

JOLANTA KRZYCZKOWSKA, EWA BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK

BIOTECHNOLOGICZNA SYNTEZA ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH I PRZYKŁADY ICH PRAKTYCZNEGO ZASTOSOWANIA

Streszczenie

Surfaktanty, czyli substancje powierzchniowo czynne, są ważną grupą związków chemicznych, badanych i stosowanych w przemyśle i laboratoriach chemicznych. Obecnie obserwuje się tendencję do produkcji surfaktantów ze źródeł odnawialnych i biodegradowalnych. Taką grupę stanowią biosurfaktanty, które w porównaniu z surfaktantami syntetycznymi cechują się mniejszą toksycznością i lepszą środowiskową kompatybilnością. Biosurfaktanty mogą być otrzymywane metodą biotransformacji lub poprzez fermentację z udziałem bakterii, drożdży czy grzybów.

W niniejszym artykule dokonano krótkiej charakterystyki biosurfaktantów, omówiono biotechnologiczne metody ich syntezy, a także przedstawiono wybrane kierunki praktycznego zastosowania związków powierzchniowo czynnych.

Słowa kluczowe: biosurfaktanty, związki powierzchniowo czynne, biosynteza, mikroorganizmy, zastosowanie biosurfaktantów

Wprowadzenie

Dzięki bioprocessom stosowanym w biotechnologii przemysłowej można uzyskać m.in.: specyficzne związki chemiczne, optycznie czynne aminokwasy, środki zapachowe i smakowe, chiralne prekursory farmaceutyków, witaminy, półsyntetyczne antybiotyki, detergenty, biopestycydy czy biopolimery. Zastosowanie enzymów lub biokatalizatorów nowej generacji (np. abzymów, enzymów modyfikowanych chemicznie) pozwala na prowadzenie procesów, które są niemożliwe do wykonania klasycznymi metodami syntezy organicznej. Duże możliwości stwarza też wykorzystanie drobnoustrojów jako producentów substancji chemicznych. Postęp w dziedzinie inżynierii genetycznej, szczególnie w technice rekombinacji genów, umożliwia dokonywa-

nie szeregu zmian genetycznych w mikroorganizmach, pozwalających m.in. na uzyskiwanie zwiększonej wydajności syntezy pożądaných produktów.

Wśród szerokiej gamy związków syntetyzowanych przez drobnoustroje na uwagę zasługują surfaktanty, które ze względu na swoje właściwości i możliwości praktycznego zastosowania są przedmiotem szczególnego zainteresowania biotechnologów. W niniejszym artykule dokonano krótkiej charakterystyki związków powierzchniowo czynnych, biotechnologicznych metod ich syntezy, a także omówiono wybrane kierunki praktycznego zastosowania biosurfaktantów.

Budowa, właściwości i klasyfikacja biosurfaktantów

Biosurfaktanty definiowane są jako powierzchniowo czynne związki, produkowane przez mikroorganizmy, bądź otrzymywane metodami syntezy enzymatycznej, zdolne do obniżania napięcia powierzchniowego oraz napięcia na granicy faz [28]. O właściwościach tych cząsteczek decyduje ich specyficzna amfifilowa budowa – obecność części hydrofilowej i hydrofobowej [33]. W cząsteczkach biosurfaktantów część hydrofilową stanowi zazwyczaj fragment sacharydowy lub aminokwasowy, a hydrofobową – element kwasu tłuszczowego, a czasami układu steroidowego [21]. Według Rosenberg i Ron [40, 41] biosurfaktanty można podzielić na dwie zasadnicze grupy:

- związki o stosunkowo małej masie cząsteczkowej, do których zalicza się: glikolipidy, lipopeptydy, fosfolipidy czy neutralne lipidy,
- substancje wielkocząsteczkowe, wśród których przeważają związki polimerowe: emulsan, biodispersan, liposan oraz tak zwane specyficzne biosurfaktanty, np. całe komórki niektórych drobnoustrojów (*Cyanobacteria* spp.) [33].

