is as koolstofbronne gebruik vir isolering van die organismes. Dit is gedoen omdat Ethylol op daardie stadium nog nie aan ons beskikbaar was nie maar in latere eksperimente is egter gevind dat Sabutol die groei van die organismes inhibeer. Sabutol is toe vervang met Ethylol, maar laasgenoemde is egter nie gebruik vir die oorspronklike isolering van organismes nie maar slegs in die latere eksperimente. 'n Beskrywing van die organismes word in Bylaag A gegee. Die meerderheid van die organismes was Gram-negatief en die enkele Grampositiewes wat wel geïsoleer is, het baie swak gegroei op al die koolstofbronne. Die organismes is aanvanklik deeglik gesuiwer deur die enkel kolonies drie maal uit te stryk op agarplate. Gramkleuring is na elke uitstryking gedoen en die kolonie tekstuur is ook na elke stap vergelyk met die wat in vorige uitstrykings verkry is. Die uitstryking is vir die res van die studie gereeld herhaal, en is dan opgevolg met Gramkleuring en vergelyking van kolonie tekstuur en kleur.

4.2 Seleksie en Identifikasie van Organismes

Drie organismes is geselekteer op grond van sigbare skuimvorming in die groeimedium en is onderskeidelik 5, 6 en k genoem. Organisme k is nie uit die oorspronklike grondmonster geïsoleer nie maar is 'n kontaminant wat op een van die plate waargeneem is en getoets is vir die produksie van PHA's. Dit het egter nie PHA's vervaardig nie maar het wel beduidende skuimvorming getoon tydens groei op die uitvloeisels as koolstofbronne.

Nie een van die organismes kon volledig geïdentifiseer word nie. Die eksperimente is herhaal en nie een keer kon die organismes met die Biologstelsel geïdentifiseer word nie. Dit moet egter genoem word dat al drie die organismes tydens die eksperiment en herhaling daarvan dieselfde patroon van kleurverandering getoon het. Al drie die organismes is oksidase positief, Gramnegatief, basille en gee 'n alkaliese reaksie met TSI. Organisme 5 is deur Biolog as *Photobacterium logei* geïdentifiseer maar hierdie organisme is egter vibriovormig, wat nie ooreenstem met die resultate van verskeie mikroskopiese ondersoeke van organisme 5 nie. *P. logei* is ook veronderstel om lig af te gee maar dit kon ook nie waargeneem word nie. Indien die organisme egter oksidase negatief was sou die identifikasie *Acinetobacter calcoaceticus* wees, organisme 5 kan moontlik 'n mutant van hierdie organisme wees. (Die inligting is verkry uit die Biolog-databasis). Organismes 6 en k kon nie met die Biolog-stelsel geïdentifiseer word nie. Die organismes is dus nie op die databasis nie en kan moontlik nuwe organismes wees wat nog nie voorheen in enige literatuur bespreek is nie. Die verder identifikasie van die organismes is egter buite die reik van die studie.

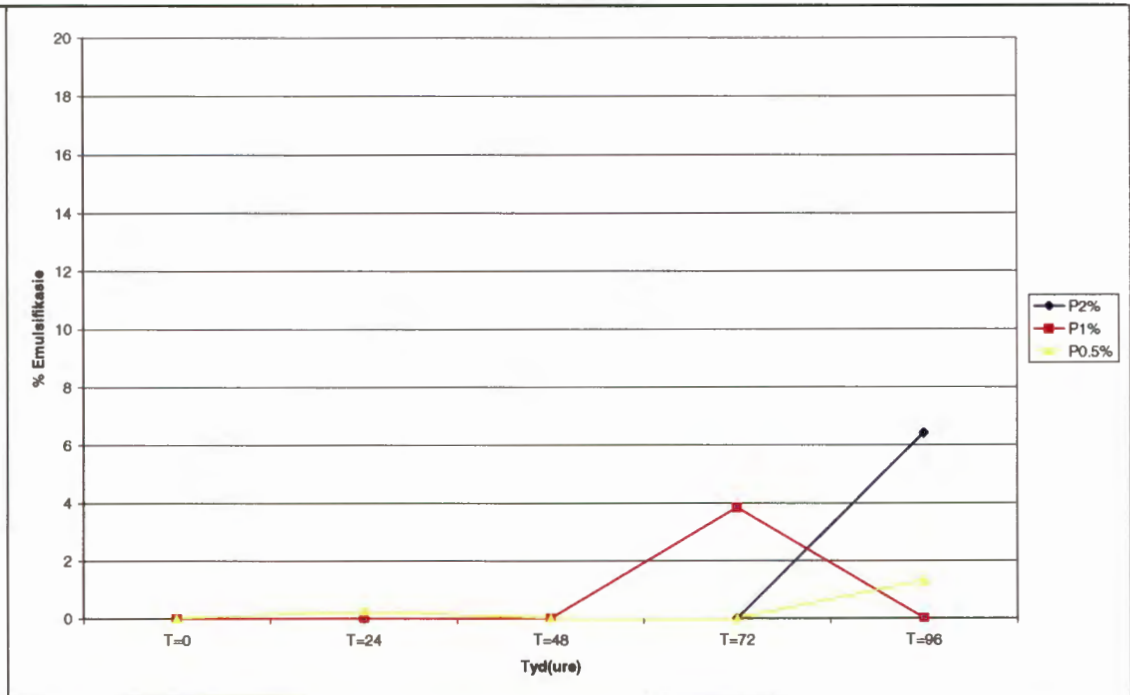
4.2.1 Emulsifikasie indeks

Biosurfaktantproduksie is bestudeer met beide die minimale medium en *Pseudomonas* PHB-medium aangesien skuimvorming in albei waargeneem is.

In albei die media is Propylol, Ethylol en 'n 1:1 Propylol-Ethylol-mengsel as koolstofbron gebruik. Die koolstofbronne is in albei media by konsentrasies van 0.5%, 1% en 2% getoets deur die emulsifikasie van paraffien deur die selvrye groeimedium na elke 24 uur van groei te toets. Dit is gedoen om die hoogste konsentrasie van die uitvloeisel in die media waarby die bakterieë groei te bepaal, die beste medium vir surfaktant-produksie te selekteer en te bepaal na hoeveel ure biosurfaktant-produksie in die medium die hoogste is. Die eksperiment is gedoen soos beskryf in 3.3.1 en is twee keer uitgevoer waarna die gemiddeld van die emulsifikasie aktiwiteit bereken is. Die gemiddelde waardes is gebruik om die inligting grafies voor te stel.

4.2.1.1 Minimale medium

Die oorspronklike data van hierdie eksperiment word in Bylaag C gegee. Organisme 5 met Propylol as koolstofbron se hoogste lesing van die emulsifikasie-indeks was 6,4% vir organisme 5 (figuur 4.1) by 'n Propylol konsentrasie van 2% na 96 ure. Met 1% Propylol is die meeste emulsifikasie-aktiwiteit na 72 gemeet uur waar dit 3.8% bereik. Die emulsifikasie-aktiwiteit by 0.5% Propylol vir die organisme piek op 1.3% na 96 uur. Met Propylol as enigste koolstofbron kan gesien word dat organisme 5 baie minder surfaktant vorm by die laer konsentrasies van die koolstofbron. Daar is geen spesifieke patroon waarvolgens die emulsifikasie-aktiwiteit by die verskillende koolstofbronne waargeneem is nie maar dit lyk tog asof dit na lang inkubasie tye voorkom.



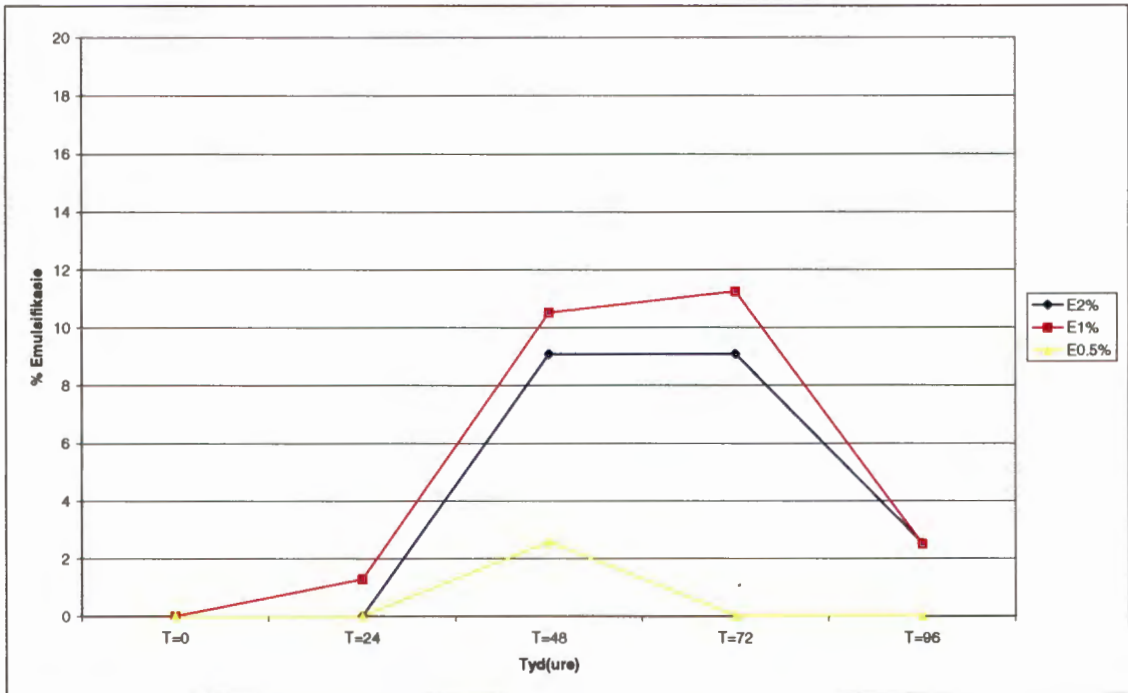
FIGUUR 4.1

DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME 5 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET PROPYLOL AS KOOLOSTOFBRON.

