

УДК 759.873.088.5:661.185

МІКРОБНІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ: ПРОБЛЕМИ ПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

(Огляд літератури)

Т.П. Пирог, С.В. Ігнатенко

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

E-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, технологія біосинтезу, ефективність виробництва, промислові відходи, умови культивування, мікроорганізми-продуценти, виділення цільового продукту

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) використовуються у багатьох галузях народного господарства, зокрема для підвищення нафтовидобутку, надання специфічних смакових і структурних властивостей продуктам харчування, створення нових високоефективних форм фармацевтичних препаратів, а також у процесах біоремедіації екосистем [1-4]. Такого широкого застосування мікробні ПАР набули завдяки біодеградабельності, низькій токсичності, стабільності фізико-хімічних властивостей у широкому діапазоні рН і температури тощо [5].

Незважаючи на комерційно привабливі властивості мікробних ПАР та їх значні переваги порівняно з синтетичними аналогами, промислове виробництво цієї групи речовин в Україні до теперішнього часу не реалізовано, а факторами, що стримують впровадження технологій мікробних ПАР у світі є високі витрати на біосинтез (сировина, енергетика), виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо висока концентрація синтезованих ПАР [5,6].

У зв'язку з цим потенційними шляхами підвищення ефективності технологій мікробних ПАР є такі:

- використання дешевих ростових субстратів (продуктів переробки основної сировини або відходів різних галузей промисловості);

- оптимізація умов культивування продуцента та пошук нових рентабельних методів виділення та очищення ПАР;

- одержання мутантних і рекомбінантних штамів мікроорганізмів-надсинтетиків ПАР.

На теперішній час дослідниками активно реалізуються перші два підходи, у той час як використання рекомбінантних штамів-продуцентів ПАР до недавнього часу не розглядалося як ефективний інструмент зниження собівартості виробництва мікробних ПАР.

Альтернативні субстрати для одержання мікробних поверхнево-активних речовин

Відомо, що для переважної більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів поживного середовища становить близько 20–30 % загальних витрат на виробництво [7]. У зв'язку з цим одним із шляхів зниження собівартості цільового продукту є використання як ростових субстратів дешевої промислової сировини (наприклад, жирів рослинного походження), а також відходів харчової промисловості (оліє-жирової, спиртової, молочної) та сільськогосподарського сектору (крохмалевмісні речовини) [7-9].

У ряді робіт [10-12] було показано, що жири рослинного походження можуть використовуватися як ефективна та дешева сировина для синтезу ПАР. Так, соняшникова, соєва, рапсова, кукурудзяна олії можуть слугувати субстратами для синтезу рамноліпідів, софороліпідів, манозоліпідів (табл. 1) [13-15]. Проте ці сполуки є харчовою сировиною, що обмежує їх застосування у біотехнологічних процесах. З дешевих рослинних нехарчових олій потенційними субстратами для синтезу ПАР є, наприклад, касторова олія та олія жожоба [15].

Крім різних рослинних олій субстратами для одержання ПАР можуть бути побічні продукти їх виробництва. Так, показана можливість використання відходів виробництва соєвої та соняшникової олії для синтезу рамноліпідів штамми *Pseudomonas aeruginosa* AT10 та *P. aeruginosa* LB1 [16-18, 19]. За присутності у середовищі культивування *Candida antarctica* та *C. apicola* відходів виробництва

соняшникової олії кількість синтезованих гліколіпідів становила 10,5 та 13,4 г/л відповідно [20].

Промислові жировмісні відходи інших галузей, зокрема стічні води м'ясопереробної промисловості, відходи миловарного виробництва, можуть також слугувати потенційними субстратами для синтезу ПАР. Варто зауважити, що такі субстрати є доступними у необхідних кількостях та дешевими, що повністю виключає залежність виробництва ПАР від сировинної бази.