Wśród glikolipidów przeważają związki składające się z cząsteczki mono- (ramnoza) lub disacharydu (soforoza) połączonej wiązaniem glikozydowym z kwasem hydroksytłuszczowym, który może być dodatkowo zestryfikowany kwasem 3-hydroksytłuszczowym w ramnolipidach, lub 17-hydroksytłuszczowym w soforolipidach. Trehalolipidy natomiast mają strukturę estrów trehalozy i kwasu mykolowego (2-alkilo-3-hydroksytłuszczowego). Lipopeptydy są cząsteczkami cyklicznymi, zbudowanymi z łańcucha oligopeptydowego i kwasu 3-hydroksytłuszczowego, zaś fosfolipidy to związki, które obok reszt kwasów tłuszczowych zawierają również reszty kwasu fosforowego(V). Biosurfaktanty polimerowe mają najczęściej strukturę lipopolisacharydu (emulsan, biodispersan) lub mannoprotein. Przykłady biosurfaktantów i produkujących je mikroorganizmów przedstawiono w tab. 1., a wzory wybranych biosurfaktantów na rys. 1.

Biosurfaktantami otrzymywanymi w wyniku biotransformacji są najczęściej monoacyloglicerole oraz estry kwasów tłuszczowych i monosacharydów lub polioli [49, 50, 57].

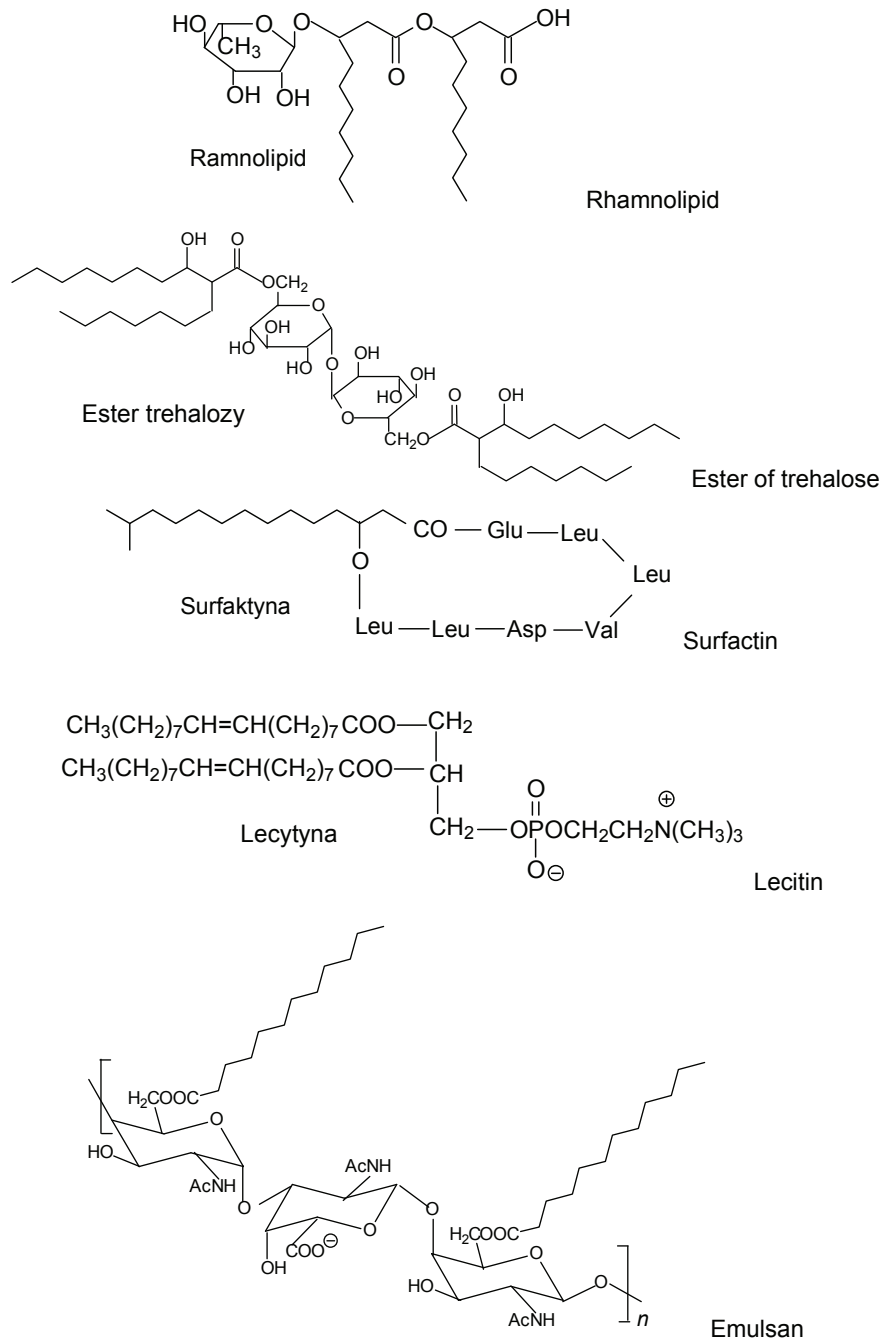
Tabela 1

Ważniejsze grupy biosurfaktantów i produkujące je mikroorganizmy.
Major groups of bio-surfactants and micro-organisms that produce them.

