

УДК 759.873.088.5:661.185

МІКРОБНІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ. І. ГЛІКОЛІПІДИ

Т. П. ПИРОГ, А. Д. КОНОН

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Отримано 07.03.2013

Огляд присвячено поверхнево-активним речовинам гліколіпідної природи. Подано загальну характеристику й описано фізіологічну роль рамноліпідів, трегалозоліпідів, софороліпідів, манозилеритритолліпідів та їхніх традиційних продуцентів — представників родів *Pseudozyma*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* і *Candida*. Докладно розглянуто хімічну структуру, етапи біосинтезу і регуляції деяких низькомолекулярних поверхнево-активних речовин гліколіпідної природи.

Підсумовано експериментальні дані авторів щодо інтенсифікації синтезу, фізіологічної ролі та практичного використання поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, які за хімічною природою є комплексом гліко-, фосфо-, аміно- і нейтральних ліпідів (гліколіпіди всіх штамів представлені трегалозоміколами).

З'ясовано, що поверхнево-активним речовинам *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та *N. vaccinii* IMB B-7405 притаманні протекторні (захист клітин продуцента від дії важких металів), а також антимікробні й антиадгезивні властивості. Показано, що поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та *N. vaccinii* IMB B-7405 у вигляді культуральної рідини інтенсифікують деструкцію нафти у воді унаслідок активації природної нафтоокиснювальної мікрофлори.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, гліколіпіди, біосинтез, промислові відходи.

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) належать до структурно різноманітних сполук, що синтезуються мікроорганізмами і складаються з гідрофільної (містить кислоти, пептиди, моно-, ди- та полісахариди) і гідрофобної (насичені й ненасичені вуглеводні та жирні кислоти) частин. Усі ПАР мікробного походження умовно можна поділити на низькомолекулярні (ліпопептиди, гліколіпіди, протеїни), здатні знижувати поверхневий і міжфазний натяг, та високомолекулярні (полісахариди, ліпопротеїни), що утворюють міцели і мікроемульсії. У зарубіжній літературі перші зазвичай називають біосурфактантами, а другі — біоемульгаторами [1].

ПАР мікробного походження є відносно новим продуктом біотехнології, оскільки їх почали активно досліджувати у 70–80 роках ХХ ст. Перші повідомлення про мікробні ПАР датуються 40-ми рр. ХХ ст. [2, 3]. Ці сполуки мають суттєві переваги перед син-

тетичними аналогами, зокрема біодеградабельність і нетоксичність, що істотно знижує забруднення довкілля за їх практичного застосування; характеризуються стійкістю в широкому діапазоні температури, рН та солоності середовища; різноманітною біологічною активністю. Унікальність мікробних ПАР полягає в тому, що їх можна використовувати в різних галузях промисловості (харчовій, хімічній та ін.), сільському господарстві, а також у процесах біоремедіації, видобутку нафти, у медицині та фармацевтиці [1, 4–12].

У перших оглядах, присвячених мікробним ПАР, приділяли увагу їх класифікації, хімічній структурі, фізико-хімічним властивостям (здатність до зниження поверхневого натягу, значення критичної концентрації міцелуутворення — ККМ), фізіологічній ролі (емульгування гідрофобних субстратів, участь в адгезії клітин на поверхнях), продуцентам, продуктивності, умовам культи-

ування (живильні середовища, вплив рН, температури), потенційним галузям застосування [13, 14]. У подальших роботах більш детально описано можливість використання ПАР мікробного походження у процесах біоремедіації [11], визначено гени та ключові ензими біосинтезу рамноліпідів, описано нові глікогліцероліпіди представників роду *Microbacterium*, нові продуценти *Nocardia* sp. L-417, *Bacillus subtilis* FE-2, *Pseudozyma fusiformata* VKM Y-2821, *Bradyrhizobium japonicum* 532C47, *Pseudomonas fluorescens* 495 та властивості синтезованих ними ПАР [4]. Антимікробна активність ПАР, здатність до зв'язування металів, роль у формуванні біоплівки, русі клітин, їх диференціації, а також практичне застосування досить ґрунтовно розглянуто в роботах [10, 12, 15]. Найсучасніші огляди присвячено подальшому вивченню властивостей гліколіпідів (рамноліпіди, трегалозоліпіди, манозилеритритолліпіди, софороліпіди), їхніх традиційних продуцентів (переважно представники родів *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudozyma*, *Candida*), а також потенційних сфер застосування [16, 17].

Рамноліпіди

Одними з найвідоміших поверхнево-активних гліколіпідів є рамноліпіди, перші повідомлення про які з'явилися ще в 40-х рр. XX ст. [2, 3]. Вони складаються з однієї або двох молекул рамнози, приєднаних до однієї, двох (рідко трьох) молекул β -гідроксіаліфатичних кислот [18]. Залежно від кількості молекул вуглеводів і жирних кислот зазвичай розрізняють монорамноноліпіди, монорамнодиліпіди, дирамноноліпіди та дирамнодиліпіди. Понад 60 гомологів рамноліпідів синтезується представниками роду *Pseudomonas*, серед яких найповніше вивченими є *P. aeruginosa*, а також бактеріями, що належать до інших родин, класів і навіть відділів [19]. У літературі описано фізико-хімічні властивості рамноліпідів [20], можливість їх використання у процесах біоремедіації [21] та підвищення нафтовидобутку [22]. Зважаючи на високу антимікробну та антиадгезивну активність [23, 24] ці поверхнево-активні речовини можна застосовувати як компоненти мийних засобів, а також у косметичній та фармацевтичній промисловості [1]. Окрім того, рамноліпіди синтезуються з відходів інших виробництв або відновлювальних ресурсів, є біодеградабельними та нетоксичними [25, 26]. У роботах останніх років [18] розглядаються шляхи підвищення біосинтетичної

активності в результаті генетичних модифікацій штамів *P. aeruginosa*; оптимізації процесу біосинтезу *P. aeruginosa*; одержання рекомбінантних штамів-продуцентів серед *P. putida* та *E. coli*.

У літературі детально розглянуто також шляхи регуляції біосинтезу рамноліпідів [18, 27, 28], їхню хімічну структуру, фізіологічну роль та різноманітність самих продуцентів [19, 22, 29–33].

Хімічна структура. Перші дослідження було присвячено визначенню хімічної структури рамноліпідів *P. pyocyanea* (на цей час *P. aeruginosa*). Встановлено, що ці ПАР є дирамнодиліпідами і являють собою 2-O- α -1,2-L-рамнопіранозил- α -L-рамнопіранозил- β -гідроксидеканоїл- β -гідрокси-деканоат [3, 34, 35]. Пізніше було описано й інші гліколіпіди зі схожою структурою [36], а також монорамнодиліпіди [36, 37] та рамноліпіди, що містять тільки одну β -гідроксидеканову кислоту [38].

Значний прорив у вивченні хімічної структури рамноліпідів у 90-х рр. XX ст. був пов'язаний з використанням нових методів, зокрема високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), мас-спектрометрії та їх комбінації. Усього було описано 28 сполук рамноліпідної природи [39].

В останнє десятиліття визначено структуру монорамноліпідів штамів *P. aeruginosa*, до складу яких входять поліненасичені β -гідроксигирні кислоти $C_{8:2}$ та $C_{12:2}$ [20, 40], а також дирамноліпідів з мононенасиченими ланцюгами $C_{10}-C_{10:1}$ та $C_{12}-C_{12:1}$ [41]. Встановлено, що *Pseudomonas chlororaphis* NRRL B-30761 синтезує кілька гомологів, що складаються з $C_{10}-C_{14:1}$, $C_{12}-C_{12:1}$ та $C_{10}-C_{14}$ [42], *P. aeruginosa* LBI — $C_8-C_{10:1}$, $C_{10}-C_{10:1}$ та $C_{12}-C_{12:1}$ [30], мутантний надпродуцент *P. aeruginosa* MIG-N146 — $C_{14:2}$ та $C_{10:1}-C_8$ [43]. Використання протонного ядерно-магнітного резонансу, мас-спектрометрії у поєднанні з іонізуючим електророзпиленням, а також тандемної мас-спектрометрії дало змогу визначити хімічну структуру моно- та дирамноліпідів, синтезованих двома новими штамми *P. aeruginosa*, виділеними з бразильської нафти [31]. Методами тонкошарової хроматографії, ВЕРХ, рідинної хроматографії з мас-спектрометрією, протонного ядерно-магнітного резонансу досліджено дирамноліпіди *P. aeruginosa* ATCC 10145, синтезовані на середовищі з пересмаженою олією [33].

У 90-х рр. XX ст. описано хімічну структуру рамноліпідів *Burkholderia glumae* та *Burkholderia* sp. [44]. Пізніше з'явили-

ся відомості про те, що *B. pseudomallei* та *B. plantarii* синтезують дирамноліпіди з C_{14} – C_{14} ланцюгами [45, 46]. Останній штамп здатен синтезувати ПАР з однією або трьома молекулами β -гідрокситетрадеканової кислоти. *B. thailandensis* синтезує нові гомологи моно- та дирамноліпідів із C_{10} – C_{12} , C_{12} – C_{12} , C_{12} – C_{14} , C_{14} – C_{14} , C_{14} – C_{16} та C_{16} – C_{16} ланцюгами жирних кислот, а *B. pseudomallei* — з аналогічною комбінацією C_{12} , C_{14} та C_{16} аліфатичних кислот [47].

Отже, рамноліпіди складаються із залишків рамнози (полярна група) та ліпідних фрагментів (неполярна група), з'єднаних О-глікозидним зв'язком. Полярна група містить один (монорамноліпід) або два (дирамноліпід) рамнозних залишки, з'єднаних між собою α -1,2-глікозидним зв'язком. Неполярна складається з однієї або двох (у деяких випадках трьох) β -гідроксигирних кислот (із насиченими, моно- або поліненасиченими ланцюгами завдовжки від C_8 до C_{16}), поєднаних один з одним ефірним зв'язком між карбоксильною групою проксимального та β -гідроксильною групою дистального ланцюга. У більшості випадків карбоксильна група дистального ланцюга β -гідроксигірної кислоти залишається вільною, проте може мати ефірний зв'язок з короткою алкільною групою. Гідроксильна група біля другого атому вуглецю рамнози зазвичай залишається вільною, хоча у деяких гомологів може бути ацильована довголанцюговою алкеновою кислотою. Зміни в структурі полярної та неполярної частини зумовлюють утворення різноманітних гомологів [19].

Продукенти. В останнє десятиліття з'являється дедалі більше інформації про нові продукенти рамноліпідів, відмінні від *P. aeruginosa* [42, 48, 49]. Деякі з них є представниками відділу *Proteobacteria* класу *Gamma*proteobacteria. Так, наприклад, два штами *Acinetobacter calcoaceticus* належать до порядку *Pseudomonadales*, родини *Moraxellaceae* [50]; *Pseudoxanthomonas* sp. — порядку *Xanthomonadales*, родини *Xanthomonadaceae* [51]; *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. — порядку *Enterobacteriales*, родини *Enterobacteriaceae* [50, 52]. Описано також продукенти серед *P. alcaligenes*, *P. cepacia*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. luteola*, *P. putida* та *P. stutzeri* [25, 42, 48, 49, 53–55].

Продукентами рамноліпідів є і представники класів *Betaproteobacteria* (рід *Burkholderia*) [45, 47] та *Deltaproteobacteria*, до якого належить, наприклад, *Mycococcus* sp., що синтезує незвичні рамнозовмісні гліко-

ліпіди, названі міксотирозидами завдяки тирозинпохідній основній структурі, зв'язаній з рамнозою та жирними кислотами — (Z)-15-метил-2-гесадекановою і (Z)-2-гексадекановою [56].

Серед представників відділу *Actinobacteria* як продуценти рамноліпідів описано *Renibacterium salmoninarum* [57] та *Nocardioides* sp. [58], а відділу *Firmicutes* — *Tetragenococcus koreensis* [59].

Важливими є дослідження, присвячені вивченню консорціуму бактерій *Enterobacter cloacae* та *Pseudomonas* sp. (ERCPII-2), здатного до синтезу суміші екзополісахариду (43,4% вуглеводів, 20,9% протеїнів і 9,1% уронових кислот) та ПАР рамноліпідної природи (33,6% вуглеводів, 61,7% ліпідів і 5,3% протеїну) за екстремальних умов: температура до 70 °С, тиск — до 41,4 МПа, солоність — до 15%, рН 4–10 [22].

