

УДК 759.873.088.5:661.185

І.М. Волошина

Т.П. Пирог, доктор біологічних наук

Національний університет харчових технологій

Поверхнево-активні речовини мікробного походження

Охарактеризовано поверхнево активні речовини (ПАР) синтезовані мікроорганізмами різних фізіологічних і таксономічних груп. Наведено класифікацію ПАР за хімічною природою (гліколіпіди, ліпопептиди, ліпополісахариди, жирні кислоти та їх похідні фосфоліпіди) і молекулярною масою (низько- та високомолекулярні), а також переваги мікробних поверхнево-активних речовин перед синтетичними аналогами.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, ліпіди, класифікація, мікроорганізми.

Охарактеризовано поверхностно-активные вещества (ПАВ) синтезированные микроорганизмами разных физиологических и таксономических групп. Представлено классификацию ПАВ за химической природой (гликолипиды, липопептиды, липополисахариды, жирные кислоты и их производные, фосфолипиды) и молекулярной массой (низко- и высокомолекулярные), а также преимущества микробных поверхностно-активных веществ перед синтетическими аналогами.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, липиды, классификация, микроорганизмы.

© І.М. Волошина, Т.П. Пирог, 2007

Поверхнево-активні речовини (ПАР, біосурфактанти) є відносно новим продуктом біотехнології, оскільки почали розроблятися у 80 роках ХХ ст. Ці сполуки мають суттєві переваги перед синтетичними аналогами, зокрема біодеградабельність, що виключає забруднення навколишнього середовища, стійкість до екстремальних температур, рН та солоності середовища, а також різноманітна біологічна активність та нетоксичність. За хімічною природою ПАР мікробного походження належать до таких груп: гліколіпіди, ліпопротеїни, ліпопептиди, фосфоліпіди, нейтральні ліпіди, жирні кислоти та ін.

Класифікація мікробних поверхнево-активних речовин. ПАР поділяють на молекулярно розчинні, які утворюють істинні розчини, та колоїдні (міцелярно розчинні). Основні характеристики поверхнево-активних речовин – це критична концентрація міцелоутворення (ККМ) та величина гідрофільно-ліпофільного балансу (ГЛБ). ККМ визначається як концентрація ПАР, за якої в його розчині утворюються міцели, що перебувають у рівновазі з молекулами чи іонами. ГЛБ визначається за 20-бальною шкалою і показує співвідношення гідрофільної та гідрофобної частин у молекулі ПАР [14].

Мікробні ПАР є міцеліально розчинними (амфіфільними) сполуками, тобто складаються з гідрофільної та гідрофобної частин. Гідрофобна (неполярна) частина представлена насиченими, ненасиченими або жирними кислотами, а гідрофільна (полярна) амінокислотами, аніонами чи катіонами пептидів, моно-, ди- або полісахаридами.

За класифікацією ізраїльського вченого Е. Розенберга (1999 р.) біосурфактанти поділяють на низько- та високомолекулярні. До низькомолекулярних належать гліколіпіди (трегалозоліпіди, софороліпіди, рамноліпіди) та ліпопептиди (сурфактин, поліміксин, граміцидин S). Високомолекулярні біосурфактанти – це полісахариди, білки, ліпополісахариди, ліпопротеїни або комплекси цих сполук. Низькомолекулярні ПАР здатні знижувати поверхневий натяг на межі розподілу фаз, а високомолекуля-

рні є ефективними стабілізаторами емульсій типу “масло у воді”, тобто вони є емульгаторами.

За хімічною природою ПАР мікробного походження поділяють на п'ять груп (класифікація німецького вченого, провідного спеціаліста в галузі біотехнології мікробних ПАР Ф.Вагнера): 1) гліколіпіди (трегалозо-, рамно-, софорозо-, целобіозоліпіди та ін.), 2) ліпопептиди (ліпопротеїни), 3) ліпополісахариди, 4) жирні кислоти та їх похідні, 5) фосфоліпіди.

Гліколіпіди. Основною структурною одиницею гліколіпідів є молекула вуглеводу, етерифікована довголанцюговими аліфатичними чи гідроксиаліфатичними кислотами. Поверхнево-активні речовини цього підкласу – трегалозоліпіди містять дисахарид трегалозу, приєднаний у положеннях C₆ та C₆' до α-розгалуженої-β-гідроксикарбонової кислоти, відомої як міколат – R-CHON-CHR'-COOH. [12]. Бактерії родів *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* синтезують різні типи трегалозоліпідів, які відрізняються кількістю атомів вуглецю в ланцюгах міколових кислот, а також рівнем їх ненасиченості [9, 12, 13].