Glikolipidy / Glycolipids	
Ramnolipidy / Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas chlororaphis</i> , <i>Serratia rubidea</i>
Soforolipidy / Sophorolipids	<i>Candida bombicola</i> , <i>C. apicola</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>Torulopsis magnoliae</i> , <i>C. riidocensis</i>
Trehalolipidy / Trehalolipids	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Nocardia erythropolis</i>
Lipopeptydy / Lipopeptides	
Surfaktyna / Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
Wiskozyzna / Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc mesenteriods</i>
Fosfolipidy / Phospholipids	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Aspergillus</i> sp.
Lipidy neutralne / Neutral lipids	<i>Arthrobacter parrafineus</i> , <i>Corynebacterium lepus</i>
Biosurfaktanty polimerowe / Polymeric bio-surfactants	
Emulsan / Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Acinetobacter venetianus</i>
Liposan / Liposan	<i>Candida lipolytica</i> , <i>C. tropicalis</i>
Antybiotyki / Antibiotics	
Gramicydyna / Gramicidin	<i>Brevibacterium brevis</i>
Polimyksyna / Polymyxin	<i>Bacillus polymyxa</i>

Opracowanie własne na podstawie: / Author's own study based on: [13, 37, 40, 42]

Surfaktanty wytwarzane biotechnologicznie wykazują typowe właściwości powierzchniowo czynne i mogą pełnić zarówno rolę emulgatorów, jak i deemulgatorów, rozpuszczalników, detergentów, czynników zwilżających czy zmniejszających lepkość. W odróżnieniu jednak od odpowiedników syntetycznych cechują się one mniejszą toksycznością, większą biodegradowalnością, lepszą środowiskową kompatybilnością i wyższą stabilnością przy ekstremalnych wartościach pH, temperatury i zasolenia środowiska [28, 44]. Ponadto surfaktanty pochodzenia biologicznego wykazują stosunkowo niskie wartości krytycznego stężenia micelnego (CMC), wysoką skuteczność solubilizacji, cechuje je niski koszt wytwarzania przy masowej produkcji oraz możliwość produkcji *in situ* [23]. Dodatkowo większość biosurfaktantów ma różnorodną aktywność biologiczną. Znane są w literaturze przykłady biosurfaktantów o właściwościach przeciwnowotworowych czy przeciwdrobnoustrojowych [13, 22].



Rys. 1. Przykłady biosurfaktantów produkowanych przez mikroorganizmy.

Fig. 1. Examples of bio-surfactants produced by micro-organisms.

Skuteczność biosurfaktantów determinowana jest ich zdolnością do obniżania napięcia powierzchniowego oraz napięcia na granicy faz. Przyjmuje się, że dobry surfaktant to taki, który jest zdolny do obniżenia napięcia powierzchniowego wody z wartości 72 do 35 mN/m oraz napięcia między fazami: woda/*n*-heksadekan z wartości 40 do 1 mN/m. Efektywny surfaktant cechuje się również niskim krytycznym stężeniem micelizacji CMC (*ang. critical micelle concentration*). Przyjmuje się, że skuteczne progowe stężenie biosurfaktantów, przy którym obecne są agregaty ich cząsteczek, powinno wynosić w granicach od 1 do 200 mg/dm³ [29, 33].

Otrzymywanie biosurfaktantów

Biosurfaktanty mogą być bezpośrednio syntetyzowane przez mikroorganizmy (np. sferolipidy przez *Candida bombicola* czy ramnolipidy przez *Pseudomonas aeruginosa*) lub otrzymywane w wyniku reakcji enzymatycznej metodą biotransformacji. Można je również wydzielać bezpośrednio z niektórych produktów pochodzenia roślinnego (np. lecytynę z nasion soi) [54].