Отже, рамноліпіди синтезуються широким колом продуцентів, що належать не тільки до різних класів, а й навіть відділів.

Властивості. Актуальним залишається питання визначення ролі рамноліпідів для власних продуцентів. Добре відомо, що рамноліпіди, як й інші ПАР, переводять гідрофобні субстрати у доступну для клітин форму, їм притаманні антимікробна та антивірусна дія, здатність до лізису зооспор та участь у формуванні біоплівки [14, 15]. У сучасній літературі доповнено відомості про дію рамноліпідів на клітини про- та еукаріотів, описано роль у русі клітин та механізми утворення біоплівки [19]. Детально роль рамноліпідів висвітлено в огляді [29].

Етапи та регуляція біосинтезу. Найповніша інформація про біосинтез рамноліпідів з'явилася в останні роки. Встановлено, що він відбувається у три етапи [60, 61]:

1) синтез димерів жирних кислот з β -гідроксигирних кислот за участю RhlA (кодується геном *rhlA*) [62, 63];

2) утворення монорамноліпиду з дТДФ-L-рамнози та димерів жирних кислот під дією мембранної RhlB рамнозилтрансферази (кодується геном *rhlB*) [64];

3) синтез дирамноліпиду через приєднання дТДФ-L-рамнози до монорамноліпиду за участю RhlC рамнозилтрансферази (кодується геном *rhlC*) [65].

Біосинтез дТДФ-L-рамнози відбувається в реакціях гліколізу або глюконеогенезу і розпочинається з D-глюкозо-6-фосфату, що під дією фосфоглюкомутази AlgC перетворюється на D-глюкозо-1-фосфат [66] (рисунок). Під дією глюकोзо-1-фосфаттимідилтрансферази (RmlA, КФ 2.7.7.24) відбувається

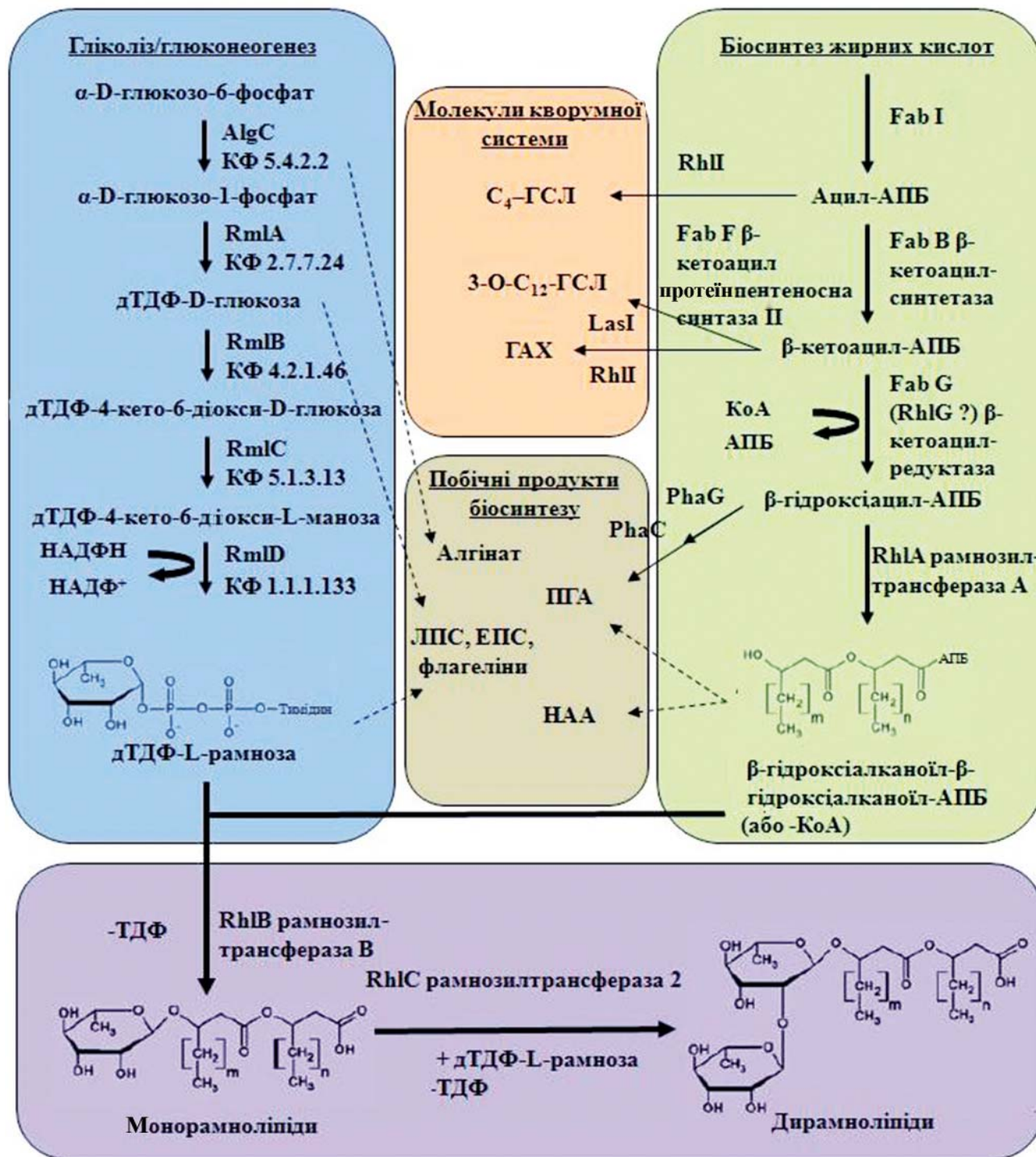


Схема біосинтезу та регуляції утворення рамноліпідів [18]:

- ЛПС — ліпополісахариди;
- ЕПС — екзополісахариди;
- ПГА — полі(3-полігідроксіалканоат);
- НАА — 3-(3-гідроксіалканоїлокси)алканові кислоти;
- ГСЛ — гомосеринлактон;
- ГАХ — 4-гідрокси-2-алкілхінолін

приєднання тимідилмонофосфатного нуклеотиду до D-глюкозо-1-фосфату з утворенням дТДФ-D-глюкози. дТДФ-D-глюкозо-4,6-дегідратаза (RmlB, КФ 4.2.1.46) каталізує окиснення C4 гідроксильної групи D-глюкози з подальшою дегідратацією, що зумовлює утворення дТДФ-4-кето-6-дезоксид-глюкози [67].

На наступному етапі дТДФ-4-кето-6-дезоксид-глюкозо-3,5-епімераза (RmlC, КФ 5.1.3.13) відповідає за подвійну реакцію епімеризації у положенні C3 та C5 4-кето-6-дезоксид-глюкози [68], а утворена дТДФ-4-кето-6-дезоксид-L-маноза під дією редуктази (RmlD, КФ 1.1.1.133) втрачає кетогрупу в положенні C4 і перетворюється на дТДФ-L-рамнозу [68].

За біосинтез ліпідної частини рамноліпідів відповідають класичні синтетази II типу (FAS II), що контролюються *fab*-генами [19, 69], а проміжними продуктами біосинтезу є ацил-АПБ, β -кетואцил-АПБ та β -гідроксіацил-АПБ (рис.).

Встановлено, що за другу реакцію відповідає FabG β -кетואцил-АПБ-редуктаза [63, 70], а не RhlG, як вважали раніше [71]. RhlAB (рамнозилтрансфераза 1) каталізує утворення β -гідроксіалканоїл- β -гідроксіалканоїл-АПБ (або -КоА) з подальшим приєднанням дТДФ-L-рамнози і утворенням монорамноліпиду [62, 63], а RhlC (рамнозилтрансфераза 2) відповідає за приєднання другої молекули активованої рамнози з наступним синтезом дирамноліпідів [65].

Біосинтез рамноліпідів тісно пов'язаний із синтезом інших метаболітів полісахаридної природи (ліпополісахариди, екзополісахариди, флагеліни) [72–74] та метаболітів, структурними одиницями яких є β -гідроксіалканові кислоти [наприклад, полі(3-полігідроксіалканоат)] [66].

Регуляція синтезу рамноліпідів у *P. aeruginosa* відбувається під час утворення як вуглеводної частини, так і ліпідної. Каталітична активність RmlA піддається алостеричній регуляції кінцевим продуктом (дТДФ-L-рамнозою) [75], проте загалом біосинтез контролює складна система [18, 28, 60]. До цієї системи належать регуляторні протеїни (автоіндуктори), зокрема N-ацилгомосеринлактон (ГСЛ), що здійснюють контроль регуляції кворумзалежних генів. У псевдомонад існують дві сигналпровідні системи *las* та *rhl* [76].

Система *las* залежить від синтезу N-3-оксододеканойл-ГСЛ (3-O-C₁₂-ГСЛ), а *rhl* — N-бутанойл-ГСЛ (C₄-ГСЛ). За синтез цих двох автоіндукторів відповідають синтази LasI та

RhlII (рис.). Крім того, у *P. aeruginosa* утворюється 4-гідрокси-2-алкілхінолін [77]. Усі ці регуляторні протеїни відповідають за активацію задіяних у синтезі рамноліпідів генів: оперона *rhlAB* та генів *rhlC* [64].

Слід зазначити, що за рахунок такого розташування генів (оперонна структура *rhlAB* та окреме місце *rhlC* в геномі), відповідальних за синтез рамнозилтрансфераз, *P. aeruginosa* синтезує суміш моно- та дирамноліпідів, тимчасом як *P. chlororaphis* продукує лише моногліколіпід. Припускають, що в цього штаму відсутні гомологи *rhlC*-гена [42].

Тривалий час вважали, що представники роду *Burkholderia* продукують тільки дирамноліпідів, що зумовлено розміщенням в одному кластері генів, які відповідають за їх синтез. Проте у роботі [47] описано штам *B. thailandensis*, який здатен утворювати й моногліколіпідів у незначній концентрації. У роботі [27] досліджено регуляцію транскрипції оперона *rmlBDAC*, відповідального у *P. aeruginosa* за синтез ензимів, що беруть участь в утворенні dTDP-L-рамнози. Встановлено, що один із трьох промоутерів цього оперона залежить від фактора σ (S) та RhlR/C₄-ГСЛ.

Оптимізація умов культивування та створення рекомбінантних продуцентів

Основним підходом до підвищення продуктивності диких штамів псевдомонад є оптимізація умов культивування. Так, для *P. aeruginosa* проводять дослідження з підбору оптимальних компонентів живильного середовища, концентрації [61, 78–88], способів культивування [81, 86, 89, 90].

Синтезувальна здатність штамів *P. aeruginosa* коливається в широких межах: від 6 до 112 г/л (періодичне) та від 5 до 95 г/л (напівбезперервне культивування) [18]. За використання для культивування *P. aeruginosa* ВУК-2 КСТС 18012Р живильного середовища з 25 г/л рибацького жиру та 0,01% сечовини (масова частка) і відпрацьованої соняшникової олії (6%, масова частка) та нітрату натрію (1%, масова частка) для вирощування *P. aeruginosa* WJ-1 спостерігали максимальний вихід ($Y_{RL/S} = 0,75$ та $0,84$ г/г, відповідно) [81, 87].