У літературі є повідомлення про використання для синтезу ПАР відходів молочної промисловості, зокрема, сироватки ПАР [21,22]. Так, під час культивування *Pseudomonas aeruginosa* BS2 на середовищі з сирною сироваткою кількість синтезованих рамноліпідів становить 0,92 г/л, що перевищує показники синтезу ПАР на синтетичних середовищах. Використання сироватки як субстрату може вирішити проблему утилізації цього відходу молочної промисловості та суттєво знизити витрати на виробництво ПАР.

Як альтернативну сировину для виробництва ПАР також застосовують крохмалевмісні відходи. Так, синтез ліпопептидів *Bacillus subtilis* здійснюють на середовищах, які містять відходи картоплепереробних виробництв [23-26]. Побічний продукт виробництва борошна з маніюки є субстратом для синтезу сурфактину *Bacillus subtilis* ATCC 21332 та *B. subtilis* LB5a [27-29]. За використання такого субстрату кількість ліпопептидів досягає 2,2 – 3,0 г/л. Субстратами для виробництва ПАР можуть слугувати такі крохмалевмісні речовини як рідкі відходи переробки рису, обробки злаків, патоки, кукурудзяного борошна.

Наші дослідження показали можливість використання для синтезу поверхнево-активних речовин гідрофільних субстратів (етанол, гліцерин), які порівняно з гідрофобними сполуками мають такі переваги: по-перше, вони є водорозчинним і тому технологічнішими, по-друге, ці субстрати значно дешевші.

Із забруднених нафтою зразків ґрунту і води нами було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, *Nocardia vaccinii* K-8, *Rhodococcus erythropolis* EK-1 [30] і встановлено здатність цих штамів синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгувальними

властивостями під час росту на різних гідрофобних і гідрофільних субстратах [31, 32].

Слід зазначити, що бактерії родів *Rhodococcus* і *Acinetobacter* ростуть на етанолі [33-35], проте до теперішнього часу відсутні дані про синтез ними ПАР на цьому субстраті. Відомості про утворення поверхнево-активних речовин представниками роду *Nocardia* навіть на гідрофобних субстратах є дуже обмеженими [36, 37].

Результати наших досліджень показали, що штам *R. erythropolis* ЕК-1 під час росту на етанолі синтезує ПАР у незначних кількостях [31]. Поверхневий натяг культуральної рідини (σ) становив 50-55 мН/м, умовна концентрація ПАР (ПАР*) досягала 1,1-1,2, а концентрація ПАР – 0,4-0,43 г/л, тоді як під час росту культури на гідрофобних субстратах ці показники були значно вищими. Подальші експерименти показали, що заміна амонійного джерела азоту на нітратне у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1, підвищення концентрації етанолу до 2 %, підтримання співвідношення вуглець/азот на рівні 36:1 дали змогу збільшити показники синтезу ПАР у три рази.

Максимальний синтез ПАР у процесі культивування *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі (умовна концентрація ПАР 3,6; емульгувальна активність розбавленої у 50 раз культуральної рідини 96 %) спостерігався за наявності як джерела азоту у середовищі сечовини, а також дріжджового автолізу та мікроелементів, співвідношенні С/Н 60:1 і використанні інокуляту з кінця експоненційної фази росту у концентрації 10 % [32].

На теперішній час одним з найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах є гліцерин – побічний продукт, утворюваний у великих кількостях при виробництві біодизелю з рослинної і тваринної сировини [38]. Так, під час одержання 100 л біодизелю утворюється (як продукт трансестерифікації рослинних олій і тваринних жирів) до 10 л гліцерину [38]. Неможливість використання в інших технологіях такої величезної кількості гліцерину є на теперішній час найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизелю у світі. Одним із шляхів утилізації гліцерину може бути використання

його як джерела вуглецю і енергії при розробці технологій мікробного синтезу практично цінних метаболітів.

Наші експерименти показали можливість синтезу ПАР у процесі вирощування штаму *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцерині. Встановлено умови культивування *N. vaccinii* К-8 на середовищі з 0,5 % гліцерину, в яких показники синтезу ПАР підвищувалися у кілька разів (неопубліковані дані). Так, умовна концентрація ПАР досягає значень 4,2-5,0 за наявності у середовищі іонів заліза і дріжджового автолізу, використанні інокуляту, вирощеного на гліцерині до середини експоненційної фази росту, тривалості культивування 168 год.