Найбільш вивченими серед гліколіпідів є **рамноліпіди** [8]. Біосурфактанти даного підкласу гліколіпідів складаються з однієї або двох молекул рамнози, приєднаних до двох молекул β-гідроксидеканової кислоти [5, 8]. З літературних джерел відомо, що бактерії *Pseudomonas aeruginosa* синтезують рамноліпіди [8], які містять в своєму складі лише одну β-гідроксидеканову кислоту чи альтернативні жирні кислоти [10]. До основних рамноліпідів, синтезованих *Pseudomonas aeruginosa* та *Pseudomonas* sp PS-17, відносять L-рамнозил-β-гідроксидеканоїл-β-гідроксидеканоат (монорамноліпід) та L-рамнозил-L-рамнозил-β-гідроксидеканоїл-β-гідроксидеканоат (дирамноліпід) (рис. 1. а, б) [10]. Встановлено, що у процесі росту *Pseudomonas* sp PS-17 паралельно з моно-, дирамноліпідом синтезується ще й біополімер, ідентифікований як поліуронід, що складається з α-C-C- зв'язаного лінійного співполімеру β-D-мануронової кислоти та 5-епімеру α-L-гулурунової кислоти (рис. 1. в) [1].

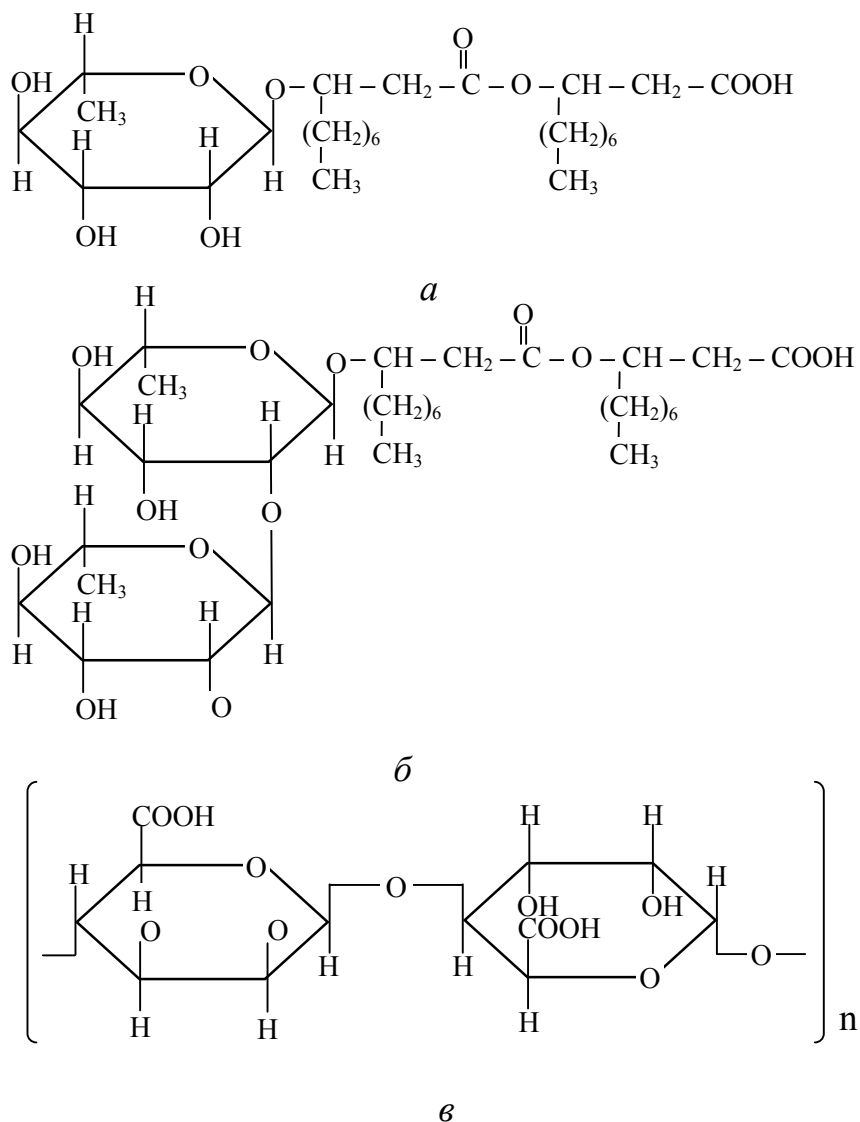


Рис. 1. Структурні формули рамноліпідів, синтезованих представниками роду *Pseudomonas*: а – *L*-рамнозил- β -гідроксидеканоіл- β -гідроксидеканоат; б – *L*-рамнозил-*L*-рамнозил- β -гідроксидеканоіл- β -гідроксидеканоат, в – позаклітинний біополімер *Pseudomonas* sp PS-17