У роботах останніх років описано низку штамів *P. aeruginosa* — ефективних продуцентів рамноліпідів. Так, під час культивування у колбах на качалці (200 об/хв) *P. aeruginosa* UCP0992 синтезував до 8 г/л

ПАР через 96 год при 28 °С на середовищі, що містило 3% гліцеролу та 0,6% NaNO₃. Одержані рамноліпіди знижували поверхневий натяг до 27,4 мН/м, емульгували гексадекан (E₇₂ 75–80%), були стійкими за температури 4–120 °С, рН 4–12 та концентрації солі 2–10% [85]. За умов росту на середовищі з глюкозою штам *P. aeruginosa* S6 синтезував рамноліпіди, що знижували поверхневий натяг до 33,9 мН/м, значення ККМ становило 50 мг/л, емульгували сиру нафту, солюбілізували феноатрен і були стійкими у широкому діапазоні рН та солоності [88]. Одним із перспективних субстратів для одержання рамноліпідів є екстракт із тропічної рослини маніюки істівної. Під час культивування *P. aeruginosa* L2-1 на цьому субстраті відбувалося зниження поверхневого натягу до 30 мН/м, ККМ становила 30 мг/л, а індекс емульгування соєвої олії — 100% [79]. Значної продуктивності штаму *P. aeruginosa* PAO1 вдалося досягти за культивування в лабораторному ферментері об'ємом 30 л із соняшниковою олією як джерелом вуглецю. При цьому максимальна концентрація цільового продукту становила 36 г/л, продуктивність — 0,43 г/(л·год), вихід біомаси — 3,15 г/г [82]. Використання флокуляції для виділення рамноліпідів, синтезованих іммобілізованими клітинами *P. aeruginosa* DSM 2874 у 10 л ферментері, дало змогу одержати до 70 г ПАР після чотирьох циклів [91]. Штам *P. aeruginosa* WJ-1, ізольований із місць нафтових розробок тропічної зони на півночі Китаю, синтезував 50,2 г/л рамноліпідів на середовищі з відпрацьованою соняшниковою олією (6%, масова частка), нітратом натрію (1%, масова частка) як джерелом азоту, співвідношенням С/Н 8:1, за температури 37 °С, рН 6,0–8,0 та 180 об/хв після 96 год культивування у ферментері об'ємом 10 л. ПАР штаму WJ-1 знижували поверхневий натяг до 24,5 мН/м, ККМ становила 0,014 г/л, а індекс емульгування гасу (E₂₄) — 95% [87]. Для штаму *P. aeruginosa* RS29 проводили підбір оптимального джерела азоту для синтезу рамноліпідів на середовищі з гліцеролом (2%) [84]. Максимальну концентрацію ПАР (6 г/л), індекс емульгування (E₂₄ 80%), зниження поверхневого натягу (26,4 мН/м) спостерігали за використанням як джерела азоту нітрату натрію або калію. Синтезовані рамноліпіди були термостабільними (витримували нагрівання до 121 °С упродовж 15 хв), стійкими у широкому діапазоні рН (2–10) і концентрації NaCl (2–10%).

Для продуцентів рамноліпідів процес росту та синтезу ПАР описано математично [82, 90]. Застосування методу повного фак-

торного експерименту (2⁴) дало змогу підвищити синтез рамноліпідів *P. aeruginosa* AT10 з 3,6 г/л до 18,66 г/л [78] за рахунок визначення оптимальних концентрацій соєвої олії (50 г/л), NaNO₃ (4,6 г/л), KН₂PO₄/K₂HPO₄ (1 г/л, співвідношення 1:2), FeSO₄·7H₂O (7,4 мг/л). Аналогічні методи було використано для визначення оптимальної концентрації соєвої олії (22 г/л), NH₄NO₃ (5,625 г/л) та дріжджового автолізу (11,5 г/л) у живильному середовищі для культивування інших штамів *P. aeruginosa* [80]. Слід зазначити, що ці дослідження проведено за умов культивування продуцентів у колбах на качалках, проте актуальним є масштабування процесу на обладнання [92, 93].

Оптимізацію умов синтезу рамноліпідів здійснено і для інших представників роду *Pseudomonas*. Так, для штаму *P. nitroreducens* AY297786 підбирали оптимальні джерела вуглецю та азоту, а також їх співвідношення [83]. Максимальний синтез ПАР (5,46 г/л) спостерігали за додавання в живильне середовище глюкози (40 г/л) та нітрату натрію (2 г/л) зі співвідношенням С/Н 22. Синтезований рамноліпід знижував поверхневий натяг до 37 мН/м, а ККМ становила 28 мг/л.

Створення рекомбінантних продуцентів рамноліпідів розпочалося в середині 90-х рр. ХХ ст. Для цього клітини *E. coli* та різних представників роду *Pseudomonas* трансформували ген *rhl*, виділений з *P. aeruginosa* [94]. На той час вдалося отримати рекомбінантні штами *P. fluorescens* і *P. putida*, які синтезували 0,25 і 0,6 г/л рамноліпідів відповідно. Згодом було створено новий продуцент рамноліпідів — штам *E. coli* BL21 [95]. Найпродуктивнішим серед рекомбінантних продуцентів (7,3 г/л) є штам *P. putida* KCTC1067, одержаний трансформацією оперона *rhlAB* та генами *rhlI*, виділеними з *P. aeruginosa* EMS1 [96]. Вбудовування не тільки оперона *rhlAB*, а й генів *rmlBDAC* дало змогу отримати мутантний штам *E. coli*, який синтезував 0,12 г/л ПАР [97].

У рекомбінантних продуцентів рамноліпідів відсутня складна система регуляції їх біосинтезу, характерна для *P. aeruginosa*. Ці штами є також непатогенними. Крім того, створено рекомбінантні продуценти *P. putida* (наприклад, *P. putida* KT42C1 pVLT31_rhlAB), що майже не синтезують інших побічних продуктів, зокрема полі(3-полігідроксіалканоатів) [98]. Проте й дотепер не вдалось одержати рекомбінантні продуценти, які б характеризувалися такою самою високою продуктивністю біосинтезу рамноліпідів, як і природні штами [18, 60].

Трегалозоліпіди

До синтезу трегалозоліпідів здатні представники родів *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia* та *Gordonia*. Вперше трегалозодиміколати було виявлено в культуральній рідині *Arthrobacter paraffineus* на середовищі з вуглеводневими субстратами [99], проте найбільш вивченими на сьогодні є трегалозоліпіди родококів. Так, у 1979 р. описано штамп *R. erythropolis* DSM 43215, здатний до синтезу 2,1 г/л ПАР за умов росту на середовищі з 2% (масова частка) C_{12} – C_{18} *n*-алканів [100]. У 80-х роках ХХ ст. досліджено здатність трегалозоліпідів знижувати міжфазний натяг між водними розчинами солей та гексадеканом до 16–17 мН/м і встановлено ККМ (близько 2 мг/л) [101]. Пізніше було ізольовано штамп *Rhodococcus* sp. 51Т7, який синтезував до 3 г/л цих гліколіпідів [102], і показано можливість використання їх для підвищення нафтовидобутку [103].

Розглянуто хімічну структуру та роль трегалозоліпідів [104–109], етапи їх біосинтезу [106–109], а також умови культивування продуцентів [108–116]. Незначну кількість робіт присвячено використанню рекомбінантних продуцентів трегалозоліпідів [117].

Хімічна структура та властивості. Трегалозоліпіди містять дисахарид трегалозу, приєднаний у положеннях C_6 та C_6' до α -розгалуженої- β -гідроксикарбонової кислоти, відомої як міколат — R-СНОН-СНR'-СООН. У 80-х рр. ХХ ст. було описано гліколіпіди *R. erythropolis* DSM43215, до складу яких входили трегалозо-6-мономіколати, трегалозо-6,6-діацилати та трегалозо-6-ацилати [101]. Наступні дослідження показали, що *Rhodococcus* sp. Н13-А синтезує неіонні трегалозоліпіди [118], а *R. erythropolis* S-1 — суміш ацильованих C_{10} – C_{22} насичених і ненасичених жирних кислот, C_{35} – C_{40} міколових кислот, гексан- та додекандикарбонових кислот, 10-метилгекса- та октодеканових кислот [119]. На початку ХХ ст. було описано трегалозодиміколати з довголанцюговими (C_{39}) розгалуженими та лінійними (C_{16}) жирними кислотами [106], тетраефіри трегалози [106, 107, 109] та сукціонілтрегалозоліпіди [108].

Трегалозоліпіди зазвичай асоційовані з клітинною поверхнею і синтезуються за умов росту продуцентів на вуглеводневих субстратах. Вважають, що функція ПАР полягає у підвищенні доступності малорозчинних субстратів для клітин [104]. Слід зазначити, що поверхневі властивості клітини можна змінювати, розміщуючи на її поверхні більшу або меншу кількість гідрофільних та гідрофобних груп молекул ПАР

[120]. У роботі [105] показано, що поверхня клітини *Gordonia* sp. BS29 мала гідрофобні властивості на початку експоненційної фази росту на гексадекані і змінювала їх на гідрофільні наприкінці цієї фази.

У наших попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків ґрунту виділено штами нафтоокиснювальних бактерій, ідентифіковані як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Nocardia vaccinii* К-8 [121–124]. Штами зареєстровано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України за номерами ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7241 та ІМВ В-7405, відповідно.

Встановлено здатність штамів *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *N. vaccinii* ІМВ В-7405 синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгуювальними властивостями під час росту на гідрофільних (глюкоза, етанол, гліцерол) та гідрофобних (рідкі парафіни, *n*-гексадекан) субстратах [121–124].

Показано, що за хімічною природою ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 становлять комплекс гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів зі сполуками полісахаридно-протеїнової природи [124], ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 [122] та *N. vaccinii* ІМВ В-7405 — комплекс гліко-, аміно- та нейтральних ліпідів [121]. Гліколіпіди всіх штамів представлені трегалозоміколатами (табл. 1).

Більшість представників роду *Acinetobacter* синтезують високомолекулярні ПАР, яким притаманні емульгуювальні, проте не поверхнево-активні властивості [14, 125]. За хімічною природою ці сполуки становлять комплекс позаклітинних полісахаридів і протеїнів. Лише нещодавно [126] з'явилось одне з перших повідомлень про здатність представників роду *Acinetobacter* синтезувати низькомолекулярні ПАР, проте тільки на гідрофобних субстратах. Селекціонований нами штамп *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезує незвичні за хімічним складом ПАР на середовищі з етанолом, причому гліколіпіди (трегалозоміколати) є характерними метаболітами для бактерій роду *Rhodococcus*, проте не *Acinetobacter* [14].

Дані про синтез поверхнево-активних речовин представниками роду *Nocardia* вкрай обмежені. Так, у 2000 р. з'явилось перше повідомлення про здатність *Nocardia* sp. L-417 синтезувати ПАР (суміш жирних кислот) на гідрофобних субстратах [127]. У сучасних оглядах, присвячених мікробним ПАР, є інформація про здатність бактерій роду *Nocardia* синтезувати поверхнево-активні

Таблиця 1. Хімічний склад поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. vaccinii* IMB B-7405 [121]

Штам	Джерело вуглецю в середовищі для культивування	Гліколіпіди	Нейтральні ліпіди	Фосфоліпіди	Аміноліпіди
IMB Ac-5017	<i>n</i> -Гексадекан	Трегалозомоно- і диміколати	Цетиловий спирт, пальмітинова і міколові кислоти	Фосфатидил-гліцерол, фосфатидил-етаноламін	–
IMB B-7241	Етанол	Трегалозомоно- і диміколати; трегалозомоно- та діацелати	C ₁₃ –C ₁₈ - <i>n</i> -алканоли, C ₁₁ –C ₂₂ - <i>n</i> -алканові та міколові кислоти	–	+
IMB B-7405	Гліцерол	Трегалозодиміколати і трегалозодіацелати	<i>n</i> -Алканові та міколові кислоти	–	+

гліколіпіди, у тому числі трегалозоміколати [1]. При цьому автори користуються інформацією кінця 80-х років ХХ ст., коли було описано штам *Nocardia erythropolis* — продуцент трегалозоміколатів. Однак згодом штам *Nocardia erythropolis* рекласифікували як *Rhodococcus erythropolis*.

Таким чином, наші дані свідчать про здатність представників родів *Acinetobacter* і *Nocardia* синтезувати незвичайні за хімічним складом ПАР на гідрофільних субстратах.

Встановлено, що ПАР штамів IMB Ac-5017, IMB B-7241 та IMB B-7405 захищають клітини продуцентів від впливу важких металів, виявляють антимікробну та антиадгезивну дію щодо клітин про- та евкаріотів [128–132], а також підвищують ступінь деградації нафти у воді [133–135].

Так, показано, що за присутності 0,01 мМ Cu²⁺ відбувалася повна загибель клітин *R. erythropolis* IMB Ac-5017, позбавлених ПАР, тимчасом як за наявності їх виживало до 65% клітин. За дії 0,5 мМ катіонів міді на клітини *A. calcoaceticus* IMB B-7241 виживало 32% клітин, що містили ПАР, натомість без них усі клітини гинули. Стійкішими за присутності ПАР до дії катіонів міді виявилися клітини *N. vaccinii* IMB B-7405, близько 20% яких виживало навіть за концентрації Cu²⁺ до 2,0 мМ. ПАР досліджуваних штамів здатні захищати клітини продуцентів і від більш токсичних катіонів металів — кадмію та свинцю. Так, у разі дії 0,01 мМ Cd²⁺ за наявності ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 виживало 93 % клітин, тоді як без ПАР майже всі клітини гинули. Зі внесенням у суспензію *N. vaccinii* IMB B-7405 0,3–0,5 мМ Cd²⁺ та Pb²⁺ 100% клітин гинуло, а з додаванням ПАР виживало до 25%.

