

УДК 759.873.088.5:661.185

Т.П.ПИРОГ, Д.А. ТАРАСЕНКО

Национальный университет пищевых технологий, Киев, 01033

e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Влияние фумарата и цитрата на образование поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1

Изучено влияние фумарата (C_4 -дикарбоновой кислоты, предшественника глюконеогенеза) и цитрата (регулятора синтеза липидов) на образование поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане и этаноле. Модифицирован метод выделения ПАВ введением 1 М HCl в классическую систему растворителей (хлороформ – метанол), что позволило повысить в 2,5–3 раза количество экстрагируемых ПАВ.

Установлено, что одновременное внесение фумарата (0,2 %) и цитрата (0,1 %) в начале стационарной фазы роста бактерий сопровождается увеличением количества синтезированных ПАВ на 60–100 %, индекса эмульгирования – на 35–40 %, условной концентрации ПАВ – на 55–60 % по сравнению с показателями синтеза на среде без фумарата и цитрата. Полученные результаты свидетельствуют о возможности регуляции процессов биосинтеза ПАВ у *R. erythropolis* ЭК-1 и изменения их направленности в сторону образования ПАВ.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, культивирование, интенсификация биосинтеза, предшественники глюконеогенеза, регуляторы синтеза липидов

В предыдущих исследованиях нами было показано, что штамм *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, выделенный из загрязненной нефтью почвы, синтезирует поверхностно-активные вещества (ПАВ) на гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины) и гидрофильных (глюкоза, этанол) субстратах [1]. Установлены оптимальные для синтеза ПАВ условия культивирования продуцента на этаноле и гексадекане (концентрация источника углерода, соотношение углерод/азот, коэффициент массопереноса, длительность культивирования и т.д), позволяющие в три раза повысить синтез ПАВ [1, 2]. Показатели синтеза ПАВ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане сравнимы с синтезирующей способностью родококков, описанных в литературе [3–5]. Однако по сравнению с другими представителями рода *Rhodococcus* селекционированный нами штамм имеет следующие преимущества: 1) способен синтезировать ПАВ на среде с общим содержанием солей менее 3 г/л (для других родококков – до 10 г/л); 2) не требует наличия в среде микроэлементов и дрожжевого экстракта; 3) синтезирует ПАВ с более высоким выходом от субстрата; 4) синтезирует ПАВ при температуре 20°C.

Уровень образования ПАВ штаммом *R. erythropolis* ЭК-1 на среде с этанолом был ниже, чем на гексадекане [1, 2]. Однако следует отметить, что в публикациях последних лет, касающихся проблем промышленного получения ПАВ [6] отмечается, что несмотря на замечательные свойства микробных ПАВ и их существенные преимущества перед синтетическими аналогами, коммерческим интересом к этим продуктам микробного синтеза на современном мировом рынке, факторами, сдерживающими их промышленное получение, являются: 1) высокие затраты на культивирование продуцентов (сырье, энергетика); 2) дорогостоящая процедура извлечения ПАВ из культуральной жидкости; 3) низкая концентрация ПАВ в культуральной жидкости. Поэтому исследования, направленные на решение этих проблем, являются актуальными и приоритетными в биотехнологии микробных ПАВ.

Одним из вариантов повышения эффективности технологий микробных ПАВ может быть замена дорогостоящих водонерастворимых гидрофобных субстратов на более дешевый и технологичный этанол. Однако в литературе практически отсутствуют данные о способности микроорганизмов синтезировать метаболиты с поверхностно-активными свойствами при культивировании на этаноле. Имеются сообщения о способности представителей рода *Rhodococcus* расти на этаноле [7, 8], но не синтезировать ПАВ при культивировании на этанолсодержащих средах. Другим подходом к интенсификации образования микробных ПАВ может являться внесение экзогенных предшественников их биосинтеза в среду культивирования продуцента.

В связи с этим целью настоящей работы было исследование влияния предшественников на синтез ПАВ при культивировании штамма *R. erythropolis* ЭК-1 на этаноле и гексадекане.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объект исследований. В работе использовали штамм *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 [1, 2], депонированный в Депозитарии Института микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины под номером Ас-5017.