Die sleutel se betekenis is P2%: Propylol by 'n konsentrasie van 2%; P1%: Propylol by 'n konsentrasie van 1%; P0.5%: Propylol by 'n konsentrasie van 0.5%

Met Ethylol as enigste koolstofbron word die hoogste emulsifikasie-aktiwiteit van 11.3% waargeneem na 72 uur by 'n konsentrasie van 1% (kyk figuur 4.2). Die emulsifikasie-aktiwiteit na 48 uur by dieselfde konsentrasie is nie veel laer by 10.5% nie. Dit wil dus lyk asof die organisme maksimum emulsifikasie-aktiwiteit vertoon tussen 48 uur en 72 uur by die konsentrasie. Dieselfde kan gesien word by 'n Ethylol-konsentrasie van 2% waar die maksimum emulsifikasie-aktiwiteit van 9.1% waargeneem word na 48 uur dit bly konstant tot by 72 uur waarna dit weer afneem. By 'n Ethylol-konsentrasie van 0.5% word baie min emulsifikasie-aktiwiteit waargeneem, dit piek na 48 uur met 2.6% emulsifikasie-aktiwiteit. Daar is egter 'n patroon in die grafiek te sien, met geen of baie min emulsifikasie-aktiwiteit by 24 uur styg die emulsifikasie-aktiwiteit skerp tot by 48 uur by die hoër konsentrasies (1% en 2%) waarna dit konstant bly tot by 72 uur waarna dit afneem. Daar kan dus gesien word

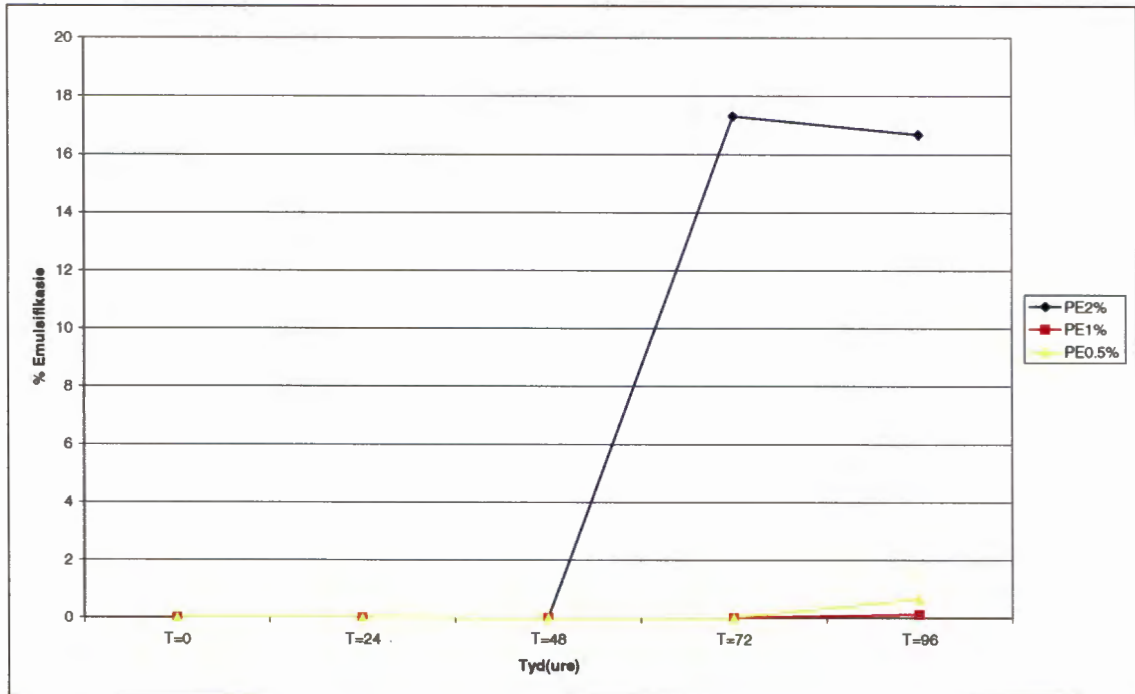
dat beter emulsifikasie-aktiwiteit by die twee hoër konsentrasies van die uitvloeisel voor kom.



FIGUUR 4.2
DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME 5 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET ETHYLOL AS KOOLSTOFBRON.
 Die sleutel het die dieselfde betekenis as in figuur 4.1 maar die koolstofbron is Ethylol en die E staan dus vir Ethylol.

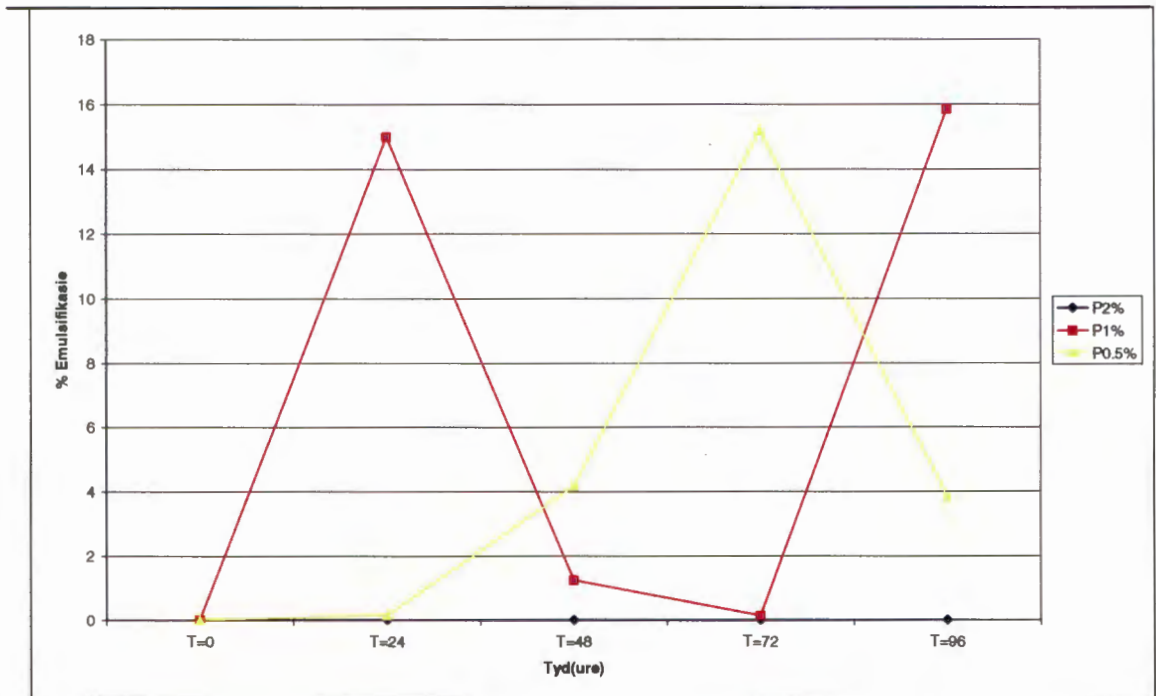
Figuur 4.3 toon die emulsifikasie-aktiwiteit van organisme 5 met 'n 1:1-mengsel van Propylol en Ethylol. By 'n konsentrasies van 2% piek die emulsifikasie-aktiwiteit na 72 uur met emulsifikasie-aktiwiteit van 17.3%, dit bly konstant tot by 96 uur waar dit 16.7% bereik. Geen noemenswaardige emulsifikasie-aktiwiteit kan by die laer konsentrasies gesien word nie. In figure 4.1-3 kan duidelik gesien word dat organisme 5 meer surfaktant produseer by hoër konsentrasies van die koolstofbron. Daar is egter geen vaste patroon in die verband tussen surfaktant-produksie en uitvloeisel-konsentrasie is waargeneem nie. In figure 4.2 kan gesien word dat die maksimum emulsifikasie verkry is by 'n konsentrasie van 1% Ethylol in 4.3 by 'n 2% konsentrasie van die mengsel van die koolstofbronne. Aangesien die mengsel by 'n konsentrasie van 2% 'n effektiewe konsentrasie van 1% Ethylol bevat

blyk daar 'n tendens te wees by die organisme om optimaal surfaktante te produseer by 'n konsentrasie van 1% Ethylol.



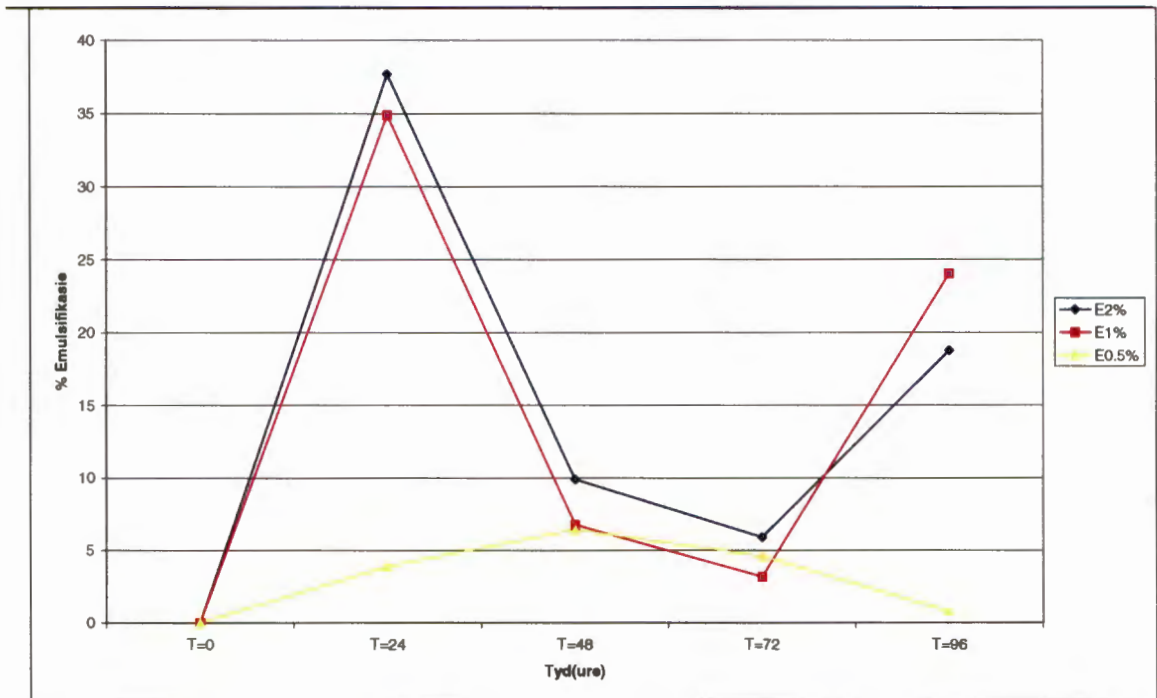
FIGUUR 4.3
DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME 5 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N PROPYLOL/ETHYLOL-MENGSSEL AS KOOLSTOFBRON.
 Die sleutel het dieselfde betekenis as in figuur 4.1 maar die koolstofbron is 'n 1:1 Propylol/Ethylol-mengsel en die PE staan dus daarvoor.

Figuur 4.4 toon die emulsifikasie-aktiwiteit van organisme k met Propylol as koolstofbron. Die hoogste emulsifikasie-aktiwiteit word waargeneem by 'n konsentrasie van 1 % na 96 uur. Daar is egter ook 'n piek in emulsifikasie aktiwiteit na 24 uur waarna die emulsifikasie-aktiwiteit daal en dan weer styg tot by 96 uur. By 'n konsentrasie van 0.5% piek die emulsifikasie-aktiwiteit by 72 uur waarna dit weer afneem tot by 96 uur. Geen emulsifikasie-aktiwiteit is waargeneem by 'n konsentrasie van 2% Propylol nie.