Встановлено, що ПАР *R. IMB Ac-5017* (0,61–2,1 мг/мл) та *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (0,15–0,22 мг/мл) у вигляді супернатанта культуральної рідини виявляли антимікробну дію щодо низки мікроорганізмів (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Candida tropicalis* ПБТ-5, *Candida albicans* Д-6, *Candida utilis* БВС-65, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3). Виживання мікробних клітин залежало від концентрації ПАР у препаратах, тривалості експозиції, а також фізіологічного стану тест-культур. Препарати ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 спричиняли ефективнішу дію на спори *B. subtilis* БТ-2, ніж на вегетативні клітини, знижуючи виживання спорової культури на 75% через 2 год експозиції [130].

Подальші дослідження показали, що ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та *N. vaccinii* IMB B-7405 притаманна антимікробна дія і щодо фітопатогенних бактерій. Так, після оброблення упродовж 2 год препаратами ПАР (0,15–0,4 мг/мл) штамів IMB Ac-5017 та IMB B-7241 виживання клітин (10⁵–10⁷ в мл) фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas* і *Xanthomonas* становило 0–33%. За присутності як препаратів ПАР (0,085–0,85 мг/мл), так й інших позаклітинних метаболітів *N. vaccinii* IMB B-7405 кількість клітин більшості досліджуваних фітопатогенних бактерій знижувалася на 95–100%.

Препарати ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (0,28 мг/мл) у супернатанті культуральної рідини зменшували кількість прикріплених клітин *B. subtilis* БТ-2 різного фізіологічного стану на кахлі на 38,7–45,8% і лінолеумі на 79,1–85,8%, *E. coli* ІЕМ-1 — на сталі, пластику і кахлі на 41, 15 і 14% відповідно [131]. За оброблення скляних,

пластикових пластинок, а також пластинок з лінолеуму та кахлі препаратами ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 (1,25 мг/мл) рівень адгезії досліджуваних тест-культур знижувався на 45–65%. Аналогічні результати було одержано у разі використання розчину очищених ПАР штаму ІМВ Ас-5017 у значно нижчих концентраціях (0,065 мг/мл).

Ефективними виявилися препарати штамів ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7241 та ІМВ В-7405 різного ступеня очищення (0,018–0,036 мг/мл) для запобігання формуванню біоплівки *C. albicans* Д-6, *B. subtilis* БТ-2 та *E. coli* ІЕМ-1 на поверхні матеріалу зубних протезів. Досліджувані речовини знижували кількість адгезованих клітин *C. albicans* Д-6 на поверхні протезного матеріалу до 80, *B. subtilis* БТ-2 — 90, *E. coli* ІЕМ-1 — 55%.

Оброблення матеріалу урогенітальних катетерів пробами ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 різного ступеня очищення у концентрації 0,05–0,08 мг/мл спричинювало зниження кількості прикріплених клітин *C. albicans* Д-6, *Enterobacter cloacae* К-1, *Pseudomonas* sp. Н-2 та *Proteus vulgaris* В-4 до 76–95%.

Встановлено, що ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *N. vaccinii* ІМВ В-7405 у вигляді культуральної рідини інтенсифікують процеси деструкції нафти у забрудненій воді [133–135]. На 30-ту добу ступінь очищення води від нафти (2,6 г/л) після оброблення препаратами ПАР (5%, об'ємна частка) становив 83–92%. Інтенсифікація деструкції нафти зумовлена активацією природної нафтоокиснювальної мікрофлори води (збільшення кількості клітин навіть на порядки) під впливом ПАР. Ми вважаємо, що це зумовлено підвищенням біодоступності нафти за рахунок її емульгування ПАР.

Біосинтез. У роботі [13] описано етапи біосинтезу трегалозоміколатів *R. erythropolis* DSM 43215 з тетрадекану. Детальніше синтез гідрофобної частини трегалозоміколатів досліджено у *Mycobacterium tuberculosis* під час утворення клітинної стінки [111, 136]. Він відбувається в чотири етапи і починається із синтезу міколових кислот за участю полікетидсинтази 13. Далі міколова група приєднується до D-манопіранозил-1-фосфогептапrenoлю під дією міколілтрансферази I з утворенням 6-O-міколіл-β-D-манопіранозил-1-фосфогептапrenoлю (реакція 1). Остання реагує з трегалозо-6-фосфатом за участю мембранзв'язаного ензиму міколілтрансферази II. Після дефосфорильовання утвореного трегалозоміколатфосфату синтезується трегалозоміколат (реакція 2), що

транспортується назовні клітини (реакція 3). При цьому відбувається синтез клітинної стінки бактерії, що складається з комплексу «арабін-галактан-міколат». Екзоензим міколілтрансфераза Ag85/Fbp/PS1 завершує її синтез і бере участь в утворенні трегалозодиміколатів (реакція 4).

	Реакції	Локалізація
	Міколіл-S-полікетидсинтаза 13 + D-манопіранозил-1-фосфогептапrenoлю →	
1.	6-O-міколіл-β-D-манопіранозил-1-фосфогептапrenoлю.	Усередині клітини.
	6-O-міколіл-β-D-манопіранозил-1-фосфогептапrenoлю + трегалозо-6-фосфат →	
2.	трегалозоміколат.	
	Трегалозоміколат (усередині клітини) + АТФ →	Транспорт із клітини.
3.	трегалозоміколат (зовні клітини) + АДФ + Фн.	
	Трегалозоміколат + трегалозоміколат →	Зовні клітини.
4.	трегалозодиміколат + трегалоза.	

Умови культивування продуцентів

Традиційно для синтезу трегалозоліпідів використовували гідрофобні сполуки, наприклад *n*-алкани [108, 109, 112–114, 137], проте нещодавно з'явилися повідомлення про одержання ПАР на більш технологічних гідрофільних субстратах. Так, *R. erythropolis* ATCC 4277 синтезував позаклітинні гліколіпіди під час культивування на середовищі з гліцеролом [110].

Наші експерименти показали можливість синтезу поверхнево-активних гліколіпідів під час культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, *N. vaccinii* ІМВ В-7405 і *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на таких гідрофільних субстратах, як гліцерол та етанол, проте концентрація цільового продукту була недостатньо високою [121, 122, 138]. Тому на наступному етапі досліджували можливість інтенсифікації синтезу ПАР внесенням екзогенних попередників біосинтезу та використанням змішаних субстратів, що дає змогу уникнути непродуктивних втрат вуглецю й енергії, що мають місце у разі використання моносубстратів, і підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у цільовий продукт. Одночасне внесення у середовище з гліцеролом або етанолом (1–2%, об'ємна частка) фумарату і цитрату (0,01–0,02%) супроводжувалося підвищенням у 2–3 рази концентрації

позаклітинних ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241 порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без органічних кислот [139, 140].

Збільшення синтезу ПАР за таких умов зумовлено одночасним функціонуванням двох анаплеротичних шляхів (гліюксилатного циклу і ФЕП-карбоксілазної реакції), а також підвищенням у 3–5 разів активності ензимів біосинтезу поверхнево-активних гліко- (ФЕП-синтетаза і ФЕП-карбоксікіназа) і аміноліпідів (НАДФ⁺-залежна глутамат-дегідрогеназа). За внесення у середовище з етанолом 0,2% фумарату з наступною періодичною регуляцією рН до 8,0 лимонною кислотою спостерігали підвищення концентрації синтезованих *R. erythropolis* IMB Ас-5017 ПАР [141]. Показники синтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 зростали на 40–50% за внесення на початку стаціонарної фази росту на гліцеролі фумарату (0,1%) і цитрату (0,1%) [142].

Показано можливість інтенсифікації синтезу ПАР під час культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 і *R. erythropolis* IMB Ас-5017 на суміші гексадекану і гліцеролу в концентрації 0,5–1,0% (об'ємна частка). За використання інокуляту, вирощеного на гексадекані, умовна концентрація ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на змішаному субстраті була на 56–100, а *R. erythropolis* IMB Ас-5017 — на 260–320% вищою, ніж на моносубстраті гліцеролі [138].

Застосування лігноцелюлозних, крохмалевмісних субстратів, а також відходів масложирової, молочної, цукрової промисловості для біосинтезу ПАР детально описано в [5], проте інформація про синтез трегалозоліпідів на цих субстратах дуже обмежена. Так, *R. erythropolis* 16 LM.USTNB здатен до біоконверсії пересмаженої олії у гліколіпіди, що знижували поверхневий натяг до 31,9 мН/м [116], а *Rhodococcus* sp. BS32 синтезував позаклітинні ПАР на середовищі з рапсовою олією [115].

Наші експериментальні дані показали, що *A. calcoaceticus* IMB В-7241, *R. erythropolis* IMB Ас-5017 та *N. vaccinii* IMB В-7405 можуть синтезувати ПАР на таких відходах виробництва, як рідкі парафіни, пересмажена соняшникова олія (1,5–2,0%, об'ємна частка), а також меляса (1,5–2,0% за вуглеводами, масова частка). Максимальні показники синтезу ПАР спостерігали за культивування штамів IMB Ас-5017, IMB В-7241 та IMB В-7405 на олієвмісних субстратах: підвищення умовної концентрації ПАР в 1,5–2,5 раза порівняно з показниками на середовищі з гексадеканом, етанолом або гліцеролом. У разі використання меляси як джерела вуглецю для шта-

мів IMB В-7241 та IMB В-7405 спостерігали збільшення кількості синтезованих ПАР на 80–196%, а рідких парафінів — на 40% порівняно з вирощуванням на етанол- та гліцерол-вмісних середовищах.

Враховуючи те, що з усіх досліджуваних штамів *R. erythropolis* IMB Ас-5017 синтезував найменшу кількість ПАР на олієвмісних субстратах, на наступному етапі досліджували можливість інтенсифікації біосинтезу внесенням у живильне середовище додаткового джерела вуглецю: глюкози (0,1–0,2%) або меляси (0,2–0,4%). Показано, що додавання глюкози на початку процесу або в експоненційній фазі росту продуцента супроводжувалось підвищенням у 2–3 рази концентрації синтезованих ПАР порівняно з показниками на середовищі без вуглеводів. У разі використання меляси замість глюкози за умов росту *R. erythropolis* IMB Ас-5017 на олієвмісних середовищах концентрація синтезованих ПАР та індекс емульгування культуральної рідини практично не змінювались [143].

Можливість масштабування процесу на обладнання було встановлено для низки продуцентів трегалозоліпідів. Так, до 40 г/л ПАР синтезував штам *R. erythropolis* SD-74 під час вирощування у біореакторі (об'єм 5 л) на середовищі з *n*-гексадеканом (80 г/л) [13], 32 г/л — *R. erythropolis* DSM 43215 за культивування у 20 л ферментері зі 100 г/л *n*-алканів [13]. За використання гідрофільного субстрату гліцеролу (15 г/л) під час культивування *R. erythropolis* ATCC 4277 у ферментері об'ємом 1,5 л кількість синтезованих ПАР становила 1,7 г/л [110].

Нами показано, що реалізація процесу біосинтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ас-5017 на обладнанні (ферментер АК-210) на середовищі з *n*-гексадеканом дала змогу підвищити у 2 рази кількість синтезованих ПАР і скоротити у 3,5 раза тривалість культивування продуцента порівняно з вирощуванням у колбах на качалці [144]. Максимальні показники синтезу (концентрація позаклітинних ПАР 7,2 г/л, індекс емульгування культуральної рідини 50%, вихід ПАР від субстрату 50%) спостерігали за концентрації розчиненого кисню 60–70% від насичення повітрям, рН 8,0, дробової подачі субстрату порціями по 0,3–0,4% кожні 5–6 год до кінцевої концентрації 2,4% (об'ємна частка) та використанні 10% інокуляту, вирощеного до середини експоненційної фази на середовищі з 1,0% *n*-гексадекану.

Слід зазначити, що у процесі вирощування *R. erythropolis* IMB Ас-5017 у біореакторі

синтезуються переважно позаклітинні ПАР, тимчасом як для інших родококів — як асоційовані з клітинами, так і позаклітинні поверхнево-активні речовини.