Ефективні і економічно обгрунтовані методи виділення та очищення поверхнево-активних речовин

Одним із найважливіших факторів, що визначає рентабельність будь-якого біотехнологічного виробництва, є метод виділення та очищення цільового продукту. Для багатьох продуктів мікробного синтезу витрати на очищення становлять приблизно 60 % загальних витрат на виробництво. Для виділення поверхнево-активних речовин у промисловості використовується ряд традиційних методів, зокрема, кислотне осадження, екстракція органічними розчинниками, кристалізація, осадження сульфатом амонію, центрифугування тощо [5]. За останні роки було розроблено кілька нових методів для виділення позаклітинних ПАР: ультрафільтрація, сорбція на полістирольних матрицях та активованому вугіллі, іонообмінна хроматографія (табл. 2) [39-41]. Основною перевагою цих методів є можливість організації безперервного технологічного процесу та одержання високоочищених ПАР.

Слід зазначити, що у хроматографічних методах для здійснення процесів десорбції використовуються високотоксичні органічні розчинники (ацетон, метанол, хлороформ). За останні роки в промисловості почали успішно застосовувати альтернативні розчинники типу метил-трет-бутилового етеру. Зокрема, така технологія застосовується для виділення та очищення ПАР, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus* [42, 43]. Ці розчинники є дешевими

менш і токсичними, що дає змогу суттєво скоротити витрати на фінішних стадіях виділення ПАР та мінімізувати потенційну екологічну небезпеку. Ці переваги запропонованих розчинників надають можливість створення на їх основі конкурентноздатніших технологій.

У ряді випадків використання одного методу є недостатнім для повного виділення ПАР чи одержання високоочищених препаратів. Тому на теперішній час широко застосовуються багатоступеневі схеми, що включають кілька послідовних етапів концентрування культуральної рідини (її супернатанту) та очищення ПАР від супутніх домішок [40]. Така схема дає змогу одержувати поверхнево-активні препарати різного ступеня чистоти. Так, наприклад, сконцентрована культуральна рідина або неочищені препарати ПАР, одержані на перших стадіях технологічного процесу, характеризуються низькою вартістю і можуть використовуватися у нафтовидобувній, текстильній галузях та для очищення екосистем від нафтових забруднень. Натомість високоочищені препарати ПАР, що застосовуються виключно у фармацевтичній, харчовій, косметичній промисловості, можуть бути одержані в результаті додаткових етапів очищення вихідних напівпродуктів. Така багатоступенева технологія повинна впроваджуватися на підприємствах, що виробляють продукцію для широкого спектру галузей промисловості.

Мутантні і рекомбінантні штами – над синтетики поверхнево-активних речовин

Окрім оптимізації складу поживного середовища та умов культивування, вибору ефективного методу виділення цільового метаболіту, комерційна складова будь-якого біотехнологічного процесу залежить від потенційних можливостей штаму-продуцента. У сучасних умовах промислові масштаби виробництва потребують використання нових високоактивних мутантних і рекомбінантних штамів, здатних до максимально повної трансформації субстратів у поверхнево-активні речовини. Використання таких „модифікованих” продуцентів дасть змогу підвищити ефективність технологічного процесу та одержувати ПАР із заданими властивостями. Для одержання надпродуцентів ПАР використовуються транспозони

[50], іонізуюче випромінювання [51], хімічні мутагени типу N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин [52], або процеси селекції на основі резистентності до іонних детергентів [47] тощо (табл. 3.)

За останні роки було одержано ряд високоефективних рекомбінантних штамів-надсинтетиків ПАР. Так, з використанням як вектора плазмиди pC112 сконструйовано штам *Bacillus subtilis* МІ 113 введенням гену *lpa-14*, відповідального за синтез сурфактину [53]. На середовищах із соєвим борошном рекомбінантний штам синтезував у 8 разів більше сурфактину ніж вихідний. Створено ряд рекомбінантних штамів *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* - надсинтетиків рамноліпідів [54].