Культивирование *R. erythropolis* ЭК-1. Бактерии выращивали на следующих жидких минеральных средах: среда 1, г/л (KNO_3 – 1,0; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, pH 6,8 – 7,0) и среда 2, г/л (KH_2PO_4 – 6,8; NaOH – 1,0; NH_4NO_3 – 0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, pH 6,8–7,0). В качестве источника углерода и энергии использовали этанол и гексадекан в концентрации 2 % (по объему).

В качестве предшественников синтеза ПАВ использовали цитрат натрия в концентрации 0,1-0,5 % и фумарат натрия в концентрации 0,1–0,3 %. Цитрат натрия и фумарат натрия вносили в среду в виде 10 %-ных

растворов. Внесение предшественников синтеза ПАВ осуществляли в начале процесса культивирования, а также при выходе культуры на стационарную фазу роста.

Поскольку цитрат и фумарат являются дополнительными источниками углеродного питания, и при добавлении их в среду меняется не только концентрация углерода, но и соотношение C/N, в контрольных вариантах осуществляли коррекцию содержания основного источника углеродного питания (гексадекана, этанола). Цель коррекции – ввести эквимольное количество углерода для обеспечения стабильности оптимального соотношения углерод/азот в среде культивирования продуцента.

Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл с 200 мл среды на качалке (320 об/мин) при 28–30°C в течение 120 и 168 ч.

В качестве инокулята использовали культуру из экспоненциальной фазы роста, выращенную на жидких средах 1 и 2, содержащих 1 % (по объему) гексадекана или 1 % (по объему) этанола. Количество посевного материала составляло 5 % от объема среды.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на абсолютно сухой вес по калибровочному графику (в случае гомогенной суспензии) или весовым методом (в случае образования конгломератов клеток). При определении биомассы весовым методом перед осаждением клеток осуществляли двухкратную отмывку культуральной жидкости гексаном для удаления остаточного гексадекана. Необходимость этой операции обусловлена соосаждением части гексадекана с клетками, что завышает значения биомассы.

Определение показателей синтеза ПАВ. Способность к синтезу ПАВ оценивали по следующим показателям [1, 2]:

1) поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, которое измеряли с помощью платиновой или стеклянной пластинки по методу Вильгельми. Значение σ_s является качественным

показателем, свидетельствующем только о наличии ПАВ в культуральной жидкости;

2) для экспресс-оценки количественного содержания ПАВ в культуральной жидкости использовали показатель условной концентрации ПАВ (ПАВ*), который определяли как степень разведения свободной от клеток культуральной жидкости (супернатанта) до точки ККМ (критическая концентрация мицеллообразования). Строили график зависимости поверхностного натяжения σ_s от значения логарифма разведения супернатанта. Абсцисса точки перегиба кривой соответствует значению ПАВ*. Условная концентрация ПАВ выражается в безразмерных единицах.

3) индекс эмульгирования (E_{24} , %), который определяли для культуральной жидкости, разбавленной в 50 раз. К 5 мл раствора культуральной жидкости добавляли 5 мл эмульгируемого субстрата и встряхивали в течение 2 мин. Измерение индекса эмульгирования (E_{24}) определяли через 24 ч как величину отношения высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в пробирке и выражали в процентах. В качестве субстрата для эмульгирования использовали подсолнечное масло.

4) содержание ПАВ в культуральной жидкости (г/л), которое определяли весовым методом после экстракции поверхностно-активных липидов модифицированной смесью Фолча.

Модификация весового метода количественного определения ПАВ.

Учитывая, что штамм *R. erythropolis* ЭК-1 синтезирует комплекс полярных и неполярных липидов [1, 2], а известный метод Блайя и Дайера [9], применяемый для выделения ПАВ, позволяет извлекать в основном неполярные липиды, мы модифицировали классическую систему растворителей (смесь Фолча) введением в нее 1 М HCl (хлороформ – метанол – вода = 4:3:2). Такая система позволяет максимально полно извлекать как полярные, так и неполярные липиды.

Культуральную жидкость, полученную после культивирования *R. erythropolis* ЭК-1, центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин для отделения биомассы.