Софороліпіди

Ці ПАР синтезуються переважно дріжджами родів *Torulopsis* та *Candida* і містять дисахарид софорозу, який поєднаний глікозидним зв'язком з передостаннім атомом вуглецевого ланцюга жирної кислоти C₁₆–C₁₉ [7, 145]. Уперше ці гліколіпіди було описано у 70–80 рр. ХХ ст. [146, 147]. Інтерес до софороліпідів зумовлений можливістю використання їх як ефективних антиадгезивних агентів, а також препаратів для очищення довкілля від ксенобіотиків [148–152].

У літературі приділяють значну увагу інтенсифікації синтезу ПАР із використанням математичних методів планування експерименту, а також застосуванню новітніх методів для визначення структури синтезованих софороліпідів.

У роботі [148] описано оптимізацію процесу культивування *Candida tropicalis* UCP0996 на середовищі з пересмаженою соняшниковою олією як субстратом із використанням методу математичного планування. Встановлено, що максимальне зниження поверхневого натягу (до 33,66 мН/м) спостерігали за мінімального вмісту дріжджового екстракту, співвідношення С/Fe та максимального С/Р, найвищу концентрацію цільового продукту (3,61 г/л) — за мінімального С/Mg та С/Р. Завдяки високим емульгувальним властивостям (Е₂₄ до 94%) ПАР *C. tropicalis* UCP0996 у вигляді супернатанта культуральної рідини ефективно очищували пісок від нафти та моторної оливи (79–92% відмитого піску).

Використання методу повнофакторного експерименту (2³) дало змогу оптимізувати склад живильного середовища для продуцента ПАР *Candida glabrata* UCP1002. Встановлено, що максимальне зниження поверхневого натягу (до 24 мН/м) та синтез ПАР (до 7 г/л) спостерігали у разі культивування штаму UCP1002 на середовищі з 5% рослинних олій та 2% дріжджового екстракту (масова частка). У складі синтезованих метаболітів виявлено 48% вуглеводів, 34% протеїнів та 18% ліпідів. ПАР не втрачали поверхневої активності у широкому діапазоні солоності (0–10%), рН (2–12) і температури (4–120 °С). Використання 10% супернатанта культуральної рідини сприяло відмиванню 92,6% забрудненого моторною олією (4%) піску через 24 год [149].

В інших дослідженнях [152] показано можливість синтезу 8 г/л ПАР руфісану штамом *Candida lipolytica* UCP0988 на відходах виробництва соєвої олії. Руфісан знижував поверхневий натяг до 25,3 мН/м, а значення ККМ становило 0,03%.

Руфісан у концентрації 6–12 мг/л виявляв ефективну антимікробну дію щодо представників роду *Streptococcus* (виживання *S. mutans* HG становило 64,9%, *S. oralis* J 22 — 62,8%, *S. mutans* — 58%, *S. sanguis* 12–48%, *S. mutans* NS — 46%), менш активно діяв на *L. reuteri* ML1 (32,1%), *L. casei* (28,4%), *L. casei* 72 (33,7%), *L. reuteri* 104R (25,4%) і практично не інгібував ріст *C. albicans* (5%), *E. coli* (5%), *S. aureus* (15%), *P. aeruginosa* (16%) та *S. epidermidis* (18%). Окрім того, руфісан знижував адгезію всіх досліджуваних тест-культур на полістиролові пластинки. Так, вже за мінімально досліджуваної концентрації ПАР (0,75 мг/л) ступінь адгезії *L. casei*, *L. casei* 72, *L. reuteri* 104R, *L. reuteri* ML1, *S. sanguis* 12, *S. agalactiae*, *S. mutans* NS, *S. mutans*, *S. oralis* J22, *S. mutans* HG985, *S. aureus* становив 61–91%. Зі збільшенням концентрації руфісану до 12 мг/л він також знижував кількість прикріплених клітин *E. coli*, *S. epidermidis*, *C. albicans* на 21–51%.

Ефективним антимікробним та антиадгезивним агентом виявився лунасан, синтезований *Candida sphaerica* UCP0995 на середовищі із соєвою олією у концентрації 9 г/л [151]. ПАР штаму UCP0995 знижували поверхневий натяг до 25 мН/м, ККМ становила 0,25 мг/мл, у концентрації 10 мг/мл на 36–68% інгібували ріст *L. casei*, *L. casei* 72, *L. reuteri* 104R, *L. reuteri* ML1, *S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. mutans* NS, *S. mutans* HG, *S. pyogene*, *S. sanguis* 12, *S. oralis* J22, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* і знижували на 40–100% їх адгезію на пластикових пластинках, причому найефективніше діяли на представників родів *Streptococcus*, *Staphylococcus* та *Candida*. Використання методу математичного планування (двофакторний експеримент) дало змогу визначити оптимальне співвідношення соєвої олії (8,63%, об'ємна частка) та кукурудзяного екстракту (8,80%, об'ємна частка) для максимального синтезу ПАР *C. sphaerica* UCP0995. Утворений лунасан відмивав до 95% піску від моторної оливи (5 мл олії/60 г піску) за 24 год [150].

Продуцентами софороліпідів є не тільки представники роду *Candida*. Так, у [153] описано штам термотолерантних дріжджів *Pichia anomalia* PY1, здатних до синтезу ПАР софороліпідної природи. Максимальний

синтез ПАР (0,2 г/л) спостерігали на середовищі з 4% бобової олії та 0,4% нітрату натрію за культивування у колбах на качалці (200 об/хв) упродовж 7 діб при температурі 30 °С. Софороліпіди, продуковані штамом РУ1, знижували поверхневий натяг до 28 мН/м. Мас-спектрометричний аналіз дав змогу встановити, що до складу ПАР входять C_{20} - та $C_{18:1}$ -жирні кислоти у нормальній, лактонній і діацетильованій формах.

Здатність до синтезу софороліпідів на середовищі з мелясою (150 г/л) встановлено для дріжджів *Starmerella bombicola* NBRC 10243 [154]. За оптимального значення рН 6 на 120-ту год культивування штам NBRC 10243 утворював до 14,4 г/л ПАР. За масштабування процесу на обладнання кількість цільового продукту підвищувалася в 1,6 раза (до 22,8 г/л). Методом газової хроматографії-мас-спектрометрії виявлено, що синтезовані гліколіпіди містили C_{16} - та C_{18} - жирні кислоти.

Інший штам *Starmerella bombicola* — АТСС 22214 синтезував 12,3 г/л софороліпідів на середовищі із сумішшю глюкози (10%, масова частка) та соняшникової олії (10%, масова частка), 6,6 г/л — на суміші гліцеролу (15%, масова частка) та соняшникової олії (10%, масова частка) під час культивування у колбах на качалці (210 об/хв) за 30 °С упродовж 200 год [155]. Заміна у суміші свіжої соняшникової олії на пересмажену та відпрацьовану пересмажену призводила до зниження показників синтезу ПАР до 3,93–6,45 г/л. Для визначення структури лактонного софороліпиду *S. bombicola* АТСС 22214, синтезованого на суміші гліцеролу і соняшникової олії, використовували обернену ВЕРХ, рідинну хроматографію-мас-спектрометрію та ядерний магнітний резонанс [156], а кислого софороліпиду, утворюваного на середовищі з пересмаженою олією та глюкозою, — ВЕРХ, рідинну хроматографію мас-спектрометрію та інфрачервону спектрометрію [155].

Важливими є дослідження хімічної структури софороліпідів *Rhodotorula bogoriensis* із використанням ВЕРХ у комбінації з випарним детектором світлорозсіювання та тандемної мас-спектрометрії з іонізуючим розпиленням. Цими методами вперше встановлено, що ПАР *R. bogoriensis* містять моно- та діацетильовані $C_{24:0}$ гідроксижирні кислоти [157]. Використання матричної лазерної десорбційної часопротігної мас-спектрометрії дало змогу ідентифікувати 18-гідрокси- Δ^9 -октадеканоат у складі софороліпідів *Candida* sp. NRRL Y-27208 [158].

Манозилеритритолліпіди

Основними продуцентами манозилеритритолліпідів (МЕЛ як основну структуру містить 4-О- β -D-манопіранозил-мезо-еритритол, з'єднаний з жирною кислотою та/або ацетильними групами) є представники роду *Pseudozyma*. *Pseudozyma antarctica* T-34 [159], *Pseudozyma aphidis* DSM 70725 [160] та *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877 [161], які синтезують суміш МЕЛ-А, МЕЛ-В та МЕЛ-С, *Pseudozyma hubeiensis* KM-59 [162], *Pseudozyma graminicola* CBS 10092 [163], *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 [164] та *Pseudozyma shanxiensis* CBS 10075 [165] здатні утворювати МЕЛ-С, що містять жирні кислоти з різною довжиною ланцюга. МЕЛ-В продукують *Ustilago scitaminea* за умов росту на середовищі з вуглеводнями [166], а *Pseudozyma tsukubaensis* — їх діастеомери (1-О- β -(2',3'-ди-О-алка(е)ноіл-6'-О-ацетил-D-манопіранозил)-D-еритритол) [167] з комерційно важливими властивостями завдяки здатності утворювати великі везикули (1–5 мкм) за низьких концентрацій (можуть бути використані як компоненти косметичних засобів) [168]. Нещодавно на острові Окінава (Японія) з листя цукрової тростини було ізольовано новий штам *Pseudozyma churashimaensis* sp. nov. JCM 16988(T), здатний до синтезу триацильованих похідних манозилеритритолліпідів (МЕЛ-А2) на середовищі з глюкозою. ПАР мали здатність до самоорганізації з утворенням ламілярних фаз, знижували поверхневий натяг до 29,2 мН/м, а ККМ становила $1,7 \cdot 10^{-6}$ М [169].

Пошук продуктивних штамів МЕЛ-В та МЕЛ-С є досить актуальним. Так, у роботі [170] було виділено чотири штами 1D9, 1D10, 1D11 та 1E5, серед яких останній синтезував до 73,1 г/л МЕЛ-В на середовищі з оливковою олією (10%, масова частка) за культивування у ферментері об'ємом 5 л упродовж 168 год. Використання соку цукрової тростини (19,3% цукру, масова частка) як субстрату для культивування *Ustilago scitaminea* NBRC 32730 у ферментері на 7-му добу дало змогу отримати до 25,1 г/л МЕЛ-В, що знижував поверхневий натяг до 25,2 мН/м, ККМ становила $3,7 \cdot 10^{-6}$ М [171].

Під час вирощування в колбах на качалці іншого продуцента МЕЛ — *Pseudozyma hubeiensis* SY62 концентрація МЕЛ-С становила 20,1 г/л за оптимальної температури 25 °С, а після оптимізації складу живильного середовища (глюкоза, оливкова олія 100 г/л, дріжджовий екстракт 6 г/л) підвищилася до 49,2 г/л [172]. Культивування з підживленням (додавання джерел вуглецевого живлення на

Таблиця 2. Синтез гліколіпідів на різних вуглецевих субстратах

ПАР	Продукт	Джерело вуглецю, концентрація, г/л	Концентрація ПАР, г/л	Вихід субстрату, %	Література
Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ВУК-2 КСТС 18012Р	Риб'ячий жир, 25,0	18,8	75,0	[81]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCP0992	Гліцерол, 37,8	8,0	21,2	[85]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Соняшникова олія, 250	36,0	14,4	[82]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Соева олія, 50,0	18,7	37,3	[78]
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> AY297786	Глюкоза, 40,0	5,5	13,7	[83]
	Рекомбінантний штам <i>Pseudomonas putida</i> КСТС1067	Соева олія, 20,0	7,3	36,5	[96]
	Рекомбінантний штам <i>Pseudomonas putida</i> КТ42С1	Глюкоза, 10,0	1,5	15,0	[98]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WJ-1	Відпрацьована соняшникова олія, 60,0	50,2	83,7	[87]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RS29	Гліцерол, 25,2	6,0	23,8	[84]
Трегалозоліпіди	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	Гліцерол, 15,0	1,7	11,3	[110]
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43215	C12–C18– <i>n</i> -алкани, 20,0	2,0	10,0	[86]
		C10– <i>n</i> -алкани, 100,0	32,0	32,0	[13]
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> SD-74	<i>n</i> -Гексадекан, 80,0	40,0	50,0	[13]
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017	<i>n</i> -Гексадекан, 15,0	7,5	50,0	[144]
		Пересмажена соняшникова олія, 18,0	6,8	40,0	[143]
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	Етанол, 16,0	6,0	37,5	[139]
<i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405	Гліцерол, 19,0	12,6	66,3	[121]	
Софороліпіди	<i>Candida tropicalis</i> UCP0996	Пересмажена соняшникова олія, 20,0	3,6	18,1	[148]
	<i>Candida glabrata</i> UCP1002	Відходи рослинних жирів, 50,0	7,0	14,0	[149]
	<i>Candida lipolytica</i> UCP 0988	Соева олія, 60,0	8,0	13,3	[152]
	<i>Candida sphaerica</i> UCP0995	Соева олія, 79,8	9,0	11,3	[151]
	<i>Pichia anomalia</i> PY1	Бобова олія, 40,0	0,2	0,5	[153]
	<i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243	М'яса, 150,0	22,8	15,2	[154]
	<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214	Глюкоза і соняшникова олія, по 100,0	12,3	6,2	[155]
Манозилеритритолліпіди	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> SY62	Глюкоза і оливкова олія, по 100,0	129,0	64,5	[172]
	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i> 1E5	Оливкова олія, 100,0	73,1	73,1	[170]
	<i>Ustilago scitaminea</i> NBRC 32730	Сік цукрової тростини (19,3% цукру, масова частка)	25,1	13,0	[171]

3-тю добу) дало змогу досягти концентрації цільового продукту 129 г/л за тиждень культивування.