Synteza biosurfaktantów przez mikroorganizmy

Sekrecja surfaktantów wytwarzanych przez drobnoustroje uzależniona jest od wykazywanych przez nie właściwości. W przeważającej części biosurfaktanty syntetyzowane są wewnątrz komórek mikroorganizmów, gdzie pełnią rolę składników odżywczych, umożliwiają adsorpcję genów czy sekwestrację związków toksycznych [51]. Część związków powierzchniowo czynnych wydzielana jest również na zewnątrz komórek. Niewielkie ilości biosurfaktantów mogą być gromadzone także na powierzchni drobnoustrojów, dotyczy to głównie związków stanowiących lipidy ściany komórkowej oraz biosurfaktantów pozakomórkowych zdolnych do adsorpcji na powierzchni komórki [19, 51]. Dobrym przykładem są bakterie z rodzaju *Myxococcus*, u których surfaktanty wydzielane są miejscowo, przez co wytwarza się asymetryczna siła napięcia powierzchniowego, umożliwiająca przemieszczanie się komórek [27].

Synteza biosurfaktantów powiązana jest z fazami wzrostu mikroorganizmów, a te uzależnione są od warunków procesu hodowli, od zawartości składników odżywczych w podłożu, zawartości komórek w medium hodowlanym i ilości wytwarzanych przez nie produktów ubocznych [14].

Czynniki wpływające na wydajność syntezy biosurfaktantów

Badania naukowe potwierdzają, że podłoże zastosowane w hodowli mikroorganizmów (zawierające właściwe źródło węgla i azotu) oraz odpowiednio dobrane warunki wzrostu (temperatura namnażania drobnoustrojów i pH podłoża) mają istotny wpływ na typ syntetyzowanych biosurfaktantów oraz osiąganą wydajność [6, 14]. Przy wzro-

ście drobnoustrojów w optymalnych warunkach widoczna jest wyraźna zależność pomiędzy ich namnażaniem, wykorzystaniem substratów z podłoża a syntezą biosurfaktantów. Taką relację obserwowano m.in. w syntezie ramnolipidów przez *Pseudomonas* spp., w produkcji glikopeptydów przez *Pseudomonas fluorescens*, związków aktywnych powierzchniowo syntetyzowanych przez *Bacillus cereus* IAF 346 czy w produkcji biodispersanu z udziałem szczepu IAF-343 *Bacillus* spp. [14].

Źródło węgla

W syntezie biosurfaktantów wykorzystywane są zróżnicowane źródła węgla. Większość związków powierzchniowo czynnych produkowana jest przy udziale substratów węglowodorowych. Obecność w podłożu węglowodorów sprzyja m.in. syntezie soforolipidów przez drożdże *Torulopsis magnoliae*, trehalolipidów wytwarzanych przez *Rhodococcus erythropolis* czy glikolipidów produkowanych przez *Pseudomonas aeruginosa* SB-30 [6]. Również rozpuszczalne w wodzie substraty, takie jak: glicerol, glukoza, mannitol czy etanol wykorzystywane są w produkcji biosurfaktantów. Szczególnie korzystne oddziaływanie tych związków odnotowano w syntezie ramnolipidów produkowanych przez *Pseudomonas* spp. [14]. W przypadku bakterii *Bacillus subtilis* MTCC 2423 nie tylko glukoza i sacharoza, ale również cytrynian i pirogronian sodu były efektywnymi induktorami biosyntezy surfaktantów [25].

Wytwarzanie związków powierzchniowo czynnych możliwe jest także w obecności w podłożu komponentów lipidowych. Olej sojowy jest dobrym induktorem soforolipidów syntetyzowanych przez drożdże *Candida bombicola*. W jego obecności możliwe jest wytworzenie nawet 0,35 g biosurfaktantu na gram użytego substratu [29]. *Candida bombicola* może być również stymulowana w kierunku syntezy innych glikolipidów. Dodatek oliwy do podłoża, z 10 % zawartością glukozy, umożliwia osiągnięcie nawet 80 g glikolipidów w dm³ podłoża. Stuver i wsp. [46], stosując podłoże glukozowe z dodatkiem oleju słonecznikowego, osiągnęli jeszcze wyższą wydajność syntezy tych biosurfaktantów – powyżej 90 g/dm³ w hodowli drożdży *Torulopsis apicola*.

Ze względu na to, że coraz więcej uwagi poświęca się zagadnieniom ochrony środowiska, wiele badań nad syntezą surfaktantów dotyczy wykorzystania surowców odpadowych. Możliwość produkcji związków powierzchniowo czynnych przy jednoczesnym zagospodarowaniu produktów ubocznych jest korzystna zarówno w aspekcie ekologicznym, jak i ekonomicznym. Udowodniono, że w ten sposób możliwa do osiągnięcia jest nawet 50 % redukcja kosztów wytworzenia produktu finalnego [24].