25 мл супернатанта помещали в цилиндрическую делительную воронку объемом 100 мл, добавляли 5 мл 1 М раствора соляной кислоты, воронку закрывали пришлифованной пробкой и встряхивали 3 мин, затем добавляли еще 4 мл 1 М раствора соляной кислоты и 16 мл смеси хлороформа и метанола (2:1) и встряхивали (экстрагировали липиды) в течение 5 мин. Полученную после экстракции смесь оставляли в делительной воронке для разделения фаз, после чего нижнюю фракцию сливали (органический экстракт 1), а водную фазу подвергали повторной экстракции. При повторной экстракции к водной фазе добавляли 9 мл 1 М раствора соляной кислоты и 16 мл смеси хлороформа и метанола (2:1) и экстрагировали липиды в течение 5 мин. После разделения фаз сливали нижнюю фракцию, получая органический экстракт 2. На третьем этапе к водной фазе добавляли 25 мл смеси хлороформа и метанола (2:1) и осуществляли экстракцию, как описано выше, получая органический экстракт 3. Экстракты 1–3 объединяли и упаривали на роторном испарителе ИР-1М2 (Россия) при температуре 50 °С и абсолютном давлении 0,4 атм до постоянной массы.

Все опыты проводили в трех повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от трех до пяти. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Лакину [10]. Результаты исследований согласно t-критерия Стьюдента оказались статистически достоверными при 5%-ном уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было установлено, что ПАВ, синтезируемые штаммом *R. erythropolis* ЭК-1, содержат в составе глико-, фосфо- и нейтральные липиды, образующие комплекс с соединениями полисахаридно-белковой природы [1, 2]. Исходя из химической природы ПАВ, мы предположили, что

можно повысить эффективность процесса их биосинтеза путем внесения в среду цитрата натрия – регулятора синтеза липидов и C₄-дикарбоновых кислот (фумарата) – предшественников глюконеогенетической ветви обмена веществ, функционирующей при выращивании бактерий на неуглеводных субстратах.

Влияние предшественников на эффективность синтеза ПАВ при культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 на гексадекане. На первом этапе исследований определяли оптимальную концентрацию экзогенных предшественников биосинтеза ПАВ и время их внесения в среду культивирования бактерий, содержащую гексадекан. Результаты, представленные в табл. 1 и 2, свидетельствуют о том, что добавление как фумарата, так и цитрата в ростовую среду в начале процесса культивирования продуцента не сопровождалось увеличением условной концентрации ПАВ по сравнению с выращиванием *R. erythropolis* ЭК-1 на среде без предшественников. Однако при этом наблюдали повышение на 11–30 % индекса эмульгирования разбавленной в 50 раз культуральной жидкости (табл. 1 и 2), а также увеличение уровня биомассы.

При внесении 0,2 % фумарата в начале стационарной фазы роста бактерий повышались показатели синтеза поверхностно-активных веществ. Так, условная концентрация ПАВ к концу культивирования достигала значения 5,2–5,7, т.е. увеличивалась на 42–46 % по сравнению с выращиванием штамма на среде без фумарата (табл. 1). В то же время при использовании такой концентрации фумарата индекс эмульгирования увеличивался незначительно (на 9–10 %). Добавление 0,1 % цитрата в начале стационарной фазы роста сопровождалось незначительным (на 10–11 %) повышением показателя ПАВ* и существенным (на 48–52 %) увеличением индекса эмульгирования (табл. 2). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что экзогенный фумарат расходуется в основном на образование метаболитов с поверхностно-активными свойствами, а цитрат – на синтез метаболитов, обладающих эмульгирующими свойствами.

Следует отметить, что потребление фумарата и цитрата клетками *R. erythropolis* ЭК-1 сопровождалось повышением рН культуральной жидкости до 9,0–9,4, что может свидетельствовать о транспорте предшественников в клетки данных бактерий путем симпорта с протоном. При проведении экспериментов мы не осуществляли нейтрализацию культуральной жидкости в течение процесса культивирования *R. erythropolis* ЭК-1. Можно предположить, что при поддержании рН на оптимальном для продуцента уровне эффективность превращения предшественников в метаболиты с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами окажется выше.