Вивченню здатності молекул МЕЛ до самозбирання також присвячено низку досліджень. Так, у [173] досліджували властивості МЕЛ-D, одержаного гідролізом ацетатних груп МЕЛ-B (продукт *Pseudozyma tsukubaensis* NBRC 1940). Показано, що МЕЛ-D у дуже низьких концентраціях (5 мМ) утворював зворотні везикули у таких гідрофобних речовинах, як *n*-алкани, циклогексан, сква-

лан і силіконові олії. Здатність формувати ліотропні кристалічні фази встановлено і для МЕЛ-B *U. scitaminea* NBRC 32730 [171].

Показано, що МЕЛ-A (продукт *P. antarctica* T-34), МЕЛ-B (*P. tsukubaensis* NBRC1940) і МЕЛ-C (*P. hubeiensis* КМ-59) можуть бути ефективними компонентами засобів догляду за шкірою [174]. Зокрема, за оброблення досліджуваними ПАР у концентрації 1–5% (масова частка) відновлювалося до 80% клітин шкіри людини (тривимірна модель). Нанесення 5% МЕЛ-B на шкіру передпліччя

людини уможливило підвищення її здатності до утримання вологи на 186% (у контрольному варіанті: шкіра, оброблена 5%-м 1,3-бутиленгліколем, — лише 125%) та знизити потовиділення до 74% за 2 год. МЕЛІ-С у концентрації 10 мкг/мл на 17% ефективніше захищав клітини людських фібробластів шкіри (лінія NB1RGB), ніж арбутин (комерційний аналог) від H₂O₂-індукованого окиснювального стресу, що свідчить про антиоксидантні властивості цих ПАР [175].

Узагальнені дані щодо продуктивності деяких штамів — продуцентів гліколіпідів наведено в табл. 2.

Як впливає з них, селекціоновані нами штами не поступаються і навіть перевершують за показниками синтезу ПАР відомі у світі продуценти гліколіпідів.

Таким чином, найбільш вивченими на сьогодні мікробними ПАР є рамноліпіди, які вперше було описано 70 років тому. За цей період накопичено достатньо знань про їхню хімічну структуру, властивості, умови культивування продуцентів, проте й на сьогодні ці ПАР є об'єктами інтенсивних досліджень, спрямованих на оптимізацію процесу біосинтезу (підбір оптимальних умов культивування) і здешевлення технологій за рахунок використання як субстратів відходів виробництва (гліцерол, відпрацьована соняшникова олія тощо). Окрім того, детально досліджують біохімічні основи

синтезу цих гліколіпідів з метою створення мутантів з порушеною системою регуляції або рекомбінантних продуцентів (*P. putida* і *E. coli*) замість патогенних *P. aeruginosa*. Іншими відомими бактеріальними ПАР є трегалозоліпіди, які синтезуються переважно представниками роду *Rhodococcus* на гідрофобних *n*-алканах. Конкурентоспроможними продуцентами поверхнево-активних трегалозоміколатів є селекціоновані нами *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405, які утворюють позаклітинні ПАР у високих концентраціях як на гідрофільних (етанол, гліцерол), так і гідрофобних (*n*-гексадекан, пересмажена соняшникова олія) субстратах. Серед дріжджів гліколіпіди в основному синтезуються представниками роду *Candida* (софороліпіди) і *Pseudozyma* (манозилеритритолліпіди). Сучасні дані присвячено підбору оптимальних умов культивування цих продуцентів (концентрація компонентів живильного середовища, рН, температура), а також дослідженню біологічних властивостей синтезованих ПАР (антимікробна та антиадгезивна дія). Таким чином, інтерес до мікробних ПАР як альтернативи хімічним аналогам зростає з кожним роком, а різні біотехнологічні прийоми інтенсифікації синтезу дають змогу підвищити концентрацію цільового продукту, здешевити технологію і зробити її конкурентоспроможною.

REFERENCES

1. Banat I. M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M. G., Fracchia L., Smyth T. J., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87(2), 427–444.
2. Bergstrom S., Theorell H., Davide H. Pyolipic acid. A metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea* active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1946, V. 10, P. 165–166.
3. Jarvis F. G., Johnson M. J. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 1949, 71(12), 4124–4126.
4. Lang S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 2002, 7(1–2), 12–20.
5. Makkar R. S., Cameotra S. S., Banat I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express.* 2011. doi: 10.1186/2191-0855-1-5.
6. Marchant R., Banat I. M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants. *Biotechnol. Lett.* 2012, 34(9), 1597–1605.
7. Mulligan C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 2005, 133(2), 183–198.
8. Nguyen T. T., Sabatini D. A. Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12(2), 1232–1244.
9. Pacwa-Plociniczak M., Plaza G. A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12(1–2), 633–654.
10. Rodrigues L. R. Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011, V. 715, P. 351–367.
11. Ron E. Z., Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002, 13(3), 249–252.
12. Singh A., Van Hamme J. D., Ward O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2 Application aspects. *Biotechnol. Adv.* 2007, 25(1), 99–121.

13. Lang S., Philp J. C. Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie. Van. Leeuwenhoek*. 1998, 74(1–3), 59–70.
14. Rosenberg E., Ron E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 52(2), 154–162.
15. Van Hamme J. D., Singh A., and Ward O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 2006, 24(6), 604–620.
16. Arutchelvi J. I., Bhaduri S., Uppara P. V., Doble M. Mannosylerythritol lipids: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 35(12), 1559–1570.
17. Van Bogaert I. N. A., Zhang J., Soetaert W. Microbial synthesis of sophorolipids. *Proc. Biochem.* 2011, 46(4), 821–833.
18. Müller M. M., Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 91(2), 251–264.
19. Abdel-Mawgoud A. M., Lepine F., Deziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol. Proc. Biochem.* 2010, 86(5), 1323–1336.
20. Abalos A., Pinazo A., Infante M., Casals M., García F., Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. 2001, 17(5), 1367–1371.
21. Nguyen T. T., Youssef N. H., Mcinerney M. J., Sabatini D. A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Res.* 2008, 42(6–7), 1735–1743.
22. Darvishi P., Ayatollahi S., Mowla D., Niazi A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. *Coll. Surf. B. Biointerfaces*. 2011, 84(2), 292–300.
23. Dusane D. H., Dam S., Nancharaiah Y. V., Kumar A. R., Venugopalan V. P., Zinjarde S. S. Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant. *Aquat. Biosyst.* 2012. doi: 10.1186/2046-9063-8-17.
24. Vatsa P., Sanchez L., Clement C., Baillieul F., Dorey S. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11(12), 5095–5108.
25. Marsudi S., Unno H., Hori K. Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 78(6), 955–961.
26. Wei Y.-H., Chou C.-L., Chang J.-S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochem. Eng. J.* 2004, 27(2), 146–154.
27. Aguirre-Ramírez M., Medina G., González-Valdez A., Grosso-Becerra V., Soberón-Chávez G. The *Pseudomonas aeruginosa* rmlBDAC operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhlR and the alternative sigma factor σ^S . *Microbiology*. 2012, 158(4), 908–916.
28. Toribio J., Escalante A. E., Soberon-Chavez G. Rhamnolipids: production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010, 112(10), 1082–1087.
29. Chrzanowski L., Lawniczak L., Czaczyk K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 28(2), 401–419.
30. Nitschke M., Costa S. G., Contiero J. Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010, 160(7), 2066–2074.
31. Pereira J. F., Gudiña E. J., Dória M. L., Domingues M. R., Rodrigues L. R., Teoxeira J. A., Coutinho J. A. Characterization by electrospray ionization and tandem mass spectrometry of rhamnolipids produced by two *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Brazilian crude oil. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2012, 18(4), 399–3406.
32. Sha R., Jiang L., Meng Q., Zhang G., Song Z. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. *J. Basic. Microbiol.* 2012, 52(4), P. 458–466.
33. Wadekar S. D., Kale S. B., Lali A. M., Bhowmick D. N., Pratap A. P. Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2012, 42(3), 249–266.
34. Edwards J. R., Hayashi J. A. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1965, 111(2), 415–421.
35. Hauser G., Karnovsky M. L. Studies on the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1954, 68(6), 645–654.
36. Hirayama T., Kato I. Novel methyl rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 1982, 139(1), 81–85.
37. Ito S., Honda H., Tomita F., Suzuki T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin (mixture of C 12, C 13 and C 14 fractions). *J. Antibiot.* 1971, 24(12), 855–859.
38. Syldatk C., Lang S., Wagner F., Wray V., Witte L. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on *n*-alkanes. *Zh. Naturforsch. C.* 1985, 40(1–2), 51–60.
39. Rendell N. B., Taylor G. W., Somerville M., Todd H., Wilson R., Cole P. J. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990, 1045(2), 189–193.
40. Haba E., Abalos A., Jáuregui O., Espuny M. J., Manresa A. Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the

- composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Surfact. Deterg.* 2003, 6(2), 155–161.
41. Sharma A., Jansen R., Nimtz M., Johri B. N., Wray V. Rhamnolipids from the rhizosphere bacterium *Pseudomonas* sp. GRP(3) that reduces damping-off disease in Chilli and tomato nurseries. *J. Nat. Prod.* 2007, 70(6) 941–947.
 42. Gunther N. W., Nuñez A., Fett W., Solaiman D. K. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71(5), 2288–2293.
 43. Guo Y. P., Hu Y. Y., Gu R. R., Lin H. Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. *J. Coll. Interface Sci.* 2009, 331(2), 356–363.
 44. Manso Pajarron A., De Koster C. G., Heerma W., Schmidt M., Haverkamp J. Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Glycoconj. J.* 1993, 10(3), 219–226.
 45. Andrä J., Rademann J., Howe J., Koch M. H., Heine H., Zähringer U., Brandenburg K. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *Biol. Chem.* 2006, 387(3), 301–310.
 46. Howe J., Bauer J., Andrä J., Schromm A. B., Ernst M., Rössle M., Zähringer U., Rademann J., Brandenburg K. Biophysical characterization of synthetic rhamnolipids. *FEBS J.* 2006, 273(22), 5101–5112.
 47. Dubeau D., Déziel E., Woods D. E., Lépine F. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol.* 2009. doi: 10.1186/1471-2180-9-263.
 48. Gunther N. W., Nuñez A., Fortis L., Solaiman D. K. Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 33(11), 914–920.
 49. Onbasli D., Aslim B. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. *J. Environ. Biol.* 2009, 30(1), 161–163.
 50. Rooney A. P., Price N. P., Ray K. J., Kuo T. M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009, 295(1), 82–87.
 51. Nayak A. S., Vijaykumar M. H., Karegoudar T. B. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2009, 63(1), 73–79.
 52. Vasileva-Tonkova E., Gesheva V. Biosurfactant production by antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp. during growth on hydrocarbons. *Curr. Microbiol.* 2007, 54(2), 136–141.
 53. Abouseoud M., Yataghene A., Amrane A., Maachi R. Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 35(11), 1303–1308.
 54. Celik G. Y., Aslim B., Beyatli Y. Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. *J. Environ. Biol.* 2008, 29(6), 867–870.
 55. Oliveira F. J. S., Vazquez L., de Campos N. P., de Franca F. P. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Proc. Biochem.* 2009, 44(4), 383–389.
 56. Ohlendorf B., Lorenzen W., Kehraus S., Krick A., Bode H. B., König G. M. Myxotyrosides A and B, unusual rhamnosides from *Myxococcus* sp. *J. Nat. Prod.* 2009, 72(1), P. 82–86.
 57. Christova N., Tuleva B., Lalchev Z., Jordanova A., Jordanov B. Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on *n*-hexadecane. *Z. Naturforsch. C.* 2004, 59(1–2), 70–74.
 58. Vasileva-Tonkova E., Gesheva V. Glycolipids produced by Antarctic *Nocardioideis* sp. during growth on *n*-paraffin. *Process Biochem.* 2005, 40(7), 2387–2391.
 59. Lee M., Kim M. K., Vancanneyt M., Swings J., Kim S. H., Kang M. S., Lee S. T. *Tetragenococcus koreensis* sp. nov., a novel rhamnolipid-producing bacterium. *Int. J. Syst. EV. Microbiol.* 2005, 55(4), 1409–1413.
 60. Reis R. S., Pereira A. G., Neves B. C., Freire D. M. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*: a review. *Bioresour. Technol.* 2011, 102(11), 6377–6384.
 61. Soberón-Chávez G., Lépine F., Déziel E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 68(6), 718–725.
 62. Déziel E., Lépine F., Milot S., Villemur R. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology.* 2003, 149(8), 2005–2013.
 63. Zhu K., Rock C. O. RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2008, 190(9), 3147–3154.
 64. Ochsner U. A., Fiechter A., Reiser J. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid

- biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* 1994, 269(31), 19787–19795.
65. *Rahim R., Ochsner U. A., Olvera C., Graninger M., Messner P., Lam J. S., Soberón-Chávez G.* Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 2001, 40(3), 708–718.
66. *Pham T. H., Webb J. S., Rehm B. H.* The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology.* 2004, 150(10), 3405–3413.
67. *Allard S., Giraud M. F., Whitfield C., Graninger M., Messner P., Naismith J. H.* The crystal structure of dTDP-D-Glucose 4,6-dehydratase (RmlB) from *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, the second enzyme in the dTDP-l-rhamnose pathway. *J. Mol. Biol.* 2001, 307(1), 283–295.
68. *Graninger M., Nidetzky B., Heinrichs D. E., Whitfield C., Messner P.* Characterization of dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase and dTDP-4-dehydrorhamnose reductase, required for dTDP-l-rhamnose biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2. *J. Biol. Chem.* 1999, 274(35), 25069–25077.
69. *Rehm B. H., Mitsky T. A., Steinbüchel A.* Role of fatty acid *de novo* biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67(7), P. 3102–3109.
70. *Miller D. J., Zhang Y. M., Rock C. O., White S. W.* Structure of RhlG, an essential beta-ketoacyl reductase in the rhamnolipid biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 2006, 281(26), 18025–18032.
71. *Campos-García J., Caro A. D., Nájera R., Miller-Maier R. M., Al-Tahhan R. A., Soberón-Chávez G.* The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. Bacteriol.* 1998, 180(17), 4442–4451.
72. *Byrd M. S., Sadovskaya I., Vinogradov E., Lu H., Sprinkle A. B., Richardson S. H., Ma L., Ralston B., Parsek M. R., Anderson E. M., Lam J. S., Wozniak D. J.* Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol. Microbiol.* 2009, 73(4), 622–638.
73. *Lindhout T., Lau P. C., Brewer D., Lam J. S.* Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology.* 2009, 155(10), 3449–3460.
74. *Rahim R., Burrows L. L., Monteiro M. A., Perry M. B., Lam J. S.* Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 2000, 146(11), 2803–2814.
75. *Blankenfeldt W., Giraud M. F., Leonard G., Rahim R., Creuzenet C., Lam J. S., Naismith J. H.* The purification, crystallization and preliminary structural characterization of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RmlA), the first enzyme of the dTDP-L-rhamnose synthesis pathway from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2000, 56(11), 1501–1504.
76. *Williams P., Cámara M.* Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009, 12(2), 182–191.
77. *Déziel E., Gopalan S., Tampakaki A. P., Lépine F., Padfield K. E., Saucier M., Xiao G., Rahme L. G.* The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol. Microbiol.* 2005, 55(4), 998–1014.
78. *Abalos A., Maximo F., Manresa M. A., Bastida J.* Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2002, 77(7), 777–784.
79. *Costa S. G. V., Nitschke M., Lépinec F., Déziel E.* Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. *Proc. Biochem.* 2010, 45(9), 1511–1516.
80. *De Lima C. J., França F. P., Sérvulo E. F., Resende M. M., Cardoso V. L.* Enhancement of rhamnolipid production in residual soybean oil by an isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007, 137–140(1–12), 463–470.
81. *Lee K. M., Hwang S., Ha S. D., Jang J. H., Lim D. J., Kong J. Y.* Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2007, 9(4), 267–273.
82. *Müller M. M., Hörmann B., Kugel M., Syltatk C., Hausmann R.* Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 89(3), 585–592.
83. *Onwosi C. O., Odibo F. J.* Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid

- biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 28(3), 937–942.
84. Saikia R. R., Deka S., Deka M., Banat I. M. Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Ann. Microbiol.* 2012, 62(2), 753–763.
 85. Silva S. N., Farias C. B., Rufino R. D., Luna J. M., Sarubbo L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Coll. Surf. B. Biointerfaces.* 2010, 79(1), 174–183.
 86. Trummler K., Effenberger F., Syldatk C. An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp DSM 2874. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2003, 105(10), 563–571.
 87. Xia W. J., Luo Z. B., Dong H. P., Yu L., Cui Q. F., Bi Y. Q. Synthesis, characterization, and oil recovery application of biosurfactant produced by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 using waste vegetable oil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012, 166(5), 1148–1166.
 88. Yin H., Qiang J., Jia Y., Ye J., Peng H., Qin H., Zhang N., He B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Proc. Biochem.* 2009, 44(3), 302–308.
 89. Chen S. Y., Wei Y. H., Chang J. S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 76(1), 67–74.
 90. Müller M. M., Hörmann B., Syldatk C., Hausmann R. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87(1), 167–174.
 91. Heyd M., Franzreb M., Berensmeier S. Continuous rhamnolipid production with integrated product removal by foam fractionation and magnetic separation of immobilized *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol. Prog.* 2011, 27(3), 706–716.
 92. Duetz W. A. Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. *Trends Microbiol.* 2007, 15(10), 469–475.
 93. Weuster-Botz D. Parallel reactor systems for bioprocess development. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2005, V. 92, P. 125–143.
 94. Ochsner U. A., Reiser J., Fiechter A., Witholt B. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61(9), 3503–3506.
 95. Wang Q., Fang X., Bai B., Liang X., Shuler P. J., Goddard W. A., Tang Y. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 98(4), 842–853.
 96. Cha M., Lee N., Kim M., Kim M., Lee S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresour. Technol.* 2008, 99(7), 2192–2199.
 97. Cabrera-Valladares N., Richardson A. P., Olvera C. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73(1), 187–194.
 98. Wittgens A., Tiso T., Arndt T. T., Wenk P., Hemmerich J., Müller C., Wichmann R., Küpper B., Zwick M., Wilhelm S., Hausmann R., Syldatk C., Rosenau F., Blank L. M. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb. Cell. Fact.* 2011. doi: 10.1186/1475-2859-10-80.
 99. Suzuki T., Tanaka K., Matsubara J., Kimoshita S. Trehalose lipid and α -branched- β -hydroxy fatty acids formed by bacteria grown on *n*-alkanes. *Agric. Biol. Chem.* 1969, 33(11), 1619–1625.
 100. Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes. *J. Gen. Microbiol.* 115(2), 491–503.
 101. Kretschmer A., Bock H., Wagner F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 44(4), 864–870.
 102. Espuny M. J., Egado S., Rodon I., Manresa A., Mercadé M. E. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51T7. *Biotechnol. Lett.* 1996, V. 18, P. 521–526.
 103. Kim J. S., Powalla M., Lang S., Wagner F., Lünsdorf H., Wray V. Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. *J. Biotechnol.* 1990, 13(4), 257–266.
 104. Bouchez-Naitali M., Vandecasteele J. P. Biosurfactants, an help in the biodegradation of hexadecane? The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 24(9), 1901–1907.
 105. Franzetti A., Bestetti G., Caredda P., La Colla P., Tamburini E. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains, *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008, 63(2), 238–248.
 106. Philp J. C., Kuyukina M. S., Ivshina I. B., Dunbar S. A., Christofi N., Lang S., Wray V. Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 59(2–3), 318–324.

107. Rapp P., Gabriel-Jürgens L. H. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase. *Microbiology*. 2003, 149(10), 2879–2890.
108. Tokumoto Y., Nomura N., Uchiyama H., Imura T., Morita T., Fukuoka T., Kitamoto D. Structural characterization and surface-active properties of a succinoyl trehalose lipid produced by *Rhodococcus* sp. SD-74, *J. Oleo. Sci.* 2009, 58(2), 97–102.
109. Tuleva B., Christova N., Cohen R., Stoev G., Stoineva I. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 104(6), 1703–1710.
110. Ciapina E. M., Melo W. C., Santa A. L. M., Santos A. S., Freire D. M., Pereira N. Jr. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006, 131(1–3), 880–886.
111. Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Smyth T. J. P., Banat I. M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010, V. 112, P. 617–627.
112. Mutalik S. R., Vaidya B. K., Joshi R. M., Desai K. M., Nene S. N. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* sp. MTCC 2574. *Bioresour. Technol.* 2008, 99(16), 7875–7880.
113. Ortiz A., Teruel J. A., Espuny M. J., Marqués A., Manresa A., Aranda F. J. Interactions of a *Rhodococcus* sp. biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylethanolamine membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008, 1778(12), 2806–2813.
114. Peng F., Liu Z., Wang L., Shao Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. *J. Appl. Microbiol.* 2007, 102(6), 1603–1611.
115. Ruggeri C., Franzetti A., Bestetti G., Careda P., La Colla P., Pintusa M., Sergia S., Tamburinia E. Isolation and characterisation of surface active compound producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2009, 63(7), 936–942.
116. Sadouk Z., Hacene H., Tazerouti A. Biosurfactants production from low cost substrate and degradation of diesel oil by a *Rhodococcus* strain. *Oil. Gas. Sci. Technol.* 2008, 63(6), 747–753.
117. Dogan I., Pagilla K. R., Webster D. A., Stark B. C. Expression of *Vitreoscilla hemoglobin* in *Gordonia amarae* enhances biosurfactant production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 33(8), 693–700.
118. Singer M. E., Finnerty W. R. Physiology of biosurfactant synthesis by *Rhodococcus* species H13-A. *Can. J. Microbiol.* 1990, 36(11), 741–745.
119. Kurane R., Hatamochi K., Kakuno T., Kiyohara M., Tajima T., Hirano M., Taniguchi Y. Chemical structure of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995, 59(9), 1652–1656.
120. Ron E. Z., Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 2001, 3(4), 229–236.
121. Pirog T. P., Grytsenko N. A., Homyak D. I., Konon A. D., Antonyuk S. I. Optimization of synthesis of biosurfactants of *Nocardia vaccinii* K-8 under bioconversion of biodiesel production waste. *Mikrobiol. Zh.*, 2011, 73(4), 15–24. (In Russian).
122. Pirog T. P., Antonuk S. I., Karpenko Y. V., Shevchuk T. A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis. *Prikl. Biokhim. Microbiol.* 2009, 45(3), 272–278. (In Russian).
123. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Voloshina I. N., Gregirchak N. N. Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil. *Prikl. Biokhim. Microbiol.* 2005, 41(1), 51–55. (In Russian).
124. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Voloshina I. N., Karpenko E. V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates. *Prikl. Biokhim. Microbiol.* 2004, 40(5), 470–475. (In Russian).
125. Bach H., Berdichevsky Y., Gutnick D. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69(5), 2608–2615.
126. Zhao Z., Wong J. W. C. Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Technol.* 2009, 30(3), 291–299.
127. Kim S. H., Lim E. J., Lee S. O., Lee J. D., Lee T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2000, 31 (3), 249–253.
128. Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. *Kharchova i pererobna promislovist.* 2013, 91(2), 149–157. (In Ukrainian).
129. Pirog T. P., Konon A. D., Skochko A. B. Microbial surface active substances use