FIGUUR 4.4
DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME K OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N PROPYLOL AS KOLSTOFBRON.
 Die sleutel het dieselfde betekenis as in figuur 4.1

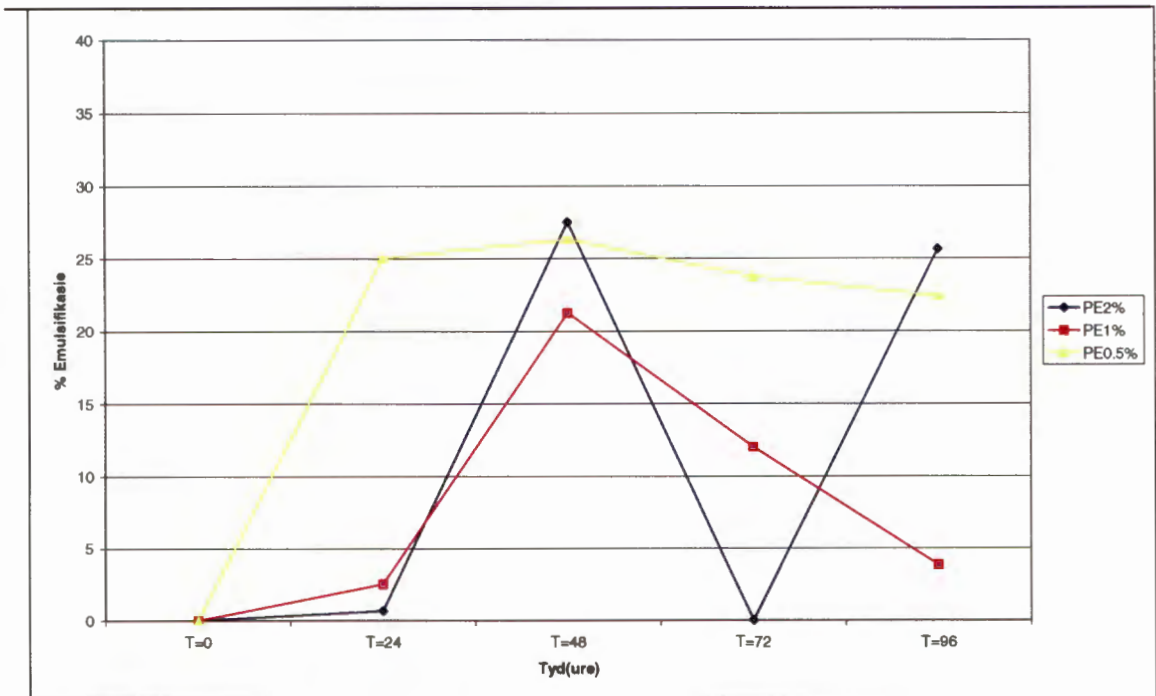
In die geval van organisme k word met Ethylol as koolstofbron 'n baie hoër emulsifikasie-aktiwiteit waargeneem as met Propylol. Die aktiwiteit piek met 37.7% na 24 uur as 2% Ethylol gebruik word waarna die emulsifikasie-aktiwiteit afneem en weer 'n piek maak na 96 uur. By 'n konsentrasie van 1% Ethylol kan dieselfde patroon gesien word waar die emulsifikasie-aktiwiteit piek met 34.9% en dan weer afneem en dan weer piek na 96 uur. By 'n Ethylol-konsentrasie van 0.5% is die emulsifikasie-aktiwiteit baie laer as by die hoër konsentrasies. Die hoogste emulsifikasie-aktiwiteit van 6.4% word gesien na 48 uur waarna dit stadig afneem. Daar word geen tweede piek waargeneem by hierdie konsentrasie nie.

**FIGUUR 4.5**

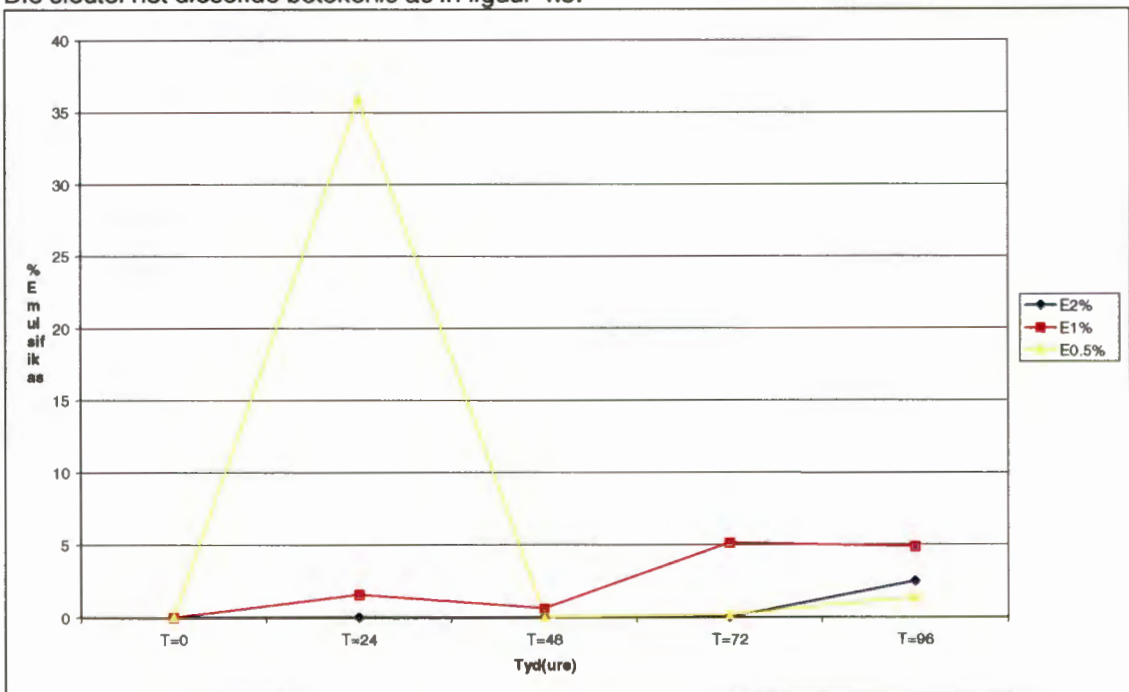
DIE EMULSIFIKASIE-AKTIVITEIT VAN ORGANISME K OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N ETHYLOL AS KOOLSTOFBRON.

Die sleutel het dieselfde betekenis as in figuur 4.2

Die resultate met 'n Propylol/Ethylol-mengsel van 1:1 van organisme k word in figuur 4.6 gegee en hivolgens is die hoogste emulsifikasie-aktiwiteit nl. 27.5% waargeneem by 'n konsentrasie van 2% na 48 uur vir organisme k. Die emulsifikasie-aktiwiteit daal dan by 72 uur en styg dan weer tot by 96 uur. By 'n konsentrasie van 1% piek die emulsifikasie-aktiwiteit na 48 uur met 'n emulsifikasie-aktiwiteit van 21.3% waarna dit afneem tot 12% na 72 uur en dan verder afneem tot 3.8% na 96 uur. By 'n konsentrasie van 0.5% styg die emulsifikasie-aktiwiteit tot 25% by 24 uur, dit styg dan effens verder tot 26.3% na



FIGUUR 4.6
DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME K OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N 1:1
PROPYLOL/ETHYLOL-MENGSSEL AS KOOLSTOFBRON.
 Die sleutel het dieselfde betekenis as in figuur 4.3.

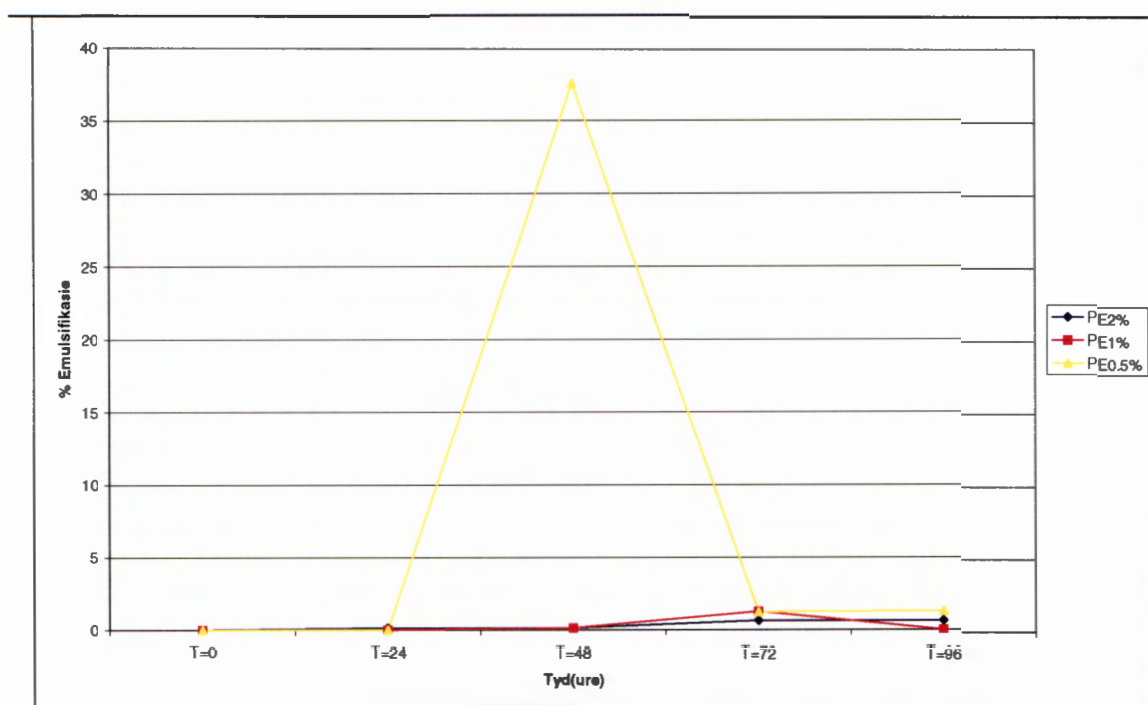


FIGUUR 4.7
DIE EMULSIFIKASIE-AKTIWITEIT VAN ORGANISME 6 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N ETHYLOL AS
KOOLSTOFBRON.
 Die sleutel het dieselfde betekenis as in figuur 4.2.

48 uur. By 72 uur neem dit effens af tot 23.8% waarna dit verder daal tot 22.4% by 96 uur. By die hoër konsentrasies van die koolstofbron piek die emulsifikasie-aktiwiteit by 48 uur. By 0.5% koolstofbron piek dit by 24 uur en bly dan redelik konstant.

Met Propylol as koolstofbron word geen emulsifikasie-aktiwiteit bo 1% waargeneem vir organisme 6 nie (Data nie gegee nie). Met 'n 1:1 Propylol/Ethylol-mengsel (kyk figuur 4.8) word byna geen emulsifikasie-aktiwiteit waargeneem by konsentrasies van 1 en 2% nie. By 'n konsentrasie van 0.5% word daar egter 'n aktiwiteit van 37.5% waargeneem na 48 uur waarna dit skerp afneem by 72 uur.