Новий штам *Renibacterium salmoninarum* 27 BN при культивуванні на *n*-гексадекані синтезує два рамноліпіди – RLL та RRLL, типові для *Pseudomonas* sp PS-17 та *Pseudomonas aeruginosa* [1].

Целобіозоліпіди синтезуються мікроміцетами роду *Ustilago* при рості на рослинних оліях. Хімічні і фізичні властивості целобіозоліпідів залежать від джерела вуглецю, на якому ростуть гриби, а їх основними структурними компонентами є устілагова кислота і целобіоза [7].

Софорозоліпіди синтезуються, головним чином, дріжджами родів *Torulopsis* (*T. bombicola*, *T. petrophilum*, та ін.) і *Candida*. Ці гліколіпіди мі-

стять дисахарид софорозу, який зв'язаний глікозидним зв'язком з передостаннім атомом вуглецевого ланцюгу жирної кислоти C₁₆-C₁₉ [7].

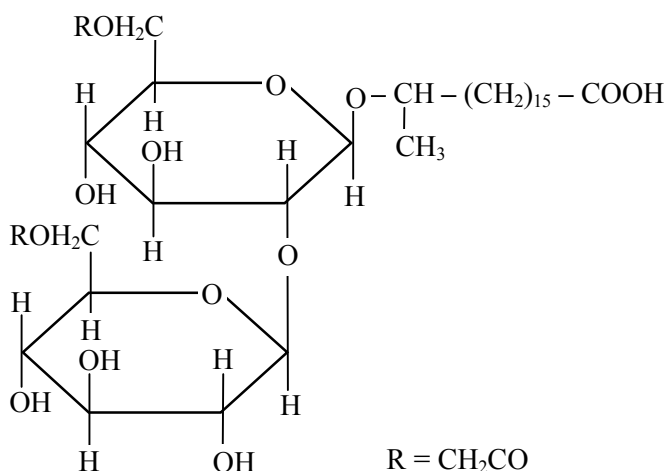


Рис. 2 Структурна формула софорозоліпиду, синтезованого *Torulopsis bombicola*

bogoriensis синтезує гліколіпіди, в яких софороза зв'язана з діацетатом докозанової кислоти. Залежно від джерела вуглецю при культивуванні *T. petrophilum* накопичується або білокрісний емульгатор алканів, або софорозоліпіди, які порівняно ефективно знижують поверхневий натяг, проте не емульгують алкани та рослинні олії [7].

Ліпопептиди. До поверхнево-активних речовин належать ліпопептиди, які синтезуються багатьма бактеріями і дріжджами. Ліпопептиди зазвичай існують у вигляді суміші гомологічних сполук, які відрізняються між собою ліпідними і пептидними частинами. Найвідомішими серед ліпопептидів є амфоміцин, ендуроміцин, глобоміцин, синтезовані стрептоміцетами. Ці сполуки є антибіотиками, які інгібують синтез клітинної стінки бактерій [7]. Велика кількість циклічних ліпопептидів, у тому числі декапептидні антибіотики (граміцидіни) та ліпопептидні антибіотики (поліміксини), синтезуються *Bacillus brevis*,

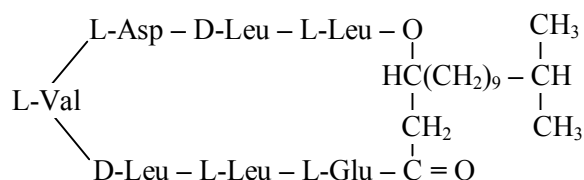


Рис. 3. Структурна формула ліпопептиду, синтезованого *Bacillus subtilis*

Bacillus polymyxa і *Pseudomonas putida*. Цим речовинам притаманні високі поверхнево-активні властивості [6]. Серед високоактивних біосурфактантів, ліпопептидної природи належать орнісинвмісні ліпіди