На следующем этапе осуществляли совместное внесение фумарата (0,2 %) и цитрата (0,1 %) в начале стационарной фазы роста бактерий (рисунок, а). Как видно из представленных данных, в присутствии обоих предшественников биосинтеза в среде культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 условная концентрация ПАВ* повышалась на 55 % (до 4,0–4,5), индекс эмульгирования – на 40 % (до 65 %), количество синтезированных ПАВ – почти на 60 % (до 6,5–7,0 г/л) по сравнению с выращиванием штамма на среде без фумарата и цитрата.

В ходе исследований нами было установлено, что при использовании модифицированной системы растворителей для экстракции ПАВ, синтезируемых *R. erythropolis* ЭК-1, количество выделенных ПАВ удается повысить в 2–2,5 раза по сравнению с использованием классической системы растворителей. Так, например, определяемая классическим методом Блайя и Дайера [9] концентрация ПАВ после культивирования продуцента на среде с гексадеканом в присутствии обоих предшественников биосинтеза составляла 2,5–3 г/л, а определяемая модифицированным нами методом – 6–7 г/л.

Интенсификация синтеза ПАВ в процессе роста *R. erythropolis* ЭК-1 на этаноле. Установлено, что внесение фумарата и цитрата (0,1 – 0,3 %) в среду с этанолом в начале процесса культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 сопровождалось повышением уровня биомассы. При этом практически для

всех исследуемых концентраций предшественников наблюдали снижение условной концентрации ПАВ и количества синтезированных поверхностно-активных веществ (табл. 3). Лишь при концентрации фумарата 0,2 % значение ПАВ* несколько превышало этот показатель в контрольном варианте (3,3–3,5 и 2,9–3,1 соответственно). Индекс эмульгирования во всех вариантах практически не изменялся.

Введение предшественников биосинтеза в начале стационарной фазы роста приводило к интенсификации синтеза ПАВ (табл. 3). Так, в присутствии фумарата условная концентрация ПАВ повышалась до 4,0–4,4 (в 1,4 раза по сравнению с контролем), количество ПАВ – до 1,3–1,5 г/л, а индекс эмульгирования достигал 72–78 %.

В присутствии в среде с этанолом цитрата наблюдали повышение синтеза метаболитов с эмульгирующими свойствами, о чем свидетельствовало увеличение индекса эмульгирования культуральной жидкости до 85–95 %, при этом условная концентрация ПАВ оставалась на уровне контрольного варианта (табл. 3).

При совместном внесении фумарата (0,2 %) и цитрата (0,1 %) в начале стационарной фазы роста *R. erythropolis* ЭК-1 фиксировали увеличение всех показателей синтеза ПАВ (рисунок, б). Так, условная концентрация ПАВ повышалась на 60 %, индекс эмульгирования – на 35 %, а количество синтезированных ПАВ – на 102 %.

Обсуждение результатов. Известно, что одним из высокоэффективных и чрезвычайно специфических методов регуляции метаболизма у микроорганизмов является использование или предшественников биосинтеза целевых продуктов, или ключевых интермедиатов конкретных метаболических путей [11–16].

Так, в предыдущих исследованиях нами была установлена возможность интенсификации синтеза микробного экзополисахарида этаполана (продуцент *Acinetobacter* sp.В-7005) за счет внесения в среду C₄-дикарбоновых кислот – интермедиатов метаболизма этанола, вовлекаемых в

глюконеогенез. Показано, что при дробном внесении fumarата калия (порциями по 0,2 %) в среду с этанолом в стационарной фазе роста бактерий происходит стехиометрическое превращение его в полисахарид. При этом количество синтезированного этаполана увеличивается в 4–5 раз и составляет 10–15 г/л, а выход его от использованного субстрата (этанол+fumarат) достигает 80 % [13]. Введение в среду культивирования предшественников повышает синтез макролидных антибиотиков [15, 16].

В 80–90-х годах XX ст. рядом исследователей было установлено стимулирующее влияние цитрата натрия на образование ПАВ микроорганизмами [11, 12, 17]. Известно, что цитрат является эффективным стимулятором липогенеза, особенно у липид-синтезирующих дрожжей [17, 18]. В связи с этим его наличие в питательной среде приводит к увеличению синтеза ПАВ липидной природы. Такой эффект можно объяснить активирующим влиянием цитрата натрия на фермент ацетил-КоА-карбоксилазу, катализирующего превращение ацетил-КоА- в малонил-КоА, что в свою очередь сопровождается увеличением синтеза жирных кислот а, следовательно, и липидных ПАВ [19]. В работе [20] показано, что цитрат является важным эффектором ацетил-КоА-карбоксилазы. Так, в присутствии 1 мМ цитрата активность этого фермента повышается на 40 %.