In figuur 4.7 kan gesien word dat baie lae emulsifikasie-aktiwiteit vir organisme 6 voorkom by die hoë konsentrasies van Ethylol. By 'n konsentrasies van 2% word die eerste emulsifikasie-aktiwiteit eers na 96 uur verkry, nl. 2.5%. By 'n konsentrasie van 1% is daar baie lae emulsifikasie-aktiwiteit vanaf 24 tot 48 uur waarna dit effens styg en piek by 72 met emulsifikasie-aktiwiteit van 5.1% waarna dit weer afneem tot 4.9% na 96 uur. By 'n konsentrasie 0.5% word 'n piek van 36% waargeneem na 24 uur. Dit is ook die hoogste emulsifikasie-aktiwiteit vir die organisme met Ethylol. Die emulsifikasie-aktiwiteit neem dan skerp af tot 0% na 48 uur en styg dan effens na 72 uur en dan weer 'n bietjie na 96 uur. Die aktiwiteit is egter baie laag in vergelyking met die wat verkry is na 96 uur.



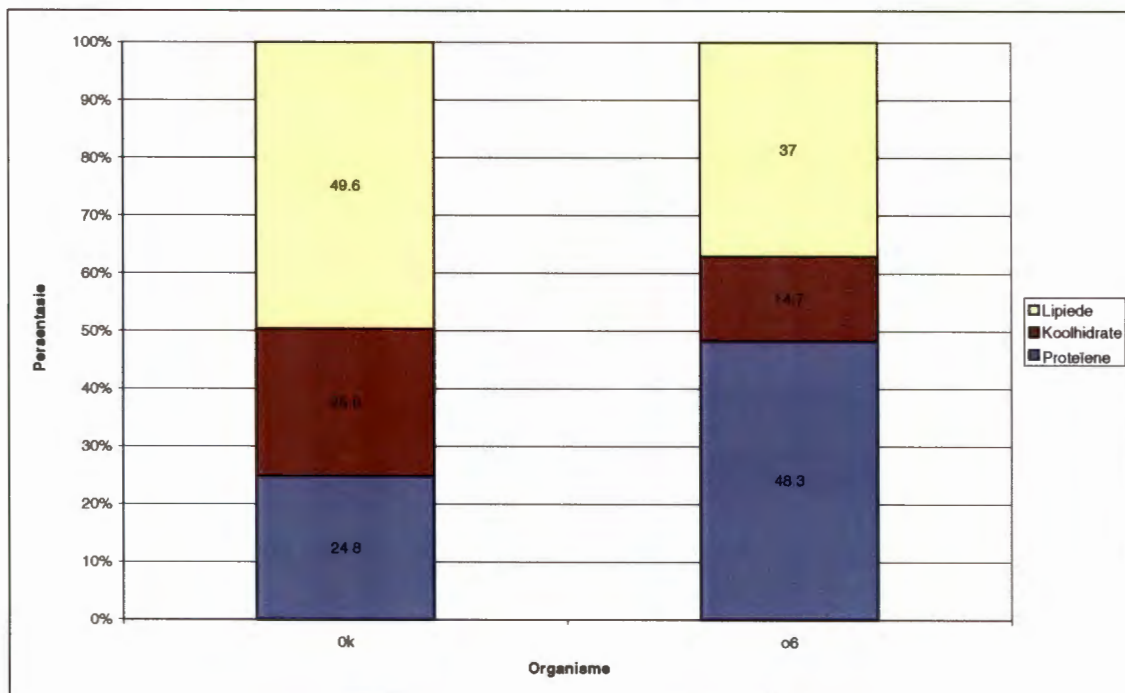
FIGUUR 4.8
DIE EMULSIFIKASIE-AKTIVITEIT VAN ORGANISME 6 OOR 'N TYDPERK VAN 96 UUR MET 'N PROPYLOL: ETHYLOL-MENGSEL AS KOOLSTOFBRON.
 Die sleutel het dieselfde betekenis as in figuur 4.2.

4.3 Karakterisering van surfaktante

Uit die voorafgaande eksperimente is organisme k en 6 gekies op grond van die mate van emulsifikasie van paraffien. Albei is in minimale medium gekweek. Organisme k het die beste emulsifikasie-aktiwiteit vertoon met 2% Ethylol as koolstofbron oor 'n tydperk van 24 uur (figuur 4.5). Die organisme is op groter skaal (1L) gekweek en 0.253g surfaktant is geïsoleer. Organisme 6 het die beste opbrengs getoon met die 1:1 Propylol: Ethylol-mengsel (PE2%) na 48 uur (figuur 4.6), en na grootskaalse kweking (1L) is 0.686g surfaktant geïsoleer. Alle verdere analyses is met die gesuiwerde materiaal gedoen.

4.3.1 Chemiese-analise

Die koolhidraat- en proteïeninhoud van die surfaktante is bepaal en die resultate word in figuur 4.9 gegee. Die koolhidraatinhoud van die surfaktante is onderskeidelik 0.147 g/g vir organisme 6 en 0.256 g/g vir organisme k en die proteïeninhoud vir die surfaktante is onderskeidelik 0.483g/g vir organisme 6 en 0.248 g/g vir organisme k. Die lipiedinhoud is teoreties bereken en waardes van 0.37g/g vir organisme 6 en 49.6 g/g vir organisme k is verkry. Die surfaktant van organisme k bevat bykans 50% lipiede en 25% proteïene en koolhidrate. Die surfaktant van organisme 6 bestaan hoofsaaklik uit proteïene (48%) en byna 15% koolhidrate en 37% lipiede.



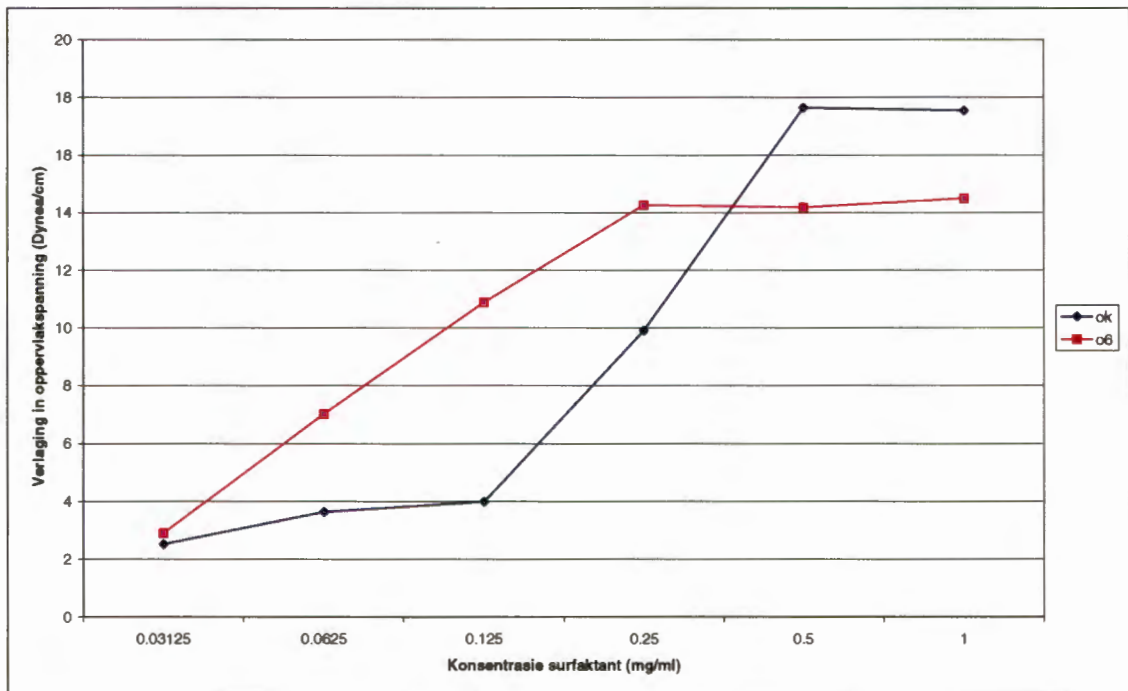
FIGUUR 4.9

CHEMIESE SAMESTELLING VAN DIE SURFAKTANTE.

Die figuur dui persentasie proteïene lipiede, koolhidrate en lipiede aan waaruit die surfaktante bestaan. Die lipiedwaarde is 'n teoretiese waarde.

4.3.2 Kritiese miselkonsentrasies (CMC)

Die definisie vir die kritiese miselkonsentrasie is daardie konsentrasie waar die aktiwiteit van die surfaktant optimaal is want by hoër konsentrasies word min of geen verdere verhoging in aktiwiteit waargeneem nie (kyk afdeling 1.5). Die CMC van albei surfaktante wat bestudeer is, kan uit die grafieke (figuur 4.10) afgelei word. Die aktiwiteit van organisme 6 neem byna lineêr toe soos die konsentrasie van die surfaktant styg. By 'n konsentrasie van 0.25mg/ml stabiliseer dit egter en die oppervlakspanning word nie verder verlaag by hoër konsentrasies van die surfaktant nie. Die aktiwiteit van organisme k se surfaktant neem aanvanklik eers stadig toe waarna dit skerp begin styg en die maksimum verlaging in oppervlakspanning bereik by 'n konsentrasies van 0.5 mg/ml surfaktant.



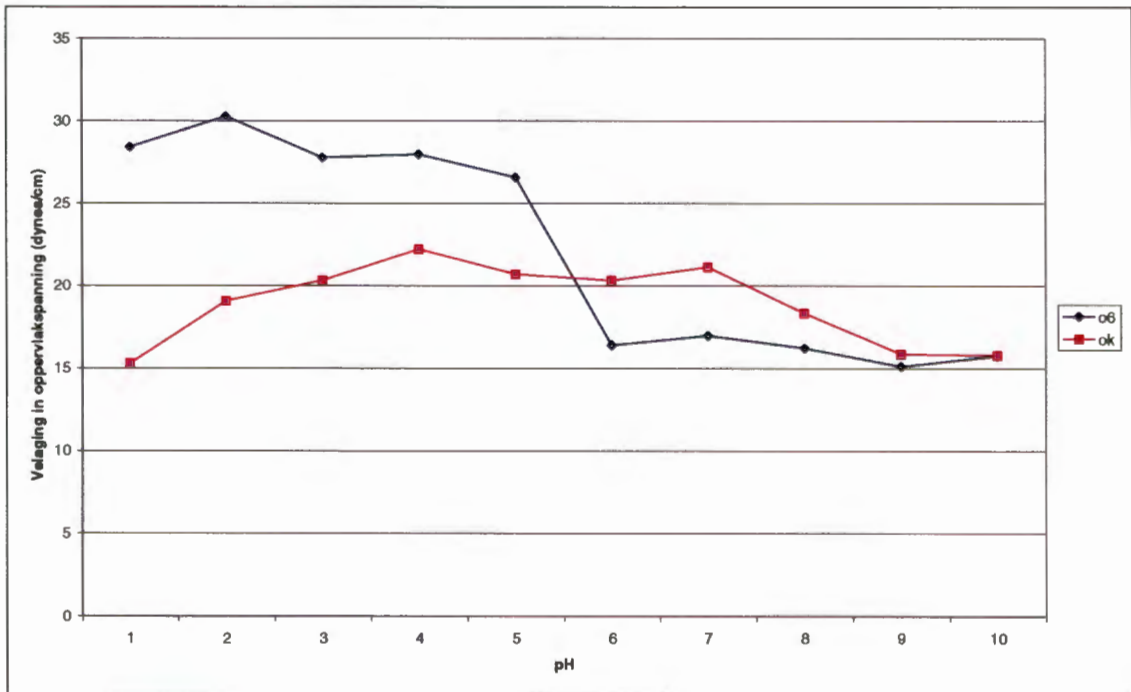
FIGUUR 4.10

KRITIESE MISELKONSENTRASIE.