(*Pseudomonas rubescens* та *Thiobacillus thiooxidans*); цериліпін-, орнісин- та таурінвмісні ліпіди (*Gluconobacter cerinus* IFO 3267); лізинвмісні ліпіди

(*Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058) [3, 6]. *B. subtilis* синтезує сурфактин (субтилізін), який визнано одним з найактивніших біосурфактантів (рис. 3.). [7, 9, 13]. Структурні дослідження показали, що наведені біосурфак-

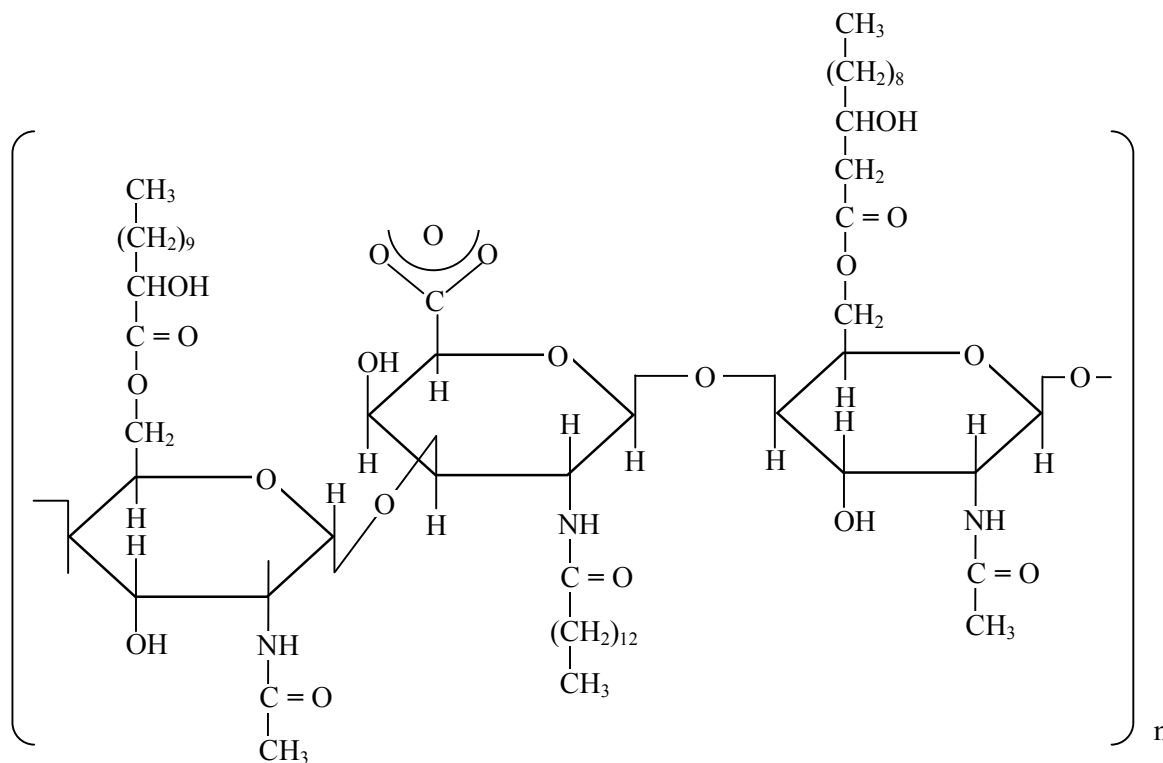


Рис. 4. Структурна формула емульсану, синтезованого *Acinetobacter calcoaceticus*

танти є циклічними ліпопептидами.

Ліпополісахариди. Велика кількість мікроорганізмів синтезують позаклітинні поверхнево-активних речовин ліпополісахариди та ліпопротеїни. Найбільш вивченими є емульсан, ліпосан, манопротеїн. *Acinetobacter calcoaceticus* та його мутанти синтезують потужний поліаніонний амфіфільний ліпополісахарид емульсан (рис. 4.), який знайшов широке застосування для очищення ємностей від нафти і нафтопродуктів [2, 7]. Повторювана одиниця вуглеводного ланцюга емульсину складається з трисахариду N-ацетил-D-галактозаміну, N-ацетилгалактозамінурової кислоти та неідентифікованого N-ацетилсахару, а жирні кислоти ковалентно зв'язані з полісахаридною основою через O-складноефірний чи N-