Застосування генно-інженерних методів дає змогу не тільки підвищити продуктивність штамів, а й змінювати хімічний склад синтезованих ними поверхнево-активних речовин. Так, зміна нуклеотидної послідовності гена, що кодує синтез сурфактину, супроводжувалась зміною складу ферментного комплексу і, як наслідок, синтезом нового ПАР (ліхенізин) штамом *Bacillus subtilis* [55].

Відомо, що *Pseudomonas aeruginosa* (продуцент рамноліпідів) не здатний використовувати для росту і біосинтезу ПАР лактозу. Введення у клітини бактерій гену *lacZY* з *Escherichia coli* дало змогу створити штами, які синтезувати рамноліпід на середовищі з молочною сироваткою [56].

Нещодавно було створено новий рекомбінантний штам *Gordonia amarae* введенням стійкого гену гемоглобіну (*vgb*), що дало змогу у чотири рази підвищити синтез трегалозоліпідів [57].

Фізіологічні основи регуляції синтезу поверхнево-активних речовин

Ще одним підходом до підвищення ефективності технологій одержання продуктів мікробного синтезу є внесення екзогенних попередників у середовище культивування продуцента. Так, раніше нами було показано можливість інтенсифікації синтезу мікробного полісахариду етаполану добавленням у середовище C₄-дикарбонових кислот – інтермедіатів метаболізму етанолу, які є попередниками глюконеогенезу [58]. З літератури відомо, що за присутності

попередників підвищується синтез макролідних антибіотиків [59, 60]. У 80–90-х роках ХХ ст. дослідниками було встановлено стимулювальний вплив цитрату натрію на утворення ПАР мікроорганізмами [61-63]. Такий ефект пояснюють активуючим впливом цитрату на фермент ацетил-КоА-карбоксилазу, який каталізує перетворення ацетил-КоА на малоніл-КоА, що в свою чергу супроводжується підвищенням синтезу жирних кислот а, отже, і ПАР ліпідної природи [64].

Наші дослідження показали можливість інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин штамом *R. erythropolis* ЕК-1 за наявності у середовищі з етанолом цитрату (регулятора синтезу ліпідів) і фумарату (попередника глюконеогенезу).

Встановлено, що збільшення на 40–100 % показників синтезу ПАР за умови внесення цитрату (0,1 %) і фумарату (0,2 %) на початку стаціонарної фази росту продуцента зумовлене активацією глюконеогенетичної гілки обміну і посиленням синтезу ліпідів, про що свідчило підвищення у 1,4-1,5 і 3,4–3,6 раза активності ізоцитратліази і фосфоенолпіруватсинтетази, відповідно, а також зниження у 1,5–1,6 раза активності ізоцитратдегідрогенази.

Слід зазначити, що відомі на теперішній час літературні дані показують можливість інтенсифікації синтезу ПАР за присутності цитрату [61-65], проте встановлені нами закономірності відрізняються від описаних у літературі. Так, згідно з літературними даними, цитрат вносили у концентрації 0,5–1,0 % на початку процесу культивування продуцентів ПАР. За такої концентрації цитрат можна розглядати як додатковий ростовий субстрат, а не регулятор синтезу ліпідів. На сьогодні у літературі практично відсутні відомості про вплив С₄-дикарбонових кислот – попередників глюконеогенезу на синтез ПАР. Відомо, що внесення солей органічних кислот циклу Кребса (сукцинату і фумарату у концентрації 0,5 %) у середовище культивування *Bacillus subtilis* С-14 на початку процесу культивування супроводжувалось підвищенням кількості синтезованих ПАР у 1,5–2 раза [66]. При цьому спостерігали також збільшення рівня біомаси, індексу емульгування і показника умовної концентрації ПАР.