Die oppervlakspanning van gedistilleerde water is telkens afgetrek van die waarde wat vir die onderskeie konsentrasies biosurfaktant verkry is.

4.3.3 pH

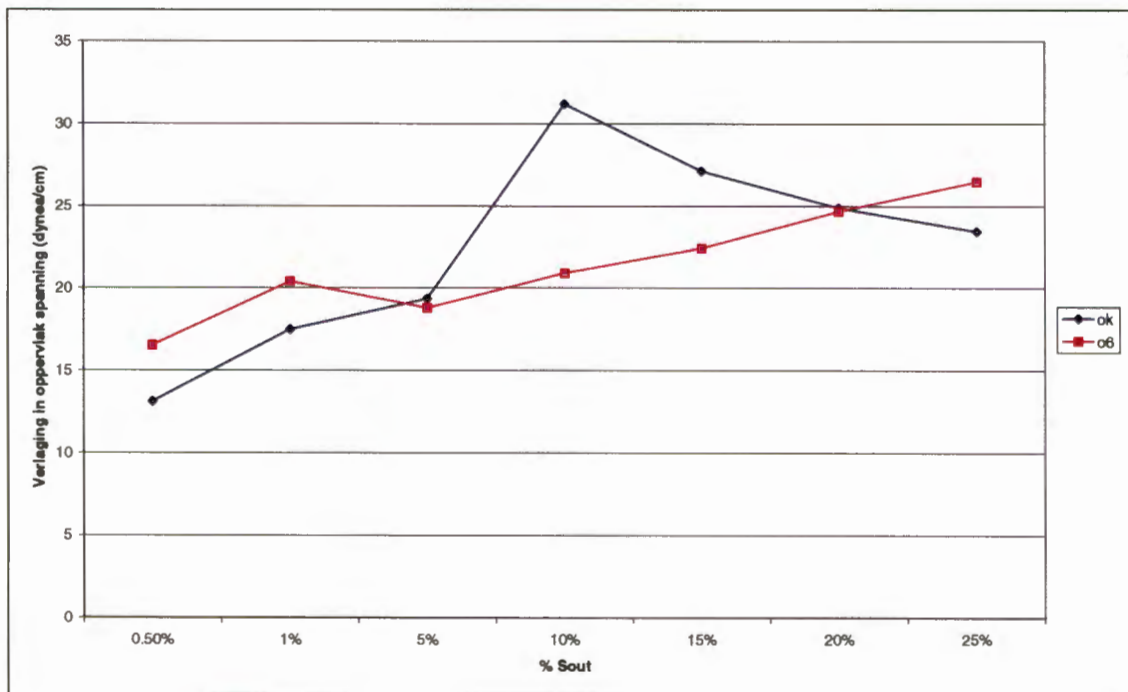
Die pH van die surfaktant-oplossing het 'n merkbare effek op die surfaktant-aktiwiteit. Figuur 4.11 dui die verlaging in oppervlakspanning aan wat bereken is deur die oppervlakspanning van gedistilleerde water (waarvan die pH met NaOH of HCl ingestel is) te meet. Die oppervlakspanning van die surfaktant by die spesifieke pH is dan gemeet. Die waarde van die surfaktant by die spesifieke pH is dan afgetrek vanaf die waarde van water by hierdie pH en dit gee dan die verlaging in oppervlakspanning. Volgens die resultate wat verkry is, kan gesien word dat organisme 6 se surfaktant die oppervlakspanning die beste verlaag by 'n pH van 2. Dit neem dan geleidelik af tot by pH 5 waarna dit skerp daal tot by pH 6 en vertoon dan 'n meer konstante oppervlak-aktiwiteit by hoër pH's. Die surfaktant van organisme k funksioneer optimaal by pH 4, en goed tussen pH 4 en pH7. Die aktiwiteit neem stadig af indien die pH hoër of laer as die waardes is.



FIGUUR 4.11
INVLOED VAN PH OP SURFAKTANT-AKTIWITEIT.
DIE FIGUUR DUI DIE VERLAGING IN OPPERVLAKSPANNING AAN BY SPESIFIEKE PH'S

4.3.5 NaCl

Figuur 4.12 toon die effek van NaCl-konsentrasie op surfaktant-aktiwiteit. Die aktiwiteit is bereken deur die oppervlakspanning van water waarin 'n sekere hoeveelheid sout opgelos is te meet en dan die oppervlakspanning van die konsentrasie sout in water waarby die surfaktant gevoeg is te meet. Die oppervlakspanning van die surfaktant/sout-mengsel word dan afgetrek van die oppervlakspanning van die water/sout-mengsel met dieselfde konsentrasie sout in as die surfaktant-mengsel om die verandering in oppervlakspanning te gee. Soos gesien kan word, styg die aktiwiteit aanvanklik vir albei surfaktante.



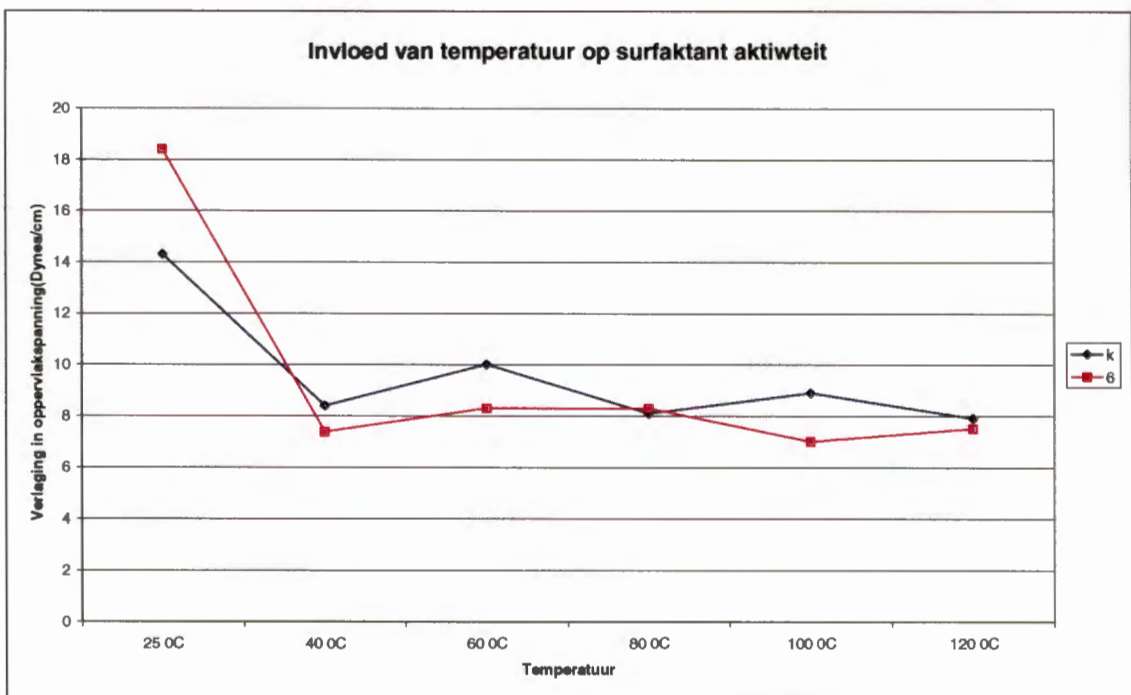
FIGUUR 4.12
INVLOED VAN SOUT OP SURFAKTANT-AKTIWITEIT.

Die surfaktant van organisme k bereik maksimum aktiwiteit by 'n konsentrasie van 10% NaCl waar dit die oppervlakspanning met meer as 30 Dynes/cm verlaag maar by die hoër konsentrasies neem die aktiwiteit stadig af. Die

aktiwiteit van die surfaktant van organisme k by 25% NaCl is egter nog steeds hoër as by enige konsentrasie sout onder 5%. Die surfaktant van organisme 6 se aktiwiteit neem saam met die NaCl-konsentrasie toe en die aktiwiteit is die hoogste by 'n konsentrasie van 25% NaCl.

4.3.6 Temperatuur

Figuur 4.13 toon die invloed van temperatuur op die aktiwiteit van die surfaktante. Die surfaktant van organisme 6 se aktiwiteit neem skerp af by 40°C maar bly dan konstant tot by die boonste punt van die temperatuurreeks, nl. 120°C. Die aktiwiteit is minder as die helfte wat dit by 25°C was. Die invloed van temperatuur op die aktiwiteit van organisme k se surfaktant is byna dieselfde. Daar is 'n skerp daling in aktiwiteit by 40°C waarna die aktiwiteit op die laer vlak stabiliseer.



FIGUUR 4.13
INVLOED VAN TEMPERATUUR OP SURFAKTANT-AKTIWITEIT.

4.4. Samevatting

In hierdie hoofstuk is die isolering van drie bakterieë beskryf wat biosurfaktante vanaf organiese uitvloeisels produseer. Twee van hierdie surfaktante is op grootskaal berei en hulle is gedeeltelik gekarakteriseer. In die volgende hoofstuk word die resultate van hierdie studie bespreek.

Hoofstuk 5 Bespreking

5.1 Inleiding

Die doel van hierdie studie was om te bepaal of spesifieke industriële organiese uitvloeisels deur bakterieë gebruik kan word om nuttige produkte te produseer. Die aanvanklike produk wat ondersoek was, was polihidroksiealkanoate (PHA). Tydens hierdie studie is daar egter 'n beduidende hoeveelheid skuim op die oppervlakte van die groeimedia van 'n paar organismes waargeneem wat die vermoede laat ontstaan het dat hulle surfaktante mag produseer. Omdat die aanvanklik gekose bakterieë baie klein hoeveelhede PHA's geproduseer het, is hierdie studie verder toegespits op die karakterisering van die geproduseerde biosurfaktante.

5.2 Seleksie van bakterieë

'n Interessante verskynsel kom na vore wanneer daar na die eienskappe van die geïsoleerde organismes gekyk word (bylaag A). Die meeste organismes is Gram-negatiewe kokke of basille en daar is waargeneem dat die enkele Gram-positiewe organismes wat wel geïsoleer is nie goed op die koolstofbronne groei nie. Die organismes wat op grond van skuimvorming vir hierdie studie gekies is, kon egter nie volledig geïdentifiseer word nie (kyk afdeling 4.2).