ацильний зв'язок. Емульсан є ефективним емульгатором, навіть з концентрації 0,001-0,01% [11]. Його поверхнева активність зумовлена наявністю жирних кислот, які становлять близько 15 % сухої ваги емульсану. Бактерії *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter vinelandii* синтезують різні за своєю структурою екзополісахариди залежно від джерела вуглецю та співвідношення C:N у середовищі культивування [11]. *Schizonella malanogramma*, *Ustilago maydis* та *Candida antarctica* T-34 є продуцентами полімерних біосурфактантів – ерітрітол-, манозовмісних ліпідів. *Candida lipolytica* синтезує потужний позаклітинний емульгатор ліпосан, який містить 83 % вуглеводів та 17 % білка [11]. Його вуглеводна частина складається з глюкози, галактози, галактозаміну та галактуронової кислоти. *Saccharomyces cerevisiae* синтезує великі кількості манопротеїну – біосурфактанту білкової природи, який емульгує деякі олії, алкани та органічні розчини [13].

Жирні кислоти та нейтральні жири. Жирні кислоти та нейтральні

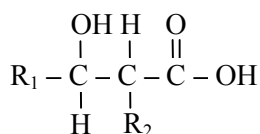
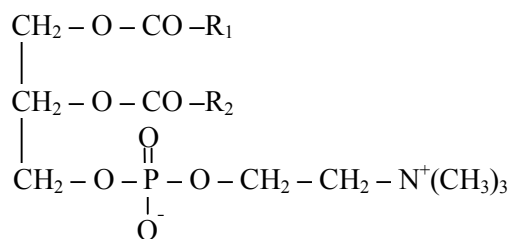


Рис. 5. Структурна формула коріноміколових кислот, де R_1 та R_2 – алкільні фрагменти, які можуть містити до 40 вуглецевих атомів.

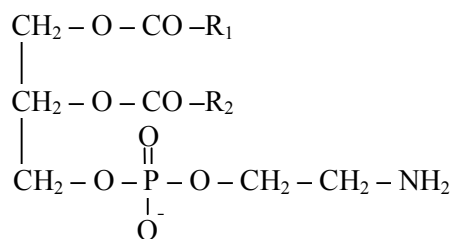
ліпіди присутні у всіх мікробних клітинах і часто виділяються у середовище. Вони мають важливе значення для росту мікроорганізмів на вуглеводневих субстратах, так як здатні їх емульгувати і полегшувати доступ у клітини. Типовими представниками цієї групи ПАР є коріноміколові кислоти (рис. 5), алкільні фрагменти

яких можуть містити до 40 вуглецевих атомів. Позаклітинні поверхнево-активні жирні кислоти синтезуються деякими бактеріями родів *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* та дріжджами при культивуванні на *n*-алканах [9].

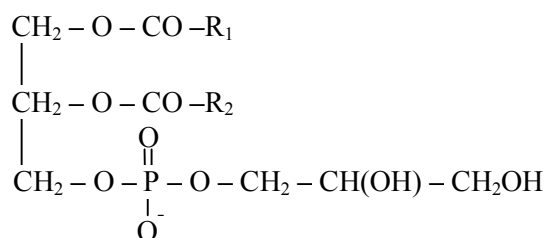
Фосфоліпіди. Фосфоліпіди здатні синтезувати такі мікроорганізми, як *Corynebacterium alcanolyticus*, *Corynebacterium lepus*, *Acinetobacter sp.*, *Candida tropicalis*, *Micrococcus cerificans* та ін. [3]. *Aspergillus spp*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Arthrobacter* AK-19 та *P. aeruginosa* 44T1 накопи-



а



б



в

Рис. 6. Структурні формули фосфоліпідів: а – фосфатидил-холін; б – фосфатидилетаноламін; в – фосфатидилгліцерин.

чують близько 40 ÷ 80 % фосфоліпідів при культивуванні на гексадекані та оливковій олії. *Acinetobacter* sp. HO1-N при культивуванні на гексадекані синтезує фосфоліпід (головним чином фосфатидлетаноламін), які формують мікроемульсії алканів у воді [9].

При культивуванні на н-алканах *R. erythropolis* синтезує фосфатидилетаноламін, який спричиняє зниження міжфазного натягу між водою та гексадеканом до 1 мН/м та забезпечення ККМ при 30 мг/л [12]. Структурні формули синтезованих мікроорганізмами фосфоліпідів наведено на рис. 6.