Наши экспериментальные результаты по влиянию предшественников на синтез ПАВ у штамма *R.erythropolis* ЭК-1 несколько отличаются от описанных в литературе. Во-первых, в литературе описано увеличение синтеза ПАВ при наличии в среде только цитрата, который вносили в начале процесса культивирования [12, 14, 17, 21, 22]. Во-вторых, оптимальная концентрация цитрата при этом составляла 0,5–1,0 %. При такой концентрации цитрат можно рассматривать не как регулятор синтеза липидов, а как дополнительный ростовой субстрат. В-третьих, в присутствии цитрата повышение количества синтезированных ПАВ коррелировало с увеличением показателя условной концентрации ПАВ. Мы установили, что у штамма у *R.erythropolis* ЭК-1 цитрат стимулировал только синтез

метаболитов с эмульгирующими свойствами и только при внесении его в начале стационарной фазы роста бактерий в концентрации 0,1 %. Так, добавление цитрата в среду культивирования *R.erythropolis* ЭК-1 сопровождалось существенным повышением индекса эмульгирования (на 50 %), однако при этом количество низкомолекулярных липидных ПАВ, экстрагируемых из культуральной жидкости органическими растворителями либо увеличивалось незначительно (на 7–8 % на среде с гексадеканом), либо даже снижалось (на 10 % на среде с этанолом). Эти результаты могут свидетельствовать, во-первых, о липидной природе эмульгатора, синтезируемого *R.erythropolis* ЭК-1, а во-вторых, о его более высокой молекулярной массе. Однако ответы на эти вопросы будут получены только после проведения дальнейших исследований по выделению и изучению химического состава эмульгатора *R.erythropolis* ЭК-1, а также по установлению механизмов, обеспечивающих повышение его синтеза в присутствии цитрата. Следует отметить, что согласно литературным данным, повышение синтеза сурфактина у *Bacillus subtilis* при наличии в среде цитрата натрия коррелирует со снижением изоцитратдегидрогеназной активности в клетках бактерий, что в свою очередь, свидетельствует о направлении потока углерода субстрата на процессы конструктивного метаболизма, т.е. на синтез ПАВ [12]. В то же время для дрожжей *Torulopsis apicola* – продуцента поверхностно-активных гликолипидов установлено, что механизм действия цитрата натрия, вносимого в среду культивирования, состоит в поддержании рН на оптимальном для синтеза ПАВ уровне за счет подщелачивания культуральной жидкости в результате транспорта цитрата путем симпорта с протоном, что и обеспечивает увеличение синтеза ПАВ [21]. Аналогичное действие на синтез ПАВ *Torulopsis apicola* оказывали соли и других органических кислот (сукцината, тартрата и малоната).

На сегодняшний день в литературе практически отсутствуют данные о влиянии C₄-дикарбоновых кислот – предшественников глюконеогенеза на синтез ПАВ. Известно, что внесение солей органических кислот цикла

Кребса (сукцината и фумарата в концентрации 0,5 %) в среду культивирования *Bacillus subtilis* С-14 в начале процесса культивирования сопровождалось повышением количества синтезируемых ПАВ в 1,5–2 раза [22]. При этом наблюдали также увеличение уровня биомассы, индекса эмульгирования и показателя условной концентрации ПАВ. Однако механизм действия исследуемых органических кислот автором не установлен. Вполне вероятно, что он аналогичен описанному в работе [21], т.е. состоит в регуляции рН и поддержании его значения на оптимальном для образования ПАВ уровне. В данном случае фумарат можно рассматривать также и как предшественник биосинтеза для *Bacillus subtilis* С-14, поскольку данный штамм синтезирует комплекс поверхностно-активных веществ (липопептиды) и эмульгатора углеводной природы [22].