5. 3 Karakterisering van surfaktante

5.3.1 Emulsifikasie van paraffien

Emulsifikasie aktiwiteit is gemeet in twee verskillende groeimedia en verskillende konsentrasies van die industriële-uitvloeisel as koolstofbron. Die doel hiervan was:

1. Om te bepaal watter organismes surfaktant(e) produseer
2. Om te bepaal of die surfaktant vanaf 'n spesifieke koolstofbron vervaardig kan word.
3. Die invloed van die 2 verskillende media te toets (kyk afdeling 3.1.2)
4. Die optimum konsentrasies van die koolstofbron te bepaal.
5. Die beste inkuberingstyd te bepaal vir surfaktantproduksie.

Eerstens is dit duidelik dat organisme 5 'n swak surfaktant produseerder is en dit kan selfs moontlik wees dat die organisme geen surfaktant vervaardig nie. Daar kan ook met redelike sekerheid gesê word dat die medium 'n invloed het op die surfaktant-produksie deur organisme 6 en organisme k. Daar is net in die minimale medium redelike emulsifikasie aktiwiteit waargeneem (figure 4.1-8) en baie min in die *Pseudomonas* PHB –medium (resultate nie getoon nie). Wanneer daar na die samestelling (kyk afdeling 3.1.2) van hierdie media gekyk word, is daar twee moontlike verklarings vir hierdie verskynsel: die stikstofbron kan 'n invloed hê want minimale medium bevat NH_4Cl en die *Pseudomonas* PHB-medium bevat NH_4SO_4 . Dit is egter heel onwaarskynlik aangesien stikstof in albei gevalle voorsien word as NH_4^+ . Dit kan ook nie die invloed van chloried- of sulfaatione wees nie aangesien dit in beide media voorkom. Die konsentrasie van sulfaatione is egter hoër in minimale medium as in *Pseudomonas* PHB -medium en kan miskien 'n rol speel maar daar word nêrens in die literatuur melding daarvan in hierdie verband gemaak nie.

Die ander moontlikheid is dat die teenwoordigheid van FeSO_4 of MgSO_4 'n rol kan speel in die produksie van surfaktante deur die organismes. Volgens Cooper (1986) produseer *Bacillus subtilis* aanvanklik surfaktante waarna aktiewe groei plaasvind en die organisme kan 'n tweede keer surfaktant vanaf dieselfde medium produseer indien yster- of magnesuimsoute bygevoeg word. Die teenwoordigheid van die soute kon dus heel moontlik die produksie van surfaktante beïnvloed het.

Uit figure 4.1-8 kan duidelik gesien word dat organismes k en 6 relatief goeie produseerders van surfaktante is. Organisme k vertoon min emulsifikasie-aktiwiteit met Propylol as koolstofbron (figuur 4.4), matige aktiwiteit by 'n Propylol/Ethylol-mengsel by 'n konsentrasie van 0.5% (figuur 4.5) maar byna geen surfaktant by die hoër konsentrasies daarvan nie. Die emulsifikasie aktiwiteit is egter hoër by Ethylol-konsentrasies van 1-2% en weer laag by 0.5% (figuur 4.6). Dit wil dus lyk asof Propylol nie die produksie van surfaktante in die organisme stimuleer nie maar dit eerder inhibeer. Ethylol is dus die mees geskikte vir biosurfaktant-produksie van die koolstofbronne wat getoets is.

Wanneer organisme 6 in minimale medium gegroei word kan gesien word dat die organisme slegs in die teenwoordigheid van Ethylol (figuur 4.7) en 'n Propylol/Ethylol-mengsel (figuur 4.8) surfaktante vervaardig. Die emulsifikasie aktiwiteit wat met die Propylol/Ethylol-mengsel waargeneem word, is egter baie hoër as die met slegs Ethylol. Dit is ook net by lae konsentrasies van die koolstofbronne.

Die metode van Abu-Ruwaida *et al.* (1991) het keroseen as hidrofobiese laag vir die emulsifikasie gebruik, maar in hierdie studie is beligtings-paraffien gebruik. Dit maak dit dus moeilik om die resultate direk te vergelyk. Die eksperiment is uitgevoer om bakterieë wat surfaktante produseer, en die groeimedium te selekteer. Die emulsifikasie-aktiwiteit van die organismes is

onder al die toestande bepaal en die beste surfaktant-produseerders en medium kon geselekteer word.

5.3.2 Chemiese samestelling van die surfaktante

Die biosurfaktante is geïsoleer vanaf die selvrye medium deur koue asetoonpresipitasie. Die samestelling van die twee surfaktante verskil alhoewel albei hoofsaaklik uit lipiede bestaan: organisme 6 bevat byna 37% lipiede, 14% koolhidrate en 48% proteïen. Die surfaktant van organisme k bevat byna 50% lipiede, 25% koolhidrate en 24% proteïen (figuur 4.9). Die surfaktant-aktiwiteit kan in enige van die komponente wees, en selfs 'n kombinasie van al drie wees. Surfaktien bestaan byvoorbeeld uit L-aspartaam, L-glutamiensuur, L-valien, L-leusien, D-leusien en vetsure, surfaktien is dus 'n lipopetied en bestaan uit peptied- en vetsuur-komponente (Arima et al., 1968). Die samestelling van ander bekende surfaktante word in tabel 5.1 gegee.

Tabel 5.1
Die samestelling van ander surfaktante.

<i>Organisme/surfaktant</i>	<i>Proteïen</i>	<i>Lipied</i>	<i>Koolhidrate</i>	<i>Bron</i>
<i>Candida Lipolytica</i>	17%	0%	83%	Desai en Banat, 1997
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Manno-proteïen)	17%	0%	44%	Desai en Banat, 1997
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	19.6%	10%	50%	Desai en Banat, 1997

<p><i>Arthrobacter RAG1</i> Die spesifieke komponente van die surfaktant is bepaal en is soos volg:</p>	<p>D-glukosamien 20-30% Amino-uron-suur 33.3% Dus die proteïen inhoud is 53.3 –63.3%</p>	<p>15%</p>	<p>Zuckerberg <i>et al.</i> 1979</p>
---	--	------------	--------------------------------------

5.3.3 Kritiese miselkonsentrasie (CMC)

Die doel van hierdie deel van die studie was om die konsentrasie waarby die surfaktante optimaal funksioneer te bepaal. Hierdie inligting is noodsaaklik vir die eksperimente wat volg aangesien dit by die CMC gedoen moet word. Die eksperiment gee ook 'n aanduiding van die effektiwiteit van die suiwer surfaktant deurdat dit aandui met hoeveel die oppervlakspanning verlaag word en hierdeur kan dit aandui of die surfaktant geskik is vir enige gebruik. Die oppervlakspanning word met ongeveer 17 dynes/cm verlaag deur die surfaktant van organisme k en 14 dynes/cm deur die van organisme 6. Die CMC vir organisme k is 0.5mg/ml en 0.25mg/ml vir organisme 6. Die aktiwiteit wat hier waargeneem word is nie baie hoog nie. Volgens Cooper (1986) moet die oppervlakspanning van water vanaf 72 dynes/cm tot onder 40 dynes/cm verlaag word voor die surfaktant in toepassings gebruik kan word, dit is 'n verlaging van 32 dynes/cm.

Die CMC van biosurfaktante is 10 – 40 maal laer as die van chemiese surfaktante en dit bring die hoë koste verbode aan biosurfaktante af aangesien minder van die produk benodig word om dieselfde effek te verkry (Desai en Banat, 1997). Ramnolipiede se CMC verskil dramaties van mekaar. Die ramnolipied van *Pseudomonas auruginosa* 44T1 se CMC is

11mg/liter maar *P. auruginosa* BOP 100 se CMC is 400mg/liter. Verskeie ander waardes word vir ander ramnolipiede in die literatuur gegee maar die is die twee uiterstes (Lang en Wullbrant, 1999). Die waardes wat in hierdie studie verkry is, is onderskeidelik 0.5 mg/ml vir organisme k se surfaktant wat hoër is as die hoogste vir ramnolipiede. Die surfaktant van organisme 6 se waarde is 0.25mg/ml wat laer is as die hoogste waarde wat vir ramnolipiede verkry is, maar baie hoër as die laagste CMC wat vir 'n ramnolipied verkry is.

Daar is probeer om die emulsifikasie aktiwiteit van die geïsoleerde surfaktante te meet, maar geen aktiwiteit deur enige van die twee kon waargeneem word nie. Die feit dat die surfaktant oppervlakspanning verlaag maar nie emulsifiseer soos wat met die selvrye groeimedium waargeneem nie is al waargeneem deur Star en Rosenberg (1983). Hulle het bevind dat sekere proteïene nodig is om surfaktante, wat wel die oppervlakspanning verlaag, instaat te stel om emulsifikasie aktiwiteit te toon.

In tabel 5.2 kan gesien word dat sommige surfaktante soos Surfaktien en die surfaktant van *Bacillus licheniformis* albei baie lae CMC-waardes het (onderskeidelik 24 μ M en 12 μ M). Ramnolipiede se CMC-waarde kan wissel tussen 11 en 400 mg/liter. Die lae CMC-waardes van die surfaktante maak dit meer ekonomies aangesien minder van die surfaktante nodig is om die oppervlakspanning te verlaag. Met die surfaktante wat in die studie gebruik is, is CMC-waardes verkry wat nie uitermate hoog is vir biosurfaktante nie maar dit is nie laag genoeg om dit te kan vergelyk met die van die beste biosurfaktante wat al verkry is nie.

5.4 Stabiliteit van surfaktante

5.4.1 NaCl-stabiliteit

Die oppervlakspanning van water word beïnvloed deur opgeloste stowwe. So is waargeneem dat hoë konsentrasies NaCl inaktiveer die glikolipiede van *Torulopsis apicola* en die produksie van surfaktante vanaf *Bacillus licheniformis* JF-2 verlaag dramaties in die teenwoordigheid van 10% NaCl maar dit word nie geaffekteer deur kalsiumsoute nie. Laasgenoemde produseer wel biosurfaktante onder aerobe en anerobe toestande in die teenwoordigheid van tot 8% NaCl (Rosenberg 1983).

Volgens resultate wat in hierdie ondersoek verkry is (figuur 4.12), is dit duidelik dat albei surfaktante beter aktiwiteit vertoon in die teenwoordigheid van NaCl. Die oppervlakspanning van water neem toe soos die NaCl-konsentrasie verhoog.

Die aktiwiteit van organismes 6 se surfaktant neem proporsioneel toe by NaCl-konsentrasies van 5% en hoër. Indien die oppervlakspanning van die surfaktant-mengsel met die van water vergelyk word, kan gesien word dat die laagste oppervlakspanning verkry word by 1% NaCl (figuur 4.12). Die surfaktant is dus sout-stabiel en die werking daarvan kan deur die teenwoordigheid van sout verhoog word.

Die verbetering van surfaktant-aktiwiteit deur soute is al voorheen waargeneem, deur Thimon *et al.* (1992). Daar is gevind dat die byvoeging van divalente en monovalente katione die miselvorming bevorder. Die teenwoordigheid van die katione in die medium het die vorm van die surfaktien molekule verander deur ion-surfaktieninteraksies wat dan vermoedelik die oppervlak-aktiewe eienskappe van die molekule verander.