- in biology and medicine. *Biotechnologiya*. 2011, 4(2), 24–38. (In Ukrainian).
130. Pirog T. P., Konon A. D., Sofilkanich A. P., Skochko A. B. Effect of biosurfactants *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 та *Rhodococcus erythropolis* EK-1 on some microorganisms. *Mikrobiol. Zh.* 2011, 73(3), 14–20. (In Ukrainian).
 131. Skochko A. B., Konon A. D., Pirog T. P. Research of antiadhesion properties of surface-active substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Kharchova promislolist.* 2012, N 13, P. 77–80. (In Ukrainian).
 132. Filyuk I., Sofilkanych A., Konon A., Parfenyuk S., Pirog T. Protective properties of surface-active substances of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Naukovi pratsi NUFT*. 2012, N 43, P. 36–31. (In Ukrainian).
 133. Pirog T. P., Shulyakova M. O., Shevchuk T. A., Sofilkanich A. P. Biotechnological potential of bacteria of *Rhodococcus* strain and their metabolites. *Biotechnologiya*. 2011, 5(2), 51–67. (In Ukrainian).
 134. Pirog T. A., Antonyuk S. I., Sorokina A. I. The influence of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 surface-active substances on the efficiency of microbial destruction of oil pollutants. *Mikrobiol. Zh.* 2009, 71(5), 8–13. (In Ukrainian).
 135. Pirog T. P., Homyak D. I., Grytsenko N. A., Sofilkanych A. P., Konon A. D., Pokora K. A. Bacteria of *Nocardia* genus as object of biotechnology. *Biotechnologiya*. 2013, 6(3), P. 23–35. (In Ukrainian).
 136. Takayama K., Wang C., Besra G. S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18(1), 81–101.
 137. Kuyukina M. S., Ivshina I. B., Philp J. C., Christofi N., Dunbar S. A., Ritchkova M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *J. Microbiol. Methods*. 2001, 46(2), 149–156.
 138. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Konon A. D., Shulyakova M., Iutinska G. Synthesis of surfactants *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 in the medium with glycerol. *Mikrobiol. Zh.* 2012, 74(1), 20–27. (In Russian).
 139. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Konon A. D., Dolotenko E. Yu. Production of surfactants by *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 grown on ethanol with organic acids. *Prikl. Biokhim. Microbiol.* 2012, 48(6), 569–576. (In Russian).
 140. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Shulyakova M. A. The influence of organic acids on biosurfactant synthesis by strain *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 strain on glycerol medium. *Biotechnologiya*. 2012, 5(4), 88–95. (In Ukrainian).
 141. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Shulyakova M. A., Tarasenko D. O. Influence of citric acid on synthesis of biosurfactants of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017. *Mikrobiol. Zh.*, 2011, 73(5), 21–27. (In Ukrainian).
 142. Homyak D. I., Grytsenko N. A., Konon A. D., Pirog T. P. The influence of organic acids on synthesis of surface-active substances under the conditions of growth of *Nocardia vaccinii* K-8 on glycerol. *Microbiol. i Biotechnol.* 2012, 1(17), 31–38. (In Ukrainian).
 143. Pirog T., Sofilkanych A., Shevchuk T., Shulyakova M. Biosurfactants of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017: synthesis intensification and practical application. *Prikl. Biokhim. Microbiol.* 2013, 170(4), 880–894. (In Russian).
 144. Pirog T. P., Ignatenko S. V. Scaling of the process of biosynthesis of biosurfactants by *Rhodococcus erythropolis* EK-1 on hexadecane. *Prikl. Biokhim. Microbiol.* 2011, 47(4), 393–399. (In Russian).
 145. Hu Y., Ju L. K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enz. Microb. Technol. Rev.* 2001, 29(10), 593–601.
 146. Cutler A. J., Light R. J. Regulation of hydroxydocosanoic acid sophorolipid production in *Candida bogoriensis* by the levels of glucose and yeast extract in the growth medium. *J. Biol. Chem.* 1979, 254(6), 1944–1950.
 147. Ito S., Inoue S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 43(6), 1278–1283.
 148. Batista R. M., Rufino R. D., Luna J. M., de Souza J. E., Sarubbo L. A. Effect of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil. *Water. Environ. Res.* 2010, 82(5), 418–425.
 149. De Gusmao C. A. B., Rufino R. D., Sarubbo L. A. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. *Antonie. Van. Leeuwenhoek.* 2010, 26(9), 1683–1692.
 150. Luna J. M., Rufino R. D., Albuquerque C. D., Sarubbo L. A., Campos-Takaki G. M. Economic optimized medium for tensio-active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12(4), 2463–2476.
 151. Luna J. M., Rufino R. D., Sarubbo L. A., Rodrigues L. R., Teixeira J. A., de Campos-Takaki G. M. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica*

- UCP 0995. *Curr. Microbiol.* 2011, 62(5), 1527–1534.
152. Rufino R. D., Luna J. M., Sarubbo L. A. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Coll. Surf. B. Biointerfaces.* 2011, 84(1), 1–5.
 153. Thaniyavarn J., Chianguthai T., Sangvanich P., Roongsawang N., Washio K., Morikawa M., Thaniyavarn S. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, 72(8), 2061–2068.
 154. Takahashi M., Morita T., Wada K., Hirose N., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Production of sophorolipid glycolipid biosurfactants from sugarcane molasses using *Starmerella bombicola* NBRC 10243. *J. Oleo. Sci.* 1998, 60(5), 267–273.
 155. Wadekar S., Kale S., Lali A., Bhowmick D., Pratap A. Sophorolipid production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects of activated earth treatment of the waste oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 2012, 89(6), 1029–1039.
 156. Wadekar S. D., Kale S. B., Lali A. M., Bhowmick D. N., Pratap A. P. Utilization of sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2012, 42(2), 125–142.
 157. Ribeiro I. A., Bronze M. R., Castro M. F., Ribeiro M. H. Optimization and correlation of HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS methods for identification and characterization of sophorolipids. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012, 899, 72–80.
 158. Price N. P., Ray K. J., Vermillion K. E., Dunlap C. A., Kurtzman C. P. Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. *Carbohydr. Res.* 2012, V. 348, P. 33–41.
 159. Kitamoto D., Akiba S., Hioki C., Tabuchi T. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. *Agric. Biol. Chem.* 1990, 54(1), 31–36.
 160. Rau U., Nguyen L. A., Schulz S., Wray V., Nimtz M., Roeper H., Koch H., Lang S. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 66(5), 551–559.
 161. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Discovery of *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, based on rDNA sequence. *Pseudozyma aphidis. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73(2), 305–313.
 162. Konishi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kakugawa K., Kitamoto D. Efficient production of mannosylerythritol lipids with high hydrophilicity by *Pseudozyma hu-beiensis* KM-59. *Pseudozyma aphidis. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 78(1), 37–46.
 163. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Yamamoto S., Kitagawa M., Sogabe A., Kitamoto D. Identification of *Pseudozyma graminicola* CBS 10092 as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. *J. Oleo. Sci.* 2008, 57(2), 123–131.
 164. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and their interfacial properties. *J. Biosci. Bioeng.* 2008, 105(5), 493–502.
 165. Fukuoka T., Morita T., Konishi M., Imura T., Kitamoto D. Characterization of new types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced from soybean oil by a basidiomycetous yeast, *Pseudozyma shanxiensis*. *J. Oleo. Sci.* 2007, 56(8), 435–442.
 166. Morita T., Ishibashi Y., Fukuoka T., Imura T., Sakai H., Abe M., Kitamoto D. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a smut fungus, *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009, 73(3), 788–792.
 167. Fukuoka T., Morita T., Konishi M., Imura T., Kitamoto D. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a novel glycolipid biosurfactant. The identification of a new diastereomer of mannosylerythritol lipid-B. *Carbohydr. Res.* 2008, 343(3), 555–560.
 168. Worakitkanchanakul W., Imura T., Fukuoka T., Morita T., Sakai H., Abe M., Rujiravanit R., Chavadej S., Minamikawa H., Kitamoto D. Aqueous-phase behavior and vesicle formation of natural glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid-B. *Coll. Surf. B. Biointerfaces.* 2008, 65(1), 106–112.
 169. Morita T., Ogura Y., Takashima M., Hirose N., Fukuoka T., Imura T., Kondo Y., Kitamoto D. Isolation of *Pseudozyma churashimaensis* sp. nov., a novel ustilaginomycetous yeast species as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. *J. Biosci. Bioeng.* 2011, 112(2), 137–144.
 170. Morita T., Takashima M., Fukuoka T., Konishi M., Imura T., Kitamoto D. Isolation of basidiomycetous yeast *Pseudozyma tsukubaensis* and production of glycolipid biosurfactant, a diastereomer type of mannosylerythritol lipid-B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 88(3), 679–688.
 171. Morita T., Ishibashi Y., Hirose N., Wada K., Takahashi M., Fukuoka T., Imura T., Sakai H., Abe M., Kitamoto D. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid B,

- from sugarcane juice by *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011, 75(7), 1371–1376.
172. Konishi M., Nagahama T., Fukuoka T., Morita T., Imura T., Kitamoto D., Hatada Y. Yeast extract stimulates production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma hubeiensis* SY62. *J. Biosci. Bioeng.* 2011, 111(6), 702–705.
173. Fukuoka T., Yanagihara T., Ito S., Imura T., Morita T., Sakai H., Abe M., Kitamoto D. Reverse vesicle formation from the yeast glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipid-D. *J. Oleo. Sci.* 2012, 61(5), 285–289.
174. Yamamoto S., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Yanagidani S., Sogabe A., Kitamoto D., Kitagawa M. The moisturizing effects of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, on human skin. *J. Oleo. Sci.* 2012, 61(7), 407–412.
175. Takahashi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, show antioxidant and protective effects against H₂O₂-induced oxidative stress in cultured human skin fibroblasts. *J. Oleo. Sci.* 2012, 61(8), 457–464.

МИКРОБНЫЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА. I. ГЛИКОЛИПИДЫ

Т. П. Пирог, А. Д. Конон

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Обзор посвящен поверхностно-активным веществам гликолипидной природы. Приведена общая характеристика, описана физиологическая роль рамнолипидов, трегалозолипидов, софоролипидов, маннозилэритритоллипидов и их традиционных продуцентов — представителей родов *Pseudozyma*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Candida*. Детально рассмотрены химическая структура, этапы биосинтеза и регуляции некоторых низкомолекулярных поверхностно-активных веществ гликолипидной природы. Обобщены экспериментальные данные авторов об интенсификации синтеза, физиологической роли и практическом использовании поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 и *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, которые по химической природе являются комплексом глико-, фосфо-, аминок- и нейтральных липидов (гликолипиды всех штаммов представлены трегалозомиколами).

Установлено, что поверхностно-активные вещества *R. erythropolis* IMV Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMV B-7241 и *N. vaccinii* IMV B-7405 обладают протекторными (защита клеток продуцента от действия тяжелых металлов), а также антимикробными и антиадгезивными свойствами. Показано, что поверхностно-активные вещества *R. erythropolis* IMV Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMV B-7241 и *N. vaccinii* IMV B-7405 в виде культуральной жидкости интенсифицируют деструкцию нефти в воде вследствие активации естественной нефтеокисляющей микрофлоры.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, гликолипиды, биосинтез, промышленные отходы.

MICROBIAL SURFACTANTS. I. GLYCOLIPIDS

T. P. Pirog, A. D. Konon

National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

The review is devoted to surface-active glycolipids. The general characteristics, the physiological role of the rhamnolipids, trehalose lipids, sophorolipids, mannosylerythritol lipids and their traditional producers — the representatives of the genera *Pseudozyma*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* and *Candida* are given. The detailed analysis of the chemical structure, the stages of the biosynthesis and the regulation of some low molecular glycolipids are done. The own experimental data concerning the synthesis intensification, the physiological role and the practical use of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants, which are a complex of the glyco-, phospho-, amino- and neutral lipids (glycolipids of all strains are presented by trehalose mycolates) are summarized.

It was found that *R. erythropolis* IMV Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMV B-7241 and *N. vaccinii* IMV B-7405 surfactants have protective, antimicrobial and antiadhesive properties. It was shown that *R. erythropolis* IMV Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMV B-7241 and *N. vaccinii* IMV B-7405 surfactants preparation of cultural liquid intensified the degradation of oil in water due to the activation of the natural petroleum-oxidizing microflora.

Key words: surfactants, glycolipids, biosynthesis, industrial waste.