Spośród surowców odpadowych w syntezie surfaktantów wykorzystywano m.in.: serwatkę, wodę będącą pozostałością po procesie suszenia torfu, otręby pszenne i okarę oraz produkt uboczny z ekstrakcji oliwy z oliwek [24]. Dobrą wydajność syntezy ramnolipidów na podłożu serwatkowym osiągnięto m.in. z udziałem bakterii *Pseudo-*

monas aeruginosa. Woda stanowiąca surowiec odpadowy w procesie suszenia torfu, zawierająca znaczące ilości glukozy, galaktozy i ksylozy była dobrym podłożem do wzrostu bakterii *Bacillus subtilis*, syntetyzujących surfaktanty charakteryzujące się stosunkowo małym krytycznym stężeniem micelizacji (CMC) – 8 mg/dm³ [24, 26]. Efektywna synteza m.in. ituryny i surfaktyny z udziałem szczepu NB 22 *Bacillus subtilis* była możliwa również z wykorzystaniem okary – produktu odpadowego, powstającego w przemysłowym procesie wytwarzania tofu. Odpad po procesie ekstrakcji oliwy z oliwek (OOME – *olive oil mill effluent*), stanowiący istotny problem w krajach śródziemnomorskich, okazał się dość dobrym podłożem, sprzyjającym produkcji ramnolipidów przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Spośród 22 szczepów tego rodzaju 15 wykazywało dobry wzrost i możliwość produkcji biosurfaktantów, cechujących się zdolnością obniżania napięcia powierzchniowego z poziomu 40 mN/m do ok. 30 mN/m oraz zmniejszania napięcia na granicy faz z wartości 21 mN/m do 5 mN/m [24, 26]. W syntezie biosurfaktantów z powodzeniem wykorzystywano, jako hydrofobowe źródło węgla, również kondensat podezodoryzacyjny – produkt odpadowy przemysłu tłuszczowego. Stosując podłoże, w którym na 1 g kondensatu przypadało 3 g glukozy i 0,05 g ekstraktu drożdżowego Gumienna i wsp. [18] osiągnęli, z udziałem drożdży *Candida bombicola*, wydajność rzędu 118 g soforolipidów na 1 dm³ podłoża.

Przykładowe wydajności syntez biosurfaktantów, przy zastosowaniu w hodowli mikroorganizmów surowców odpadowych przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Surowce odpadowe stosowane w mikrobiologicznej syntezie biosurfaktantów.
Waste raw materials applied to micro-biological synthesis of bio-surfactants.

Surowce odpadowe Waste Raw Materials	Typ biosurfaktantu Bio-surfactant type	Szczep mikroorganizmu Micro-organism strain	Wydajność [g/dm ³] Max yields [g/dm ³]	Źródło References
Olej odpadowy po procesie smażenia Waste frying oil	Ramnolipidy Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB	2,7	[20]
Odpady porafinacyjne z procesu rafinacji olejów Oil refinery wastes	Glikolipidy Glycolipids	<i>Candida antarctica</i> , <i>Candida apicola</i>	10,5 13,4	[5]
Odpady gorzelnicze Distillery wastes	Ramnolipidy Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2	0,92	[15]
Surowiec odpadowy po procesie produkcji tapioki Cassava flour wastewater	Lipopeptydy Lipopeptide	<i>Bacillus subtilis</i>	2,2 - 3,0	[34]

Źródło azotu

W regulacji syntezy biosurfaktantów istotne znaczenie ma również odpowiednio dobrane źródło azotu. Bakterie *Arthrobacter parafineus* są wydajnym producentem związków powierzchniowo czynnych w obecności soli amonowych i mocznika. Poziom syntezy biosurfaktantów z udziałem tego gatunku może być podwyższony poprzez dodatek aminokwasów, w tym szczególnie kwasu asparaginowego, glutaminowego lub glicyny [14]. W syntezie ramnolipidów przez *Pseudomonas* 44T1 skuteczna jest obecność azotanu sodu. Korzystny wpływ tej soli oraz azotanu amonu odnotowano również w badaniach nad intensywnością namnażania i syntetyzowania biosurfaktantów przez *Pseudomonas fluorescens* [1]. Sole kwasu azotowego sprzyjają także produkcji biosurfaktantów przez drobnoustroje *Corynebacterium lepus*, które najwyższą wydajność osiągają w fazie wzrostu logarytmicznego [6]. Azotan potasu to najkorzystniejsze źródło azotu również w przypadku syntezy surfaktantów przez drożdże *Rhodotorula glutinis* IIP30 [42].