Die aktiwiteit van surfaktant k verhoog namate die konsentrasie van sout toe neem maar slegs tot by 10% NaCl-konsentrasie. Horowitz *et al.* (1990) het gevind dat die surfaktant wat *Bacillus licheniformis* 86 produseer, stabiel is by 'n NaCl-konsentrasies van 0% to 30%.

5.4.2 pH-stabiliteit

Die surfaktante wat geïsoleer is, los albei goed op indien die pH van die water met HCl verlaag word. Dit presipiteer egter nie in 'n alkaliese omgewing nie. Volgens Desai en Banat (1997) kan suurpresipitasie ook gebruik word om surfaktante te isoleer. Aangesien die surfaktante meer oplosbaar word in 'n suur omgewing kan aangeneem word dat suurpresipitasie tydens hul bereiding nie in die geval sou werk nie.

Die surfaktant wat deur *B. licheniformis* 86 gevorm word, is stabiel vanaf pH 4 tot 13. Onder pH 4 neem die aktiwiteit af as gevolg van presipitasie (Horowitz *et al* 1990). *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 se Emulsan se aktiwiteit neem skerp af onder pH 4 en word toegeskryf aan die protonering van 'n moontlike karboksiel-groep. Die aktiwiteit neem ook skerp af bo 'n pH van 7 indien daar nie 'n divalente kation tenwoordig is nie (Zuckerberg *et al* 1979).

Anders as die *B. licheniformis* 86 surfaktant is albei die surfaktante wat geproduseer is aktief by lae pH's. Die vanaf organisme 6 funksioneer optimaal by 'n pH van 2. Die aktiwiteit neem effens af tot by pH 5 en vanaf pH 6 daal dit skerper maar bly relatief stabiel by 'n pH bo 6. Die surfaktant van organisme k werk die swakste by pH 1, toon 'n toename in aktiwiteit tot by pH 4 maar bly dan redelik stabiel tot by pH 7 waarna dit geleidelik daal tot by pH 10 (figuur 4.11).

Die aktiwiteit van die van die geïsoleerde surfaktante verdubbel by die optimale pH as dit vergelyk word met dit wat waargeneem word indien die surfaktant net in gedistilleerde water opgelos word.

Die surfaktant vanaf organisme 5 is egter redelik stabiel as dit vergelyk word met die surfaktant van organisme 6. Geen skielike afplating in aktiwiteit word waargeneem soos by die surfaktant van organisme k nie.

Die vermoë van die surfaktante om by lae pH's te funksioneer is uniek en geen ander biosurfaktante met hierdie eienskap kon in die beskikbare literatuur gevind word nie.

5.4.3 Temperatuur stabiliteit

Alhoewel albei die surfaktante 'n daling in aktiwiteit toon wanneer dit aan 'n temperatuur van 40°C blootgestel word neem die aktiwiteit daarvan egter nie verder af as die surfaktante aan hoër temperature blootgestel word nie. Indien die daling by 40°C buite rekening gelaat word, kan daar afgelei word dat die surfaktante ten minste temperatuur stabiel is tot by 120°C. Die afname in aktiwiteit maak die surfaktant egter minder bruikbaar in die industrie aangesien die meeste prosesse hitte stabiliteit vereis. Indien die surfaktant egter in 'n gebruik word in 'n omgewing waar temperature onder 40°C bly, sal dit nie 'n invloed hê op die aktiwiteit daarvan nie. Hierdie eienskap kan ook gebruik word om die aktiwiteit van die surfaktant gedeeltelik te vernietig indien dit ongewens sou wees in verdere stappe in 'n proses. In tabel 5.2 kan gesien word dat *Alasan* geaktiveer word as dit tot 100°C verhit word, en die *Rhodococcus* spesiese surfaktant bly stabiel tot by 120°C.

5.5 Samevatting

Een van die grootste bydraes wat Mikrobiologie aan die wêreld kan lewer is seker die produksie van nuttige produkte vanaf hernubare bronne, asook vanaf afval materiaal. Laasgenoemde omskep afval, 'n las vir die samelewing, in 'n nuttige produk en produkte wat verkry word, is meestal bio-afbreekbaar en nie toksies vir die omgewing nie. Dit gee aan ons 'n drievoudige voordeel: afvalprodukte word vernietig, 'n nuttige produk word verkry en dit is nie skadelik vir die omgewing en die mens nie.

In hierdie studie is 'n industriële organiese uitvloeisel ondersoek vir die produksie van biosurfaktante. Twee bakterieë is verkry wat surfaktante vervaardig het (tabel 5.2). Alhoewel hierdie surfaktante heelwaarskynlik nie geskik is vir industriële gebruik nie, kan ons met sekerheid sê dat hierdie toksiese industriële-uitvloeisel gebruik kan word vir die produksie van biosurfaktante. Dit kan selfs moontlik wees dat ander organismes in staat is om ander produkte van hierdie verbindings te vervaardig (Eksteen 2000). Die surfaktante wat verkry is, vertoon nie genoeg oppervlak-aktiwiteit om bruikbaar te wees nie aangesien die verlaging in oppervlakspanning nie die gewenste verlaging van 32 dynes/cm be-

Tabel 5.2

Eienskappe van surfaktante uit die literatuur in vergelyking met die eienskappe van die geïsoleerde surfaktante.

Organisme	CMC Mg l⁻¹	NaCl stabiliteit	PH	Temperatuur	Verlaging in oppervlak- spanning
<i>Torulopsis apicola</i> (Lin 1996)	-	Hoë konsentrasies NaCl inaktiveer surfaktant.	-	-	
<i>Bacillus licheniformus</i> (Lin 1996)	12 µM	Verhoog met 'n mag van een by 10% NaCl	Stabiel tussen pH.5.5 – 12	Stabiel tot by 75°C	44 dynes/cm (Desai en Banat, 1997)

Hoofstuk 5 Bespreking

<i>Pseudomonas spp.</i>	11 – 400 (Lang en Wullbrandt 1999)					
Rhamnolipiede						
<i>Bacillus subtilis</i>	24 µM					45 dynes/cm
Surfaktien						
Surfaktant van organisme 6	0.25 mg/ml	Aktiwiteit styg saam met die NaCl konsentrasie	Optimaal tussen pH1 – 5	Afname in aktiwiteit bo 40°C		14 dynes/cm
Surfaktant van organisme k	0.5 mg/ml	Aktiwiteit styg tot by 10% NaCl	Stabiel oor wye pH reeks	Afname in aktiwiteit bo 40°C		17 dynes/cm
<i>Bacillus licheniformis</i> 86		Stabiel by NaCl konsentrasies van 0% - 30%	Stabiel vanaf pH 4- 13 presipiteer by pH onder 4			40 dynes/cm
<i>Rhodococcus</i>		Die min verandering in aktiwiteit van biosurfaktant. Hoër konsentrasies verhoog die aktiwiteit van die surfaktant.	Geen merkbare invloed.	Stabiel tot by 120°C		38.2 dynes/cm
<i>Acinetobacter radioresistens</i> (Alasan)				Aktiwiteit verhoog 2.5–3 maal na verhitting by 100°C		
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG1(Emulsan)			Neem skerp af by pHs onder 4			

reik nie. Daar is ander biosurfaktante waarvan die oppervlak-aktiwiteit hoër is as die verlaging van 32 dynes/cm. 'n Goeie voorbeeld is Surfaktien (tabel 5.2) wat die oppervlakspanning met 45 dynes/cm verlaag.

Die pH-stabiliteit van die geïsoleerde biosurfaktante is egter goed en vertoon sekere unieke eienskappe van die surfaktante. Daar word geen surfaktant in die literatuur beskryf wat optimaal funksioneer by lae pH's nie (tabel 5.2), dit maak die vermoë van die surfaktant van organisme 6 uniek en stabiliteit van organisme k se surfaktant kan vergelyk word met die van die *Rhodococcus* spesie (tabel 5.2). Die meeste van die surfaktante wat in die literatuur beskryf word, is slegs aktief by 'n pH bo 5 maar geen afname in aktiwiteit by die hoër pH's soos vir organisme 6 se surfaktant, word in die beskikbare literatuur beskryf nie. Die CMC (tabel 5.2) is nie uitermate hoog vir 'n biosurfaktant nie alhoewel daar al verskeie biosurfaktante geïsoleer is met baie laer CMC-waardes. Die feit dat die opbrengs van die surfaktante nie baie hoog is nie tel egter saam met die CMC-waarde verder teen hierdie surfaktante vir die produksie en industriële toepassing daarvan.

As daar dus na die opbrengs en die CMC-waarde van die surfaktante gekyk word, kan daar gesê word dit nie ekonomies sal wees om die surfaktant te gebruik in 'n industriële toepassing nie. Die NaCl-stabiliteit is goed in vergelyking met die in die literatuur maar ander biosurfaktante met soortgelyke eienskappe is al gekry bv. *Bacillus licheniformis* 86. Die temperatuur stabiliteit van die surfaktante is nie baie goed as dit vergelyk word met die in tabel 5.2 nie. Die aktiwiteit van Alasan verhoog byvoorbeeld drasties indien dit verhit word en die surfaktant van die *Rhodococcus* is stabiel tot by 120 °C.

Die doel van hierdie studie is grootliks bereik aangesien aangetoon is dat hierdie organiese uitvloeisels wel deur bakterieë benut kan word om nuttige produkte te sintetiseer. Ten einde 'n industrieel nuttige surfaktant ekonomies te kan vervaardig, sal beter produseerders as wat in hierdie studie verkry is, bekom moet word; dit kan bereik word deur verdere seleksie en moontlik genetiese manipulerings.

Bronnelys

ABU-RAWAIDA, A.S., BANAT, I.M., HADITIRTO, S., SALEM, A., en KADRI, M. 1991. **Acta Biotechnology**, 11(4):315-324.

ARIMA, K., KAKINUMA, A., en TAMURA, G. 1968. Surfactin a cristilline peptidelipid produced by *Bacillus subtilis*: isolation characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 31(3): 488-494.

ATLAS, R.M. 1996. **Principles of Microbiology 2'd edition**. Mcgraw-Hill. Boston Massachusetts

ATLAS, R.M., en PARKS L.C. 1993 **Media for Microorganisms**, CRC Press, Boca Raton.

BAR-NESS, R., AVRAHMY, N., MATSUYAMA, T., en ROSENBERG, M., 1988. Increased cell surface hidrophobicity of a *Serratia marcescens* NS 38 mutant lacking wetting activity. **Journal of Bacteriology**, 170: 4361-4364.

BANAT, I.M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation:a review. **Bioresource Technology**, 51:1-12.

BABU, P.S., VAIDYA, A.N., BAL, A.S., KAPUR, R., JUWARKAR, A., en KHANNA, P. 1996. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial waste. **Biotechnology Letters**, 18(3):263 – 268.

BOCK, K.J., DAUM, K.A., MERIAN, E., NEWLAND, L.W., PEARSON, C.R., STACHE, H., en ZANDER, M. 1982. **Anthropogenic Compounds**, Springer- Verlag, Berlin, 163-199.