Слід зазначити, що нам не вдалося знайти літературні дані про підвищення синтезу ПАР за одночасної присутності у середовищі культивування як цитрату (регулятора синтезу ліпідів), так і C_4 -дикарбонових кислот (попередників глюконеогенезу). Крім того, на теперішній час залишаються практично недослідженими механізми, що забезпечують інтенсифікацію утворення ПАР у відповідь на присутність у середовищі попередників їх синтезу. Так, у праці [62] встановлено, що за присутності цитрату спостерігається зниження активності ізоцитратдегідрогенази у клітинах *Bacillus subtilis*, тобто збільшення синтезу сурфактину автори пояснюють переважними витратами вуглецю субстрату на процеси біосинтезу ПАР. У той же час для дріжджів *Torulopsis apicola* – продуцента поверхнево-активних гліколіпідів встановлено, що механізм дії цитрату натрію полягає у підтримці рН на оптимальному для синтезу ПАР рівні за рахунок підлужнення культуральної рідини в результаті транспорту цитрату шляхом симпорту з протоном, що й забезпечує збільшення синтезу ПАВ [61]. Аналогічну дію на синтез ПАР *Torulopsis apicola* спричиняли солі й інших органічних кислот (сукцинату, тартрату і малонату).

Отже, аналіз літературних і власних експериментальних даних показує, що організація промислового виробництва ПАР потребує попереднього ґрунтовного вивчення економічної ефективності цього процесу. На теперішній час собівартість мікробних ПАР є вищою порівняно з хімічними аналогами за рахунок низького виходу цільового продукту та високих витрат на його виділення та очищення. Використання дешевих субстратів, оптимізація складу поживного середовища та умов культивування, впровадження на виробництві ступінчатої схеми виділення ПАР може суттєво змінити існуючу ситуацію. Зниження собівартості цільового продукту може бути досягнуто також за умови використання нових штамів-надсинтетиків ПАР.

Список літератури

1. *Cameotra S.S., Makkar R.S.* Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules // *Curr.Opin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 7, № 3. – P. 262–266.
2. *Singh P., Cameotra. S.S.* Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences // *Trends Biotechnol.* – 2004. Vol. 22, № 3. – P. 142–146.
3. *Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R.* Biosurfactants: potential applications in medicine // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2006. – Vol. 57, № 4. – P. 609–618.
4. *Ron E.Z., Rosenberg E.* Natural roles of biosurfactants // *Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 3, № 4. – P.229–236.
5. *Desai J.D., Banat I.M.* Microbial production of surfactants and their commercial potential // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997. – Vol. 61, № 1. – P. 47–64.
6. *Banat I.M, Makkar R.S., Cameotra S.S.* Potential commercial applications of microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 53, № 5. – P. 495–508.
7. *Makkar R.S., Cameotra S.S.* An update on use of unconventional substrates for biosurfactants production and their new applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 58, № 4. – P. 428–434.
8. *Raza Z.A., Rehman A., Khan M.S., Khalid Z.M.* Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes // *Biodegradation.* – 2007. – Vol. 18, № 1. – P. 115–121.
9. *Shah V., Jurjevic M., Badia D.* Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production // *Biotechnol. Prog.* – 2007. – Vol. 23, № 2. – P. 512–515.
10. *Trummler, K., Effenberger F., Sylđatk 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. Tech.* – 2003. – Vol. 105. – P. 563–571.

11. *Vance-Harrop M.H., de Gusmao N.B., de Campos-Takaki G.M.* New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources // *Braz. J. Microbiol.* – 2003. – Vol. 34. – P. 120–123.
12. *Pekin G., Vardar-Sukan F., Kosaric N.* Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey // *Eng. Life Sci.* – 2005. – Vol. 5, № 4. – P. 357–362.
13. *Rahman K.S., Rahman T.J., McClean S., Marchant R., Banat I.M.* Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials // *Biotechnol. Prog.* –2002. – Vol. 18, № 6. – P. 1277–1281.
14. *Ferraz C., de Araujo A.A., Pastore G.M.* The influence of vegetable oils on biosurfactant production by *Serratia marcescens* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 98-100. – P. 841–847.
15. *Kim H.S., Jeon J.W., Kim B.H., Ahn C.Y., Oh H.M., Yoon B.D.* Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed batch fermentation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 70, № 4. – P. 391–396.
16. *Nitschke M., Costa S.G., Haddad R., Goncalves L.A., Eberlin M.N., Contiero J.* Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LB1 // *Biotechnol. Prog.* – 2005. – Vol. 21, № 5. – P. 1562–1566.
17. *Benincasa M., Contiero J., Mansera M.A., Moraes I.O.* Rhamnolipid production by *P. aeruginosa* LB1 growing on soapstock as the sole carbon source // *J. Food Eng.* – 2002. – Vol. 54. – P. 283–288.
18. *Benincasa M., Abalos A., Oliveira I., Mansera A.* Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock // *Anton. Leeuw. Int. J. G.* –2004. Vol. 85, № 1. – P.1–8.
19. *Abalos A., Pinazo A., Infante M.R., Casals M., Garcia F., Mansera A.* Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by