Dodatek azotu może jednak również ograniczać syntezę związków powierzchniowo czynnych. Takie działanie udowodniono m.in. w syntezie biosurfaktantów z udziałem bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia* szczep SFC-D czy drożdży *Candida tropicalis* IIP-4 [2]. W przypadku *Pseudomonas aeruginosa* maksymalny poziom produkcji ramnolipidów możliwy był dopiero przy ograniczeniu źródła azotu i zachowaniu stosunku masowego substratów węglowych i azotanowych w granicach 16 : 1 - 18 : 1 [17].

Czynniki środowiskowe

Spośród czynników fizykochemicznych wartość pH podłoża jest głównym elementem decydującym m.in. o syntezie soforolipidów przez drożdże *T. bombicola* czy ramnolipidów przez bakterie *Pseudomonas* spp. O ile w przypadku wyżej wymienionych drożdży wydajna synteza surfaktantów, przy zachowaniu ich pożądanych właściwości, możliwa jest w granicach pH podłoża 6 - 9, o tyle w przypadku bakterii efektywna produkcja ramnolipidów obserwowana jest w dużo węższym zakresie kwasowości (pH w przedziale 6,0 - 6,5). Przekroczenie poziomu pH 7 sprawia, że wydajność drastycznie maleje [14, 29]. Utrzymanie wartości pH w granicach 7,0 - 9,0 pożądane jest w procesie namnażania i syntezy biosurfaktantów przez bakterie *Bacillus licheniformis* F2.2. W przypadku tego szczepu zmniejszenie pH do poziomu 4,0 - 4,5 powoduje utratę właściwości obniżania napięcia powierzchniowego przez wytwarzane związki [48].

Temperatura i poziom natlenienia pożywki stanowią również istotny parametr w syntezie surfaktantów. Zaobserwowano, że intensywność napowietrzania podłoża była podstawowym elementem w optymalizacji produkcji związków powierzchniowo czynnych przez bakterie *Bacillus subtilis* [2]. Yakimov i wsp. [55], prowadząc badania

nad syntezą biosurfaktantów przez *Bacillus licheniformis* BAS50 w warunkach tlenowych i beztlenowych, zaobserwowali, że natlenianie podłoża przyczynia się do skrócenia lag fazy, podwyższenia plonu biomasy komórkowej i wydajności syntezy. Korzystnie działa na zdolność wytworzonych biosurfaktantów do obniżania napięcia powierzchniowego. O ile w przypadku hodowli beztlenowej w fazie logarytmicznej możliwe było obniżenie wartości napięcia powierzchniowego do 35 mN/m o tyle przy hodowli tlenowej wartość ta zmniejszyła się do 28,3 mN/m.

Optymalizacja temperatury hodowli mikroorganizmów ma również istotne znaczenie. Stwierdzono bowiem, iż zróżnicowanie temperatury podczas hodowli może przyczyniać się do zmiany składu syntetyzowanych przez mikroorganizmy surfaktantów [14]. Taką zależność temperaturową odnotowano m.in. w syntezie ituryny A oraz surfaktyny przez bakterie *Bacillus subtilis* RB14. Podczas hodowli na tym samym podłożu, w temperaturze 25°C bakterie syntetyzowały iturynę A, zaś w 37°C surfaktynę [35].

Modyfikacje genetyczne

Stworzenie optymalnych warunków hodowli nie jest jedynym możliwym rozwiązaniem prowadzącym do efektywnej produkcji związków powierzchniowo czynnych. Z uwagi na to, że procesy biotechnologiczne z zastosowaniem mikroorganizmów wyizolowanych bezpośrednio ze środowiska naturalnego przebiegają na ogół z wydajnością niewystarczającą, aby ich użycie na skalę przemysłową było opłacalne ekonomicznie, w ostatnich latach intensyfikację syntezy surfaktantów prowadzi się poprzez liczne modyfikacje genetyczne. Modyfikację genotypu szczepu macierzystego, wyizolowanego z próbki środowiskowej i scharakteryzowanego taksonomicznie prowadzi się najczęściej metodą mutagenyzy indukowanej *in vivo* bądź fuzji protoplastów komórek szczepów pochodzących od genetycznie różniących się przodków. Doskonalenie mikroorganizmów za pomocą mutagenyzy możliwe jest poprzez wykorzystanie transpozonów, *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyny, radiacji czy selekcji dokonywanej na podstawie odporności na jonowe detergenty, takie jak bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB) [12].