Флаволіпіди. Нещодавно було ідентифіковано новий клас поверхнево-активних речовин, названих флаволіпідами [4]. У своїй будові вони мають унікальну полярну частину, яка містить лимонну кислоту та дві кадаверинові молекули. Флаволіпіди були одержані при культивуванні *Flavobacterium* sp. MTN11 на мінеральному середовищі з 2 % глюкози, як єдиного джерела вуглецю та енергії. Штам MTN11 синтезує суміш з 37 флаволіпідів, яка після часткового очищення зменшує поверхневий натяг середовища до 26,0 мН/м [4]. Флаволіпіди проявляють високу емульгуювальну активність і утворюють стійкі емульсії, за концентрації 19 мг/л.

Висновки. Здатність до синтезу поверхнево-активних речовин виявлений у бактерій (*Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Renibacterium*, *Bacillus*,

Gluconobacter, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Thiobacillus*, *Flavobacterium*), дріжджів (*Torulopsis*, *Candida*, *Saccharomyces*), грибів (*Ustilago*, *Aspergillus*).

Залежно від величини молекулярної маси поверхнево-активні речовини поділяють на низькомолекулярні (гліколіпіди, ліпопептиди) та високомолекулярні (полісахариди, білки, ліпополісахариди, ліпопротеїни та ін.), а за хімічною природою на.

Література.

1 Вільданова-Марцишин Р.І. Біосинтез поверхнево-активних сполук штамми *Rhodococcus fascians* ВКМ АС1169, *Rhodococcus fascians* ВКМ АС1163 і *Pseudomonas* sp. PS-17: Дис. ... канд. біол. наук: 03.00.20. – Львів, 2004. – 155.

2 Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Малашенко Ю.Р. Влияние факторов внешней среды на образование и свойства экзополисахаридов *Acinetobacter* sp // Прикл. биохимия и микробиология. – 1998. – Т. 34, № 1. – С. 70 – 74.

3 Batrakov S.G., Rodionova T.A., Esipov S.E., Polyakov N.B., Sheichenko V.I., Shekhovtsova N.V., Lukin S.M., Panikov N.S., Nikolaev Y.A. A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603 // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids Rev. – 2003. – Vol. 1634, № 3. – P. 107 – 115.

4 Bodour A.A., Guerrero-Barajas C., Jiorle B.V., Malcomson M.E., Paull A.K. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN 11 // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 114 – 120.

5 Cameotra S.S., Makkar R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – Vol. 50. – P. 520 – 529.

6 Kuiper I., Legandijk E.L., Pickford R., Derrick J.P., Lamers G.E., Tomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J., Bloemberg G.V. Characterisation of two

Pseudomonas putida lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilm // *Microbiol. Mol. Rev.* – 2004. – Vol. 51, № 1. – P. 97 – 113.

7 *Mulligan C.N.* Environmental applications for biosurfactants // *Environmental Pollution Rev.* – 2005. – Vol. 133, № 2. – P. 183 – 198.

8 *Noordman W.H., Bruining J.-W., Wietzes P., Janssen D.B.* Facilitated transport of a PAH mixture by a rhamnolipid biosurfactant in porous silica matrices. // *J. Contam. Hydrol.* – 2000. – Vol. 44. – P. 119 – 140.

9 *Puntus I.F., Sakharovsky V.G., Filonov A.E., Boronin A.M.* Surface activity and metabolism of hydrocarbon-degrading microorganisms growing on hexadecane and naphthalene // *Process Biochemistry Rev.* – 2005. – Vol. 40, № 8. – P. 2643 – 2648.

10 *Rahman K.S.M., Rahman Th.J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R., Banat I.M.* Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients // *Bioresource Technology Rev.* – 2003. – Vol. 90, № 2. – P. 159 – 168.

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

12 *Tomohiro Imura, Hiroshi Yanagishita, Junko Ohira, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Dai Kitamoto.* Thermodynamically stable vesicle formation from glycolipid biosurfactant sponge phase // *Biointerfaces Rev.* – 2005. – Vol. 43, № 2. – P. 115 – 121.

13 *Vasileva-Tonkova E., Gesheva V.* Glycolipids produced by Antarctic *Nocardioides* sp. during growth on *n*-paraffin // *Process Biochemistry Rev.* – 2005. – Vol. 40, № 7. – P. 2387 – 2391.

14 *Wang S., Mulligan C.N.* An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil // *Microbiol. Mol. Rev.* – 2004. – Vol. 570, №9. – P. 1079 – 1089.

Надійшла до редакції 12.03.2007 р.