Pseudomonas aeruginosa AT10 from soyabean oil refinery wastes // *Langmuir*. – 2001. – Vol. 17, № 5. – P. 1367–1371.

20. *Bednarski W., Adamczak M., Tomasik J., Plaszczyk M.* Application of oil refinery waste in biosynthesis of glycolipids by yeast // *Bioresour. Technol.* – 2004. – Vol. 95, № 1. – P. 15–18.

21. *Dubey K., Juwarkar A.* Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 17, № 1. – P. 61–69.

22. *Dubey K., Juwarkar A.* Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 // *Indian J. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 3, № 1. – P. 74–81.

23. *Thompson D.N., Fox S.L., Bala G.A.* Biosurfactants from potato process effluents // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 84-86. – P.917–930.

24. *Thompson D.N., Fox S.L., Bala G.A.* The effects of pretreatments on surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 91-93. – P. 487–502.

25. *Noah K.S., Bruhn D.F., Bala G.A.* Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2005. – Vol.121-124. –P. 465–473.

26. *Noah K.S., Fox S.L., Bruhn D.F., Thompson D.N., Bala G.A.* Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 98-100. – P. 803–813.

27. *Nitschke M., Pastore G.* Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater // *Bioresour. Technol.* – 2006. – Vol. 97, № 2. – P. 336–341.

28. *Nitschke M., Pastore G.M.* Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2003. – Vol.105-108, № 3. – P. 295–301.

29. Nitschke M., Pastore G.M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2004. – Vol. 112, № 3. – P. 163–172.

30. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 58–63.

31. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 5. – С. 544–550.

32. Пирог Т.П., Антонюк С.І. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин штамом *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Наукові праці Національного університету харчових технологій. – 2007. – № 22. – С.50–53.

33. de Carvalho C., Parreno-Marchante B., Neumann G. et al. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on *n*-alkanes, alcohols and terpenes // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. –Vol. 67. – P. 383–388.

34. de Carvalho C., da Fonseca M. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005. –Vol. 51. – P. 388–399.

35. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – Vol. 52. – P. 154 – 162.

36. Macdonald C.R., Cooper D.G., Zajic J.E. Surface-active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons // Appl. Environ. Microbiol. – 1981. – Vol. 41, № 1. – P. 117-123.

37. 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. – Vol. 31. – P. 249–253.

38. Yazdani S.S., Gonzales R. Anaerobic fermentation og glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. –2007. – Vol. 18. – P. 213–219.

39. Sen R., Swaminathan T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. // Process Biochem. – 2005. – Vol. 40, № 9. – P. 2953– 2958.

40. Reiling, H.E., Thanei-Wyss U., Guerra-Santos L.H., Hirt R., Kappeli O., Fiechter A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 51, № 5. – P. 985–989.

41. Dubey K.V., Juwarkar A.A., Singh S.K. Adsorption-desorption process using wood- based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater // Biotechnol. Prog. – 2005. – Vol. 21, № 3. – P. 860–867.

42. 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. Meth. – 2001. – Vol. 46, № 2. – P. 149–156.

43. Philp J.C., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Dunbar S.A., Christofi N., Lang S., Wray V. Alkanotropic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 59, № 2-3. – P. 318–324.