Нами установлено, что внесение фумарата (0,2 %) в среду культивирования *R.erythropolis* ЭК-1 в начале стационарной фазы роста бактерий сопровождалось увеличением всех показателей синтеза ПАВ как на этаноле, так и гексадекане. Однако максимальное увеличение синтеза ПАВ было отмечено при одновременном внесении в среду фумарата и цитрата. Следует отметить, что нам не удалось обнаружить в литературе данных о повышении уровня образования ПАВ в присутствии как цитрата (регулятора синтеза липидов), так и С₄-дикарбоновых кислот (предшественников глюконеогенеза).

Таким образом, в процессе проведенной работы показана возможность интенсификации образования ПАВ штаммом *R.erythropolis* ЭК-1 при внесении в среду с гексадеканом или этанолом предшественников биосинтеза метаболитов липидной и углеводной природы. Установлены оптимальные концентрации цитрата и фумарата (0,1 и 0,2 % соответственно), внесение которых в среду с этанолом или гексадеканом в начале стационарной фазы роста обеспечивает повышение на 40–100 % показателей синтеза ПАВ штаммом *R.erythropolis* ЭК-1.

Полученные данные свидетельствуют о возможности изменения направленности метаболических процессов у *R. erythropolis* ЭК-1 в сторону синтеза поверхностно-активных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.В. // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40. – №5. – С. 544–550.
2. Пирог Т.П., Волошина И.Н., Игнатенко С.В., Вильданова-Марцишин Р.И. // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – №6. – С.27–36.
3. Desai J.D., Banat I.M. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – V. – 61. – N 1. – P. 47–64.
4. Lang S., Philp J.C. // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – V. 74. – P. 59–70.
5. Rosenberg E., Ron E.Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 52. – P. 154–162.
6. Soumen Mukherjee, Palashpriya Das and Ramkrishna Sen. // Trends in Biotechnology. – 2006. – V.24. – N.11 – P. 354–359.
7. 19. de Carvalho C., Parreno-Marchante B., Neumann G. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – V. 67. – P. 383–388.
8. 20. de Carvalho C., da Fonseca M. // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005. – V. 51. – P. 388–399.
9. Биохимические исследования мембран / Под ред. Э. Медди. М.: Мир. – 1979. – 300 с.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа. – 1990. – 352 с.
11. Stuwer o., Hommel R., Haferburg D., Kleber H.P. // J. Biotechnology. – 1987. – V. 6. – P. 259–269.
12. de Roubin M.R., Mulligan C.N., Gibbs B.F. // Can. J. Microbiol. – 1989. – V. 35. – N 9. – P. 854–859.

13. Малащенко Ю.Р., Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э. // Микробиол. журн. – 1993. – Т. 55. – N 2. – С. 35–41.
14. Вильданова-Марцишин Р.И. Биосинтез поверхностно-активных веществ штаммами *Rhodococcus fascians* ВКМ АС-1169, *Rhodococcus fascians* ВКМ АС-1163 и *Pseudomonas* sp. PS-17. Дисс...канд. биол. наук. – Киев: Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 2004. – 155 с.
15. Навашин М.С., Федоренко В.А., Настасян И.Н. и др. // Антибиот. и химиотер. – 1990. – Т. 35. – N 12. – С. 34–38.
16. Миронов В.А., Сергеева А.В., Воронкова В.В., Даниленко В.Н. // Антибиот. и химиотер. – 1997. – Т. 42. – N 3. – С. 31–36.
17. Лесык О.Ю., Елисейев С.А., Полулях О.В., Карпенко Ю.В. // Микробиол. журн. – 1991. – Т. 53. – N 2. – С. 36–40.
18. Evans C.T., Ratledge N. // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. – 1985. – V.3. – P. 349–375.
19. Kosaric N., Cairns W.L., Cray N.C.C. // JACS. – 1984. – V.16. –N 11. – P.1735–1743.
20. Herbert D., Price L.J., Alban C., et al. // Biochem. J. – 1996. – V. 318. – P. 997–1006.
21. Stuver O., Hommel R., Haferburg D., Kleber H.P. // J. Biotechnol. – 1987. – V. 6. – P. 259–269.
22. Шульга А.Н. Поверхностно-активные соединения, образуемые культурой бактерий *Bacillus subtilis* С-14 . Дисс...канд. биол. наук. – Киев: Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1993. – 163 с.