BOTES, S. 1998. **Isolation and characterisation of biosurfactant-producing bacteria from oil contaminated sources**, M.Sc-verhandeling PU vir CHO.

BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J., en PARKER, J. 1994. **Biology of Microorganisms**. Prentice Hall Engelwood Cliffs New Jersey 785

CAMEOTRA, S.S., en MAKKAR, R.S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbial Biotechnology**, 50:520-529.

CHOI, J-W., CHOI, H-G., en LEE, W-H. 1996. Effect of ethanol and phosphate on emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **Journal of Biotechnology**, 40:217-225.

COOPER, D.G., en GOLDENBERG, B.G. 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, 53:224-229.

COOPER D.G. 1986. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**, 3:145-149.

DESAI, J.D., en BANAT, M.B. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61:47-64.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., en SMITH, F. 1956. Colometric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, 28(3):271:-285.

DUCRET, A., GIROUX, A., TRANI M., en LORTIE, R. 1995. Enzymatic preparation of biosurfactants from sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. **Biotechnology and Bioengineering**, 48:214-221.

EKSTEEN J.J. 2000. 'n **Onderzoek na die Produksie van Polihidroksiealkanoate deur Bakterieë vanaf 'n Industrieële Uitvloeisel**. M.Sc-verhandeling PU vir CHO.

ELKELES, A., ROSENBERG, E., en RON, E.Z. 1994. Production and secretion of polysaccharide biodispersan of *Acinetobacter calcoaceticus* A2. **Applied and Environmental Microbiology**, 60(12):4642-4645.

FRAZER, L. 2000. Lipid lather removes metals. **Environmental Health Perspectives**, 108(7):320-323.

GEORGIU, G., LIN, S-C., en SHARMA, M.M. 1992. Surface-active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, 10:60-65.

GOLDMAN, S., SHABTAI, Y., RUBINOVITZ, C., ROSENBERG, E., en GUTNICK, D.L. 1982. Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1: Distribution of cell free and cell-associated cross reacting material. **Applied and Environmental Microbiology**, 44(1):165-170.

HAYES, E.M., NESTHAAS, E., en HREBENAR, K.R. 1986. Microbial surfactants. **Chemtech**, 239-243 April.

HEALY, M.G., DEVINE, C.M., en MURPHY, R. 1996. Microbial production of biosurfactants. **Resources, Conservation and Recycling**, 1:107-119.

HERMAN, D. C., J. F. ARTIOLA, en R. M. MILLER. 1995. Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. **Environmental Science and Technology**, 29:2280-2285.

HOMMEL, R.K., STEGNER, S., WEBER, L., en KLEBER, H.P. 1994. Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. **Applied Microbiological Biotechnology**, 42:192-197.

HOROWITZ, S., GILBERT, J.N., en GRIFFEN, W.M. 1990. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Industrial Microbiology**, 6:243 – 248.

KAPLAN, N., en ROSENBERG, E. 1982. Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. **Applied and Environmental Microbiology**, 44(6):1335-1341.

KORSARIC, N. 1992. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, 64(11):1731-1737.

LANG, S., en WULLBRANDT, D. 1999. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbial Biotechnology**, 51:22-32.

LIN, S-C., SHARMA, M.M., en GEORGIU, G. 1993. Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Biotechnology Progress**, 9:138-145.

LIN, S-C. 1996. Biosurfactants:recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 66:109-129.

MULLIGAN, C.N., MAHMOURIDES, G., en GIBBS, B.F. 1989. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, 12:199-210.

NAKANO, M.M., MAGNUSON, R., MYERS, A., CURRY, J., GROSSMAN, A.D., en ZUBER, P. 1991. *srfA* as an operon required for surfactin production , competence development and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, 173:1770-1778.

NEU, T.R., en PORALLA, K., Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. 1990. **Applied and Environmental Microbiology**, 32:521-525 .

OCHNER, U.A., HEMBACH, T., en FIECHTER, A. Production of rhamnolipid biosurfactants. Vol 53. Downstream processing biosurfactants/carotenoids. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Edited by A.Fiechter, Springer-Verlag, Berlin 1995.

POLLARD, S.J.T., HRUDEY, S.E., en FEDORAK, P.R. 1994. Bioremediation of petroleum and creasote contaminated soils: a view of constraints. **Waste Management and Research**, 12:173-194.

PATEL, R.M., en DESAI, A.J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, 25: 91-94

PEYPOUX, F., MONMATIN, J.M., en WALLACH, J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbial Biotechnology**, 51: 553-563.

PRUTHI, V., en CAMEOTRA, S.S. 1995. Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation. **Biotechnology Techniques**, 9: 271-276, April.

ROBERT, M., MERCADE, M.E., BOSCH, M.P., PARRA, J.L., ESPUNY, M.J., MANRESA, M.A., en GUINEA, J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. **Biotechnology Letters**, 11(12): 871-874.

ROSENBERG, E., PERRY, A., GIBSON, D.T., en GUTNICK, D.L. 1979(a). Emulsifier of *Aerobacter* RAG-1: Specificity of hydrocarbon substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, 37(3): 409-413.

ROSENBERG, E., LUCKERBERG, A., RUBINOVITZ, C., en GUTNICK, D.L. 1979(b). Emulsifier of *Aerobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties. **Applied and Environmental Microbiology**, 37(3): 402-405.

ROSENBERG, E. 1986. Microbial surfactants. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, 3: 109 –131.

STAR, N., en ROSENBERG, E. 1983. Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. **Current Microbiology**, 9: 309-314.

TAN, H., CHAMPION, J.T., ARTIOLA, J.F., BRUSSEAU, M.L., en MILLER, R.M. 1994. Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant. **Environmental Science and Technology**, 28: 2403-2406.

THIMON, L., PEYPOUX, F. en MICHEL, G. 1992. Interaction of surfactin a biosurfactant from *Bacillus subtilis*, with inorganic cations. **Biotechnology letters**, 14(8):713-718.

VAN DYKE, M.I., GULLY, S.L., LEE H., en TREVORS J.T. 1993. Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil. **Journal of Industrial Microbiology**, 11: 163-170.

ZOISM, Z., GUTNICK, D., en ROSENBERG, E. 1983. Uranium binding by emulsions and emulsionsols. **Biotechnology and Bioengineering**, XXV: 1725-1735.

ZUCKERBERG, A., DIVER, A., PEERI, Z., GUTNICK, D.L., en ROSENBERG, E. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG1: Chemical and physical properties. **Applied and Environmental Microbiology**, 37(3): 414-420.

Bylaag A

KOLONIE BESKRYWING					
Propylol			Sabutol		
#	Gramkleuring	Vorm	#	Gramkleuring	Vorm
1	-	Basille	28	+	Kokke
2	-	Basille	29	-	Basille
3	-	Kokke	30	-	Kokke
4	-	Basille	31	-	Basille
5	-	Basille	32	-	Basille
5	-	Basille	34	-	Basille
6	-	Basille	35	-	Basille
7	-	Kokke	36	-	Kokke
8	-	Basille	37	-	Kokke
9	-	Kokke	38	-	Basille
10	+	Kokke	39	-	Basille
11	-	Basille	40	-	Kokke
12	-	Kokke	41	-	Basille
13	-	Basille	42	-	Basille
14	-	Kokke	43	-	Basille
15	-	Basille	44	-	Basille
16	-	Basille	45	-	Basille
17	-	Basille	46	-	Basille
18	-	Basille	47	-	Kokke
19	-	Kokke	48	-	Basille
20	-	Kokke	49	-	Basille
21	-	Basille	50	-	Basille
22	-	Basille	51	-	Basille
23	-	Basille	52	-	Basille
24	-	Basille	53	-	Kokke
25	-	Basille	54	-	Basille
26	-	Basille	56	+	Kokke



Bylaag B

Die volgende tabelle toon die persentasie emulsifikasie van die paraffien oor 'n tydperk van 72 uur deur drie organismes wat op twee verskillende media gegroei is met verskillende koolstofbronne by verskillende konsentrasies van die koolstofbronne. Die sleutel aan die linker kant word soos volg gelees. P: Propylol, E: Ethylol en PE: Propylol:Ethylol-mengsel. Die syfers dui die konsentrasie aan.

Organisme 5 Minimale medium					
Emulsifikasie indeks oor tyd by verskillende koolstofbronne					
[C bron]	Tyd in ure				
	T=0	T=24	T=48	T=72	T=96
P2%	0	0	0	0	6.41
P1%	0	0	0	3.85	0
P0.5%	0	0.25	0	0	1.3
PE2%	0	0	0	31.64557	16.67
PE1%	0	0	0	0	0.13
PE0.5%	0	0	0	0	0.66
E2%	0	0	9.09	9.09	2.53
E1%	0	1.28	10.53	11.25	2.5
E0.05%	0	0	2.56	0	0

Organisme 5 <i>Pseudomonas</i> PHB medium					
	Tyd in ure				
[C bron]	T=0	T=24	T=48	T=72	T=96
P2%	0	0	0	0	0
P1%	0	0	0	0	0
P0.5%	0	0	0	0.14	0
PE2%	0	0	0	0	0
PE1%	0	1.2	0	0	0
PE0.5%	0	0	0	0.13	0.13
E2%	0	0	0	0	0
E1%	0	0	0	0	0
E0.05%	0	0	10	0.13	0

Organisme 6 <i>Pseudomonas</i> PHB-Medium					
	Tyd in ure				
[C bron]	T = 0	T = 24	T = 48	T = 72	T = 96
P2%	0	0	0	0	0
P1%	0	8.33	2.47	1.22	1.2
P0.5%	0	0	2.35	2.27	2.41
PE2%	0	3.57	14.63	6.17	6.02
PE1%	0	9.64	1.24	3.49	1.21
PE0.5%	0	0	0.6	32.53	1.21
E2%	0	14.46	0.59	3.57	12.35
E1%	0	2.38	3.57	2.32	2.41
E0.5%	0	8.75	28.95	9.09	2.47

Organisme 6 Minimale Medium					
	Tyd in ure				
[C bron]	T=0	T=24	T=48	T=72	T=96
P2%	0	0	0	0	0
P1%	0	0.13	0.13	0.13	0.63
P0.5%	0	0.13	0.13	0.13	0
PE2%	0	0.13	0.13	0.65	0.65
PE1%	0	0	0.12	1.27	0
PE0.5%	0	0	37.5	1.25	1.32
E2%	0	0	0	0	2.47
E1%	0	1.56	0.6	5.13	4.88
E0.05%	0	35.9	0	.13	1.3

Organisme k Minimale Medium					
	Tyd in ure				
[C bron]	T=0	T=24	T=48	T=72	T=96
P2%	0	0	0	0	0
P1%	0	15	1.25	0.14	15.85
P0.5%	0	0.13	4.17	15.19	3.8
PE2%	0	0.67	27.5	0	25.64
PE1%	0	2.53	21.25	12	3.85
PE0.5%	0	25	26.32	23.75	22.37
E2%	0	37.66	9.89	5.88	18.75
E1%	0	34.87	6.76	3.16	24.05
E0.05%	0	3.9	6.41	4.62	0.77