44. Sen R. Response surface optimization of the critical media components for production of surfactin // J. Chem. Tech. Biotechnol. – 1997. – Vol. 68, № 3. – P. 263–270.

45. Sen R., Swaminathan T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1997. – Vol. 47. – P. 358– 363.

46. Sen R., Swaminathan T. Response surface modeling and optimization to elucidate the effects of inoculum age & size on surfactin production // Biochem. Eng. J. – 2004. – Vol. 21. – P. 141–148.

47. Shabtai Y., Gutnick D.L. Enhanced emulsan production in mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 selected for resistance to cetyltrimethylammonium bromide // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 52. – P. 146–151.

48. Davis D.A., Lynch H.C., Varley J. The application of foaming for recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 // Enzyme Microb. Technol. – 2001.– Vol. 28, № 4-5. – P. 346–354/

49. Ramnani P., Kumar S.S., Gupta R. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: bioformulation as detergent additive // Process Biochem. – 2005. – Vol. 40, № 10. – P. 3352–3359.

50. Koch A.K., Kappeli O., Fiechter A., Reiser J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants // J. Bacteriol. – 1991. – Vol. 173, № 13. – P. 4212–4219.

51. Tahzibi A., Kamal F., Assadi M.M. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutan // Iran. Biomed. J. – 2004. – Vol. 8, № 1. – P.25– 31.

52. Lin S-C., Lin K-G., Lo C-C., Lin Y-M. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant // Enzyme Microb. Technol. – 1998. – Vol. 23. – P. 267–273.

53. Ohno A., Ano T., Shoda M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation // Biotechnol. Bioeng. – 1995. – Vol. 47. – P. 209– 214.

54. Ochsner U.A., Reiser J., Fiechter A., Wilholt B. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61, № 9. – P. 3503– 3506.

55. Yakimov M.M., Giuliano L., Timmis K.N., Golyshin P.N. Recombinant acylheptapeptide lichenysin: high level of production by *Bacillus subtilis* cells // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – Vol. 2, № 2. – P. 217– 224.

56. Koch A.K., Reiser J., Kappeli O., Fiechter A. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production // Nat. Biotechnol. – 1988. – Vol. 6. – P. 1335– 1339.

57. Dogan I., Pagilla K.R., Webster D.A., Stark B.C. Expression of *Vitreoscilla* haemoglobin in *Gordonia amarae* enhances biosurfactant production // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 33, № 8. – P. 693– 700.

58. Малашенко Ю.Р., Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э. Регуляция синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом // Микробиол. журн. – 1993. – Т. , № 2. – С. 35 –41.
59. Миронов В.А., Сергеева А.В., Воронкова В.В., Даниленко В.Н. Биосинтез авермектинов: физиологические и технологические аспекты // Антибиот. и химиотер. – 1997. – Т. 42, № 3. – С. 31–36.
60. Навашин М.С., Федоренко В.А., Настасян И.Н. и др. Генетический и биохимический контроль биосинтеза макролидных антибиотиков // Антибиот. и химиотер. – 1990. – Т. 35, № 12. – С. 34–38.
61. Stuver o., Hommel R., Haferburg D., Kleber H.P. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain *Torulopsis apicola* // J. Biotechnology. – 1987. – Vol. 6. – P. 259 –269.
62. de Roubin M.R., Mulligan C.N., Gibbs B.F. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity // Can. J. Microbiol. – 1989. – Vol. 35, № 9. – P. 854–859.
63. Лесык О.Ю., Елисейев С.А., Полулях О.В., Карпенко Ю.В. Образование поверхностно-активного комплекса культурой каротинообразующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* и его эмульгирующие свойства // Микробиол. журн. – 1991. – Т. 53, № 2. – С. 36 –40.
64. Kosaric N., Cairns W.L., Cray N.C.C. The role of nitrogen in microorganism strategies for biosurfactant production // JACS. – 1984. – Vol.16, № 11. – P.1735–1743.
65. 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. – 155с.
66. 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.