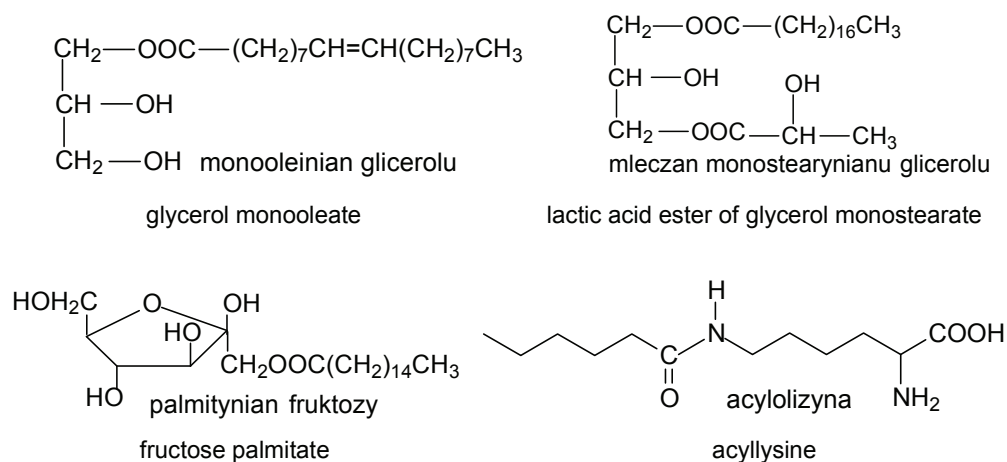
Genetyczną regulację syntezy biosurfaktantów prowadzono najczęściej z udziałem bakterii rodzaju *Bacillus* oraz *Pseudomonas* [12, 47]. Taki wybór wynikał zarówno ze znajomości genomu (*Pseudomonas*), jak i możliwości aplikacyjnymi konkretnych biosurfaktantów (np. lipopeptydów). Biosynteza lipopeptydów przez bakterie z rodzaju *Bacillus* wzbudza szczególne zainteresowanie ze względu na możliwość ich zastosowania jako potencjalnych antybiotyków. Szczep *Bacillus subtilis* MI 113 modyfikowano w kierunku wydajnej syntezy surfaktyny (rys. 1) (cyklicznego lipopeptydu o aktywności antybiotyku). Po wprowadzeniu do bakterii plazmidu zawierającego gen *lpa-14* możliwe było osiągnięcie nawet 8-krotnie wyższej wydajności. Mutageniza,

przy zastosowaniu czynnika chemicznego *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyny dla tego samego gatunku (szczep SD901) skutkowałą nawet 25-krotnie wyższym poziomem syntetyzowanej surfaktyny (ok. 50 g/dm³) [28]. W przypadku Gram-ujemnych bakterii *Pseudomonas aeruginosa* modyfikacja dotyczyła m.in. poprawy wydajności syntezy ramnolipidów na podłożach odpadowych, głównie serwatkowych. Osiągnięto to poprzez wprowadzenie genu *lacZY* z *Escherichia coli* do genomowego DNA *Pseudomonas aeruginosa* [28].

Modyfikacje genetyczne prowadzono również w przeciwnym kierunku, m.in. celem inaktywacji genu *swrW* kodującego syntazę serrawetyny W1, aktywnego powierzchniowo egzolipidu wytwarzanego przez pałeczki *Serratia marcescens*. Modyfikacja ta stosowana była z uwagi na fakt, że proces wytwarzania serrawetyny W1 utrudniał wydzielanie równolegle syntetyzowanego 2,3-butanodiolu (związku stanowiącego istotę tej syntezy), ze względu na nadmierne pienienie się środowiska reakcji [58].

Biotransformacyjne metody syntezy biosurfaktantów

Obok możliwości wytwarzania biosurfaktantów podczas fermentacji z udziałem wielu gatunków mikroorganizmów, duży potencjał tkwi także w produkcji tych związków poprzez biotransformację. Użycie wyizolowanych enzymów pozwala na otrzymanie szeregu związków powierzchniowo czynnych (rys. 2), o pożądanym właściwościach fizykochemicznych.



Rys. 2. Przykłady biosurfaktantów otrzymywanych w reakcjach enzymatycznych.

Fig. 2. The examples of bio-surfactants produced using enzymatic reactions.

Wśród biosurfaktantów otrzymywanych metodami enzymatycznymi wyróżnić można monoacyloglicerole i ich pochodne, w tym octany (E 471), mleczały (E 472a) i cytryniany (E 472b) monoacylogliceroli – związki wykazujące właściwości detergentowe i mające zdolność do tworzenia w wodnych roztworach struktur micelarnych. Enzymatyczna synteza tych związków polega na estryfikacji i transestryfikacji kwasów tłuszczowych lub na glicerolizie tłuszczów i olejów, w temperaturze pokojowej, z udziałem lipaz 1,3-specyficznych [43].

Podczas biotransformacji możliwe jest otrzymanie estrów kwasów tłuszczowych i związków polihydroksylowych – przede wszystkim mono- i disacharydów, a także sorbitolu, ksylitolu i kwasu askorbinowego [39]. Estry sacharydów należą do biosurfaktantów o rosnącym znaczeniu praktycznym. Związki te wykazują właściwości prebiotyczne, co w sposób szczególny predysponuje je jako składniki żywności [3].

Badania nad syntezą estrów kwasów tłuszczowych i sacharydów prowadzone są na szeroką skalę i dotyczą m.in. doboru: środowiska reakcji, proporcji molowych substratów, właściwych parametrów procesu. Szczególnie dobór odpowiedniego rozpuszczalnika stanowi problem. Środowisko wodne jest nieodpowiednie do syntezy estrów (hydroliza), a użycie w reakcjach rozpuszczalników organicznych jest limitowane rozpuszczalnością sacharydów [50]. Przyjmuje się, że do całkowitego rozpuszczenia cukrów używanych w syntezie niejonowych surfaktantów konieczne jest zastosowanie nawet 500-krotnego nadmiaru rozpuszczalnika organicznego [49]. W celu zapewnienia większych wydajności syntezy istotne jest dobranie takiego rozpuszczalnika, który nie tylko dobrze rozpuszcza substraty, ale jednocześnie zapewnia małą rozpuszczalność produktu, umożliwiając jego krystalizację i osiągnięcie równowagi reakcji [56]. Dodatkowo zastosowane środowisko reakcji nie może negatywnie wpływać na aktywność i selektywność stosowanych w procesie lipaz.

Šabeder i wsp. [49], pracując nad syntezą palmitynianu fruktozy z udziałem immobilizowanej lipazy Novozym 435, przebadali cztery rozpuszczalniki: 2-metylo-2-butanol, *tert*-butanol, aceton oraz butanon (keton etylowo-metylowy). Największe przereagowanie osiągnięto właśnie w obecności tego ostatniego: 72-godzinna estryfikacja w temp. 40 °C w obecności butanonu umożliwiła 82 % przereagowanie, a w przypadku pozostałych rozpuszczalników wartości te wahały się w granicach odpowiednio: 69 % w obecności acetonu, 64 % – *tert*-butanolu i 61 % – 2-metylo-2-butanolu. Otrzymane wyniki były zbliżone do rezultatów zespołu Yana i wsp. [56], którzy w syntezie monoestrów kwasów tłuszczowych i β -D(+)-glukozy w obecności immobilizowanej lipazy *Candida antarctica*, spośród zastosowanych rozpuszczalników: heksanu, acetonu, butanonu, metanolu i etanolu, za najlepsze uznali: aceton i butanon. Rozpuszczalność glukozy w tych środowiskach była wystarczająca i sięgała poziomu 0,08 mg/cm³ w obecności butanonu oraz 0,35 mg/cm³ przy zastosowaniu acetonu. Aceton okazał się również korzystnym rozpuszczalnikiem w syntezie palmi-

tynianu glukozy, prowadzonej w temperaturze 60 °C w obecności lipazy *Candida antarctica* B. Osiągano wówczas 87 % wydajność [7]. W skali laboratoryjnej, z powodzeniem acylowano cukry także przy użyciu takich rozpuszczalników, jak pirydyna czy dimetyloformamid. Z uwagi jednak na swoją toksyczność substancje te nie znalazły zastosowania w syntezach przemysłowych [50].

Na środowisko syntezy estrów, a zarazem na wydajność ich tworzenia wpływają także fizykochemiczne właściwości oraz proporcje molowe stosowanych substratów. Cao i wsp. [8], prowadząc acylