

УДК 759.873.088.5:661.185

МІКРОБНІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ: ПРОБЛЕМИ ПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

Т. П. ПИРОГ, С. В. ІГНАТЕНКО

Національний університет харчових технологій, Київ

E-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Наведено літературні та власні експериментальні дані авторів щодо стану і перспектив розвитку промислового виробництва мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР). Зазначається, що висока на сьогодні собівартість мікробних ПАР зумовлена великими витратами на біосинтез і виділення цільового продукту, а також невисокою продуктивністю штамів-продуцентів. Дослідження, спрямовані на вирішення цих проблем, є ключовими й пріоритетними у біотехнології мікробних ПАР. Ефективність технологій мікробних ПАР може бути підвищена за рахунок використання як ростових субстратів промислових відходів, оптимізації умов культивування продуцентів, внесення у середовище попередників біосинтезу, розроблення рентабельних методів виділення ПАР та одержання штамів-надсинтетиків, у тому числі й рекомбінантних.

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, для 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].

Попри комерційно привабливі властивості мікробних ПАР та значні переваги їх порівняно із синтетичними аналогами, промислове виробництво цієї групи речовин в Україні дотепер 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 продуктивність штамів-продуцентів [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 й очищення ПАР;

- ♦ одержання мутантних і рекомбінантних штамів мікроорганізмів-надсинтетиків ПАР.

На цей час дослідники активно реалізують перші два підходи, тоді як використання рекомбінантних штамів-продуцентів ПАР донедавна в контексті зниження собівартості виробництва мікробних ПАР не розглядалось.

Альтернативні субстрати для одержання мікробних поверхнево-активних речовин

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

У низці робіт [10–12] є дані щодо можливості використання жирів рослинного

походження як ефективної та дешевої сировини 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 застосування їх у біотехнологічних процесах. Із дешевих рослинних нехарчових олій потенційними субстратами для синтезу ПАР є, наприклад, рицинова олія та олія жожоба [15].

Окрім різних рослинних олій субстратами для одержання ПАР можуть бути побічні продукти їх виробництва. Так, встановлена можливість використання відходів виробництва соєвої та соняшникової олій для синтезу рамноліпідів штамами *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 жиромісні 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 [21, 22]. Так, під час культивування *Pseudomonas aeruginosa* BS2 на середовищі зі вмістом сирної сироватки 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. Зокрема, синтез ліпопептидів *Bacillus subtilis* здійснюють на середовищах, які містять відходи картоплепереробних виробництв [23–26]. Побічний продукт виробництва борошна з маніоки є субстратом для синтезу сурфактину *Bacillus subtilis* ATCC 21332 та *B. subtilis* LB5a [27–29]. У разі 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 застосування для синтезу поверхнево-активних речовин гідрофільних субстратів (етанол, гліцерол), які порівняно з гідрофобними сполуками мають такі переваги: по-перше, вони є водорозчинними і тому більш технологічними, а 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 емульгуювальними 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 дотепер відсутні дані про

Таблиця 1. Використання рослинних жирів для промислового отримання поверхнево-активних речовин

Субстрат	Поверхнево-активні речовини	Штам-продуцент	ПАР, г/л
Рапсова олія	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas species</i> DSM 2874	45
Кукурудзяна олія	Софороліпіди	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	40
Соняшникова олія	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	4,31
	Ліпопептиди	<i>Serratia marcescens</i>	–
Соєва олія	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	2,98
	Манозилеритритолліпіди	<i>Candida species</i> SY16	9,5

Примітка: «–» — дані відсутні.

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 свідчать, 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 утричі.

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

На сьогодні одним з найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах є гліцерол — побічний продукт, утворюваний у великих кількостях під час виробництва біодизеля з рослинної і тваринної сировини [38]. Так, під час одержання 100 л біодизеля утворюється (як продукт трансестерифікації рослинних олій і тваринних жирів) до 10 л гліцеролу [38]. Неможливість використання в інших технологіях такої величезної кількості гліцеролу є на цей час найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизеля у світі. Одним із шляхів утилізації гліцеролу може бути застосування його як джерела вуглецю і енергії при розробленні технологій мікробного синтезу практично цінних метаболітів.

Наші експерименти довели можливість синтезу ПАР у процесі вирощування штаму *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцеролі. Встановлено умови культивування *N. vaccinii* К-8 на середовищі з 0,5% гліцеролу, в яких показники синтезу ПАР підвищувались у кілька разів (неопубліковані дані). Так, умовна концентрація ПАР досягає значень 4,2–5,0 за наявності у середовищі іонів заліза

і дріжджового автолізу, у разі використання інокуляту, вирощеного на гліцеролі до середини експоненційної фази росту і тривалості культивування 168 год.

Ефективні й економічно обґрунтовані методи виділення та очищення поверхнево-активних речовин

Одним із найважливіших чинників, що визначає рентабельність будь-якого біотехнологічного виробництва, є метод виділення та очищення цільового продукту. Для багатьох продуктів мікробного синтезу витрати на очищення становлять близько 60% загальних витрат на виробництво. Для виділення поверхнево-активних речовин у промисловості застосовують низку традиційних методів, зокрема кислотне осадження, екстракцію органічними розчинниками, кристалізацію, 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 використовують високотоксичні органічні розчинники (ацетон, метанол, хлороформ). За останні роки у промисловості почали успішно застосовувати альтернативні розчинники типу метилтретбутилового ефіру. Зокрема, таку технологію застосовують для виділення та очищення ПАР, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus* [42, 43]. Ці розчинники є дешевими і менш токсичними, що дає змогу суттєво скоротити витрати на фінішних стадіях виділення ПАР та мінімізувати потенційну екологічну небезпеку. Ці переваги запропонованих розчинників уможливають створення на їх основі більш конкурентоспроможних технологій.

У деяких випадках використання одного методу є недостатнім для повного виділення ПАР чи одержання високоочищених препаратів. Тому зараз широко застосовують багатоступеневі схеми, що охоплюють кілька послідовних етапів концентрування культуральної рідини (її супернатанту) та очищення ПАР від сторонніх домішок [40]. Така схема дає змогу одержувати поверхнево-активні препарати різного ступеня чистоти.

Таблиця 2. Вибір методу виділення поверхнево-активних речовин залежно від їхніх фізико-хімічних властивостей

Метод виділення	Властивості ПАР, що визначають вибір методу	Необхідне апаратурне забезпечення	Переваги методу	Джерело
Кислотне осадження	Здатність ПАР переходити у малорозчинну форму за низьких значень рН	Збірник	Низька вартість, висока ефективність виділення	[44–46]
Осадження сульфатом амонію	Здатність ПАР білкової природи за певних значень іонної сили розчину (ізоелектрична точка) переходити у малорозчинну форму	Збірник	Ефективність у разі виділення деяких груп полімерних ПАР	[47]
Екстракція органічними розчинниками	Розчинність ПАР в органічній фазі за рахунок наявності в їхній молекулі гідрофобної частини	Екстракційна установка	Ефективний метод для виділення та часткового очищення ПАР, можливість регенерації розчинника	[40, 41]
Екстракція метилтрет-бутиловим ефіром	Розчинність ПАР в органічній фазі за рахунок наявності в їхній молекулі гідрофобної частини	Екстракційна установка	Використання низькотоксичного розчинника, можливість регенерації екстрагента, низька вартість	[42, 43]
Флотація	Здатність ПАР завдяки поверхнево-активним властивостям формувати піну і переходити в неї	Спеціально сконструйовані реактори	Можливість організації безперервного процесу виділення ПАР, високий ступінь очищення ПАР	[26, 48]
Ультрафільтрація	Здатність ПАР формувати міцели, що затримуються полімерними мембранами	Ультрафільтраційний модуль, що містить полімерні пористі мембрани	Можливість проведення швидкої регенерації мембран, високий рівень чистоти одержаних препаратів	[39, 49]
Адсорбція на полістирольних матрицях	Здатність до адсорбції ПАР на полімерних носіях з наступною десорбцією органічними розчинниками	Колонки, заповнені полістирольним носієм	Можливість проведення швидкої регенерації носія, високий рівень чистоти одержаних препаратів	[40]
Адсорбція на активованому вугіллі	Здатність ПАР адсорбуватись на активованому вугіллі та десорбуватись органічними розчинниками	Колонки, заповнені сорбційним матеріалом, або безпосереднє внесення вугілля в культуральну рідину	Можливість одержання високоочищених препаратів, швидка регенерація сорбенту, низька вартість	[41]
Іонообмінна хроматографія	Полярність молекули ПАР, що зумовлює здатність до обміну зарядженої його частини на рухомі іони катіонів та аніонів	Колонки, заповнені іонообмінною смолою	Можливість одержання високоочищених препаратів, багаторазове використання носія, швидкий процес регенерації	[40]

Так, наприклад, сконцентрована культуральна рідина або неочищені препарати ПАР, одержані на перших стадіях технологічного процесу, мають низьку вартість і їх можна використовувати 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 має впроваджуватись на підприємствах, що виробляють продукцію для широкого спектра галузей промисловості.

Мутантні і рекомбінантні штами — надсинтетики поверхнево-активних речовин

Окрім оптимізації складу живильного 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 використовують 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 низку високоефективних рекомбінантних штамів-надсинтетиків ПАР. Так, із використанням як вектора плазмід рC112 сконструйовано штам *Bacillus subtilis* MI 113 уведенням гена *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 лише 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 здатен використовувати для росту й біосинтезу ПАР лактозу. Введення у клітини бактерій гена *lacZY* з *Escherichia coli* дало змогу створити штам, що синтезували рамноліпіди на середовищі з молочною сироваткою [56].

Нещодавно було створено новий рекомбінантний штам *Gordonia amarae* введенням стійкого гена гемоглобіну (*vgb*), що дало змогу в 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

Таблиця 3. Ефективність використання для синтезу поверхнево-активних речовин мутантних штамів

Мутантний штам	Спосіб одержання	Підвищення синтезу ПАР, %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 59C7	Уведення транспозона Tn5-GM у <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PG201	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PTCC 1637	Оброблення N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином	900
<i>Bacillus licheniformis</i> KGL11	Оброблення N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином	1100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 55033	Оброблення N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином	300–500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EBN-8	Дія γ-випромінювання на <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S8	100–200
<i>Bacillus subtilis</i> Suf-1	Дія ультрафіолету на <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	200–300
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Селекція на основі резистентності до катіонних детергентів	100–200

можливість інтенсифікації синтезу мікробного полісахариду етаполану додаванням у середовище C_4 -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 стимулюючий 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, у свою чергу, супроводжується підвищенням синтезу жирних кислот, а отже, і ПАР ліпідної природи [64].

Наші дослідження довели 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 зумовлено активацією глюконеогенетичної гілки обміну і посиленням синтезу ліпідів, про що свідчило підвищення в 1,4–1,5 і 3,4–3,6 рази активності ізоцитратліази і фосфоенолпіруватсинтетази, відповідно, а також зниження в 1,5–1,6 рази активності ізоцитратдегідрогенази.

Слід зазначити, що відомі на цей час літературні дані свідчать про можливість інтенсифікації синтезу ПАР за присутності цитрату [61–65], проте встановлені нами закономірності відрізняються від описаних у літературі. Так, згідно з літературними даними, цитрат у концентрації 0,5–1,0% вносили 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 C_4 -дикарбонових кислот — попередників глюконеогенезу на синтез ПАР. Відомо, що внесення солей органічних кислот циклу Кребса (сукцинату і фумарату в концентрації 0,5%) у середовище культивування *Bacillus subtilis* С-14 на початку процесу культивування супроводжувалось підвищенням кількості синтезованих ПАР у 1,5–2 рази [66]. При цьому спостерігали також збільшення рівня біомаси, індексу емульгування і показника умовної концентрації ПАР.

Варто зауважити, що нам не вдалося віднайти літературні дані щодо підвищення синтезу ПАР за одночасної присутності у середовищі культивування як цитрату (регулятора синтезу ліпідів), так і C_4 -дикарбонових кислот (попередників глюконеогенезу). Окрім того, дотепер практично не досліджено механізми, що забезпечують інтенсифікацію утворення ПАР у відповідь на присутність у середовищі попередників їх синтезу. Так, у [62] встановлено, що за присутності цитрату спостерігається зниження активності ізоцитратдегідрогенази у клітинах *Bacillus subtilis*, тобто збільшення синтезу сурфактину автори пояснюють переважними витратами субстрату вуглецю на процеси біосинтезу ПАР. Водночас для дріжджів *Torulopsis apicola* — продуцента поверхнево-активних гліколіпідів — встановлено, що механізм дії цитрату натрію полягає у підтриманні рН на оптимальному для синтезу ПАР рівні за рахунок підключення культуральної рідини в результаті транспортування цитрату шляхом симпорту з протоном, що й забезпечує збільшення синтезу ПАР [61]. Аналогічний вплив на синтез ПАР *Torulopsis apicola* справляли солі й інших органічних кислот (сукцинату, тартрату і малонату).

Отже, з аналізу літературних і власних експериментальних даних авторів випливає, що організація промислового виробництва ПАР потребує попереднього ґрунтовного вивчення економічної ефективності цього процесу. На сьогодні собівартість мікробних ПАР є вищою порівняно з хімічними аналогами через низький вихід цільового продукту та високі витрати на його виділення й очищення. Використання дешевих субстратів, оптимізація складу живильного середовища та умов культивування, впровадження на виробництві ступінчастої схеми виділення ПАР можуть суттєво змінити ситуацію. Зниження собівартості цільового продукту може бути досягнуто також за умов використання нових штамів-надсинтетиків ПАР.

ЛІТЕРАТУРА

1. Cameotra S. S., Makkar R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules // Curr. Opin. Microbiol. — 2004. — V. 7, N3. — P. 262–266.
2. Singh P., Cameotra S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences // Trends Biotechnol. — 2004. — V. 22, N3. — P. 142–146.
3. Rodrigues L., Banat I. M., Teixeira J., Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine // J. Antimicrob. Chemother. — 2006. — V. 57, N4. — P. 609–618.
4. Ron E. Z., Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants // Environ. Microbiol. — 2001. — V. 3, N 4. — P. 229–236.
5. Desai J. D., Banat I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1997. — V. 61, N1. — P. 47–64.
6. Banat I. M., Makkar R. S., Cameotra S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2000. — V. 53, N5. — P. 495–508.
7. Makkar R. S., Cameotra S. S. An update on use of unconventional substrates for biosurfactants production and their new applications // Ibid. — 2002. — V. 58, N4. — P. 428–434.
8. Raza Z. A., Rehman A., Khan M. S., Khalid Z. M. Improved production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes // Biodegradation. — 2007. — V. 18, N1. — P. 115–121.
9. Shah V., Jurjevic M., Badia D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production // Biotechnol. Prog. — 2007. — V. 23, N2. — P. 512–515.
10. Trummel K., Effenberger F., Syltath 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. — V. 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. — V. 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. — V. 5, N4. — P. 357–362.
13. Rahman K. S., Rahman T. J., McClean S. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials // Biotechnol. Prog. — 2002. — V. 18, N 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. — V. 98–100. — P. 841–847.
15. Kim H. S., Jeon J. W., Kim B. H. et al. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed batch fermentation // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2006. — V. 70, N4. — P. 391–396.
16. Nitschke M., Costa S. G., Haddad R. et al. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LB1 // Biotechnol. Prog. — 2005. — V. 21, N5. — 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. — V. 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. — V. 85, N1. — P. 1–8.
19. Abalos A., Pinazo A., Infante M. R. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soyabean oil refinery wastes // Langmuir. — 2001. — V. 17, N5. — 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. — V. 95, N1. — 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. — V. 17, N1. — 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. — V. 3, N1. — P. 74–81.
23. Thompson D. N., Fox S. L., Bala G. A. Biosurfactants from potato process effluents // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2000. — V. 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* // Ibid. — 2001. — V. 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 // Ibid. — 2005. — V. 121–124. — P. 465–473.

26. Noah K. S., Fox S. L., Bruhn D. F. et al. Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor // Ibid. — 2002. — V. 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. — V. 97, N2. — P. 336–341.
28. Nitschke M., Pastore G. M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2003. — V. 105–108, N3. — P. 295–301.
29. Nitschke M., Pastore G. M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent // Ibid. — 2004. — V. 112, N3. — 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 // Прикл. биохим. микробиол. — 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 // Там же. — 2004. — Т. 40, №5. — С. 544–550.
32. Пирог Т. П., Антонюк С. І. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин штамом *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Наук. праці Нац. ун-ту харчових технологій. — 2007. — №22. — С. 50–53.
33. Carvalho C. de, Parreno-Marchante B., Neumann G. et al. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on *n*-alkanes, alcohols and terpenes // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2005. — V. 67. — P. 383–388.
34. Carvalho C. de, Fonseca M. da. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 // FEMS Microbiol. Ecol. — 2005. — V. 51. — P. 388–399.
35. Rosenberg E., Ron E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — V. 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. — V. 41, N1. — P. 117–123.
37. Kim S. H., Lim E. J., Lee S. O. et al. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417 // Biotechnol. Appl. Biochem. — 2000. — V. 31. — P. 249–253.
38. Yazdani S. S., Gonzales R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. — 2007. — V. 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. — V. 40, N9. — P. 2953–2958.
40. Reiling, H. E., Thanei-Wyss U., Guerra-Santos L. H. et al. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* // Appl. Environ. Microbiol. — 1986. — V. 51, N5. — 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. — V. 21, N3. — P. 860–867.
42. Kuyukina M. S., Ivshina I. B., Philp J. C. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // J. Microbiol. Meth. — 2001. — V. 46, N2. — P. 149–156.
43. Philp J. C., Kuyukina M. S., Ivshina I. B. et al. Alkanotropic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — V. 59, N2–3. — P. 318–324.
44. Sen R. Response surface optimization of the critical media components for production of surfactin // J. Chem. Tech. Biotechnol. — 1997. — V. 68, N3. — 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. — V. 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. — V. 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. — V. 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. — V. 28, N4–5. — 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. — V. 40, N10. — 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. — V. 173, N13. — P. 4212–4219.
51. Tahzibi A., Kamal F., Assadi M. M. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutants // Iran. Biomed. J. — 2004. — V. 8, N1. — 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. — V. 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. — V. 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. — V. 61, N9. — 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. — V. 2, N2. — 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. — V. 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. — V. 33, N8. — P. 693–700.
58. Малащенко Ю. Р., Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Пинчук Г. Э. Регуляция синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом // Микробиол. журн. — 1993. — №2. — С. 35–41.
59. Миронов В. А., Сергеева А. В., Воронкова В. В., Даниленко В. Н. Биосинтез авермектинов: физиологические и технологические аспекты // Антибиот. 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 // Там же. — 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. Biotechnol. — 1987. — V. 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. — V. 35, N9. — P. 854–859.
63. Лесык О. Ю., Елисеев 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. — V.16, N11. — 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: Дис....канд. биол. наук. — К.: Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины, 2004. — 155с.
66. Шульга А. Н. Поверхностно-активные соединения, образуемые культурой бактерий *Bacillus subtilis* С-14: Дис....канд. биол. наук. — К.: Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1993. — 163 с.

**МИКРОБНЫЕ ПОВЕРХНОСТНО-
АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА:
ПРОБЛЕМЫ ПРОМЫШЛЕННОГО
ПРОИЗВОДСТВА**

Т. П. Пирог, С. В. Игнатенко

Национальный университет
пищевых технологий, Киев

E-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Представлены литературные и собственные экспериментальные данные авторов, касающиеся состояния и перспектив развития промышленного производства микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ). Отмечается, что высокая на сегодняшний день себестоимость микробных ПАВ обусловлена большими затратами на биосинтез и выделение целевого продукта, а также невысокой продуктивностью штаммов-продуцентов. Исследования, направленные на решение этих проблем, являются ключевыми и приоритетными в биотехнологии микробных ПАВ. Эффективность технологий микробных ПАВ может быть повышена за счет использования в качестве ростовых субстратов промышленных отходов, оптимизации условий культивирования продуцентов, внесения в среду предшественников биосинтеза, разработки рентабельных методов выделения ПАВ и получения штаммов-сверхсинтетиков, в том числе и рекомбинантных.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, технология биосинтеза, эффективность производства, промышленные отходы, условия культивирования, микроорганизмы-продуценты, выделение целевого продукта.

**MICROBIAL
SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES:
PROBLEMS OF COMMERCIAL
PRODUCTION**

T. P. Pirog, S. V. Ignatenko

National University of Food Technology, Kyiv

E-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

The review represents the data concerning state and perspective of development of surface-active substances (SAS) commercial production. Now the high prime cost of microbial SAS is conditioned by large costs on their biosynthesis, recovery and purification of base product and also low yields in production processes. The investigations directed on decision of these problems are key and priority in biotechnology of microbial SAS. The efficiency of microbial SAS technologies can be higher due to using of cheaper raw materials as growth substrates, optimization of cultivation conditions, addition into medium of biosynthesis of precursors and development of economically rational methods of SAS recovery and obtain hyper-producing strains including recombinant microorganisms.

Key words: surfactant species, biosynthesis technology, productive efficiency, factory waste, cultivation conditions, microorganisms-producers, isolation of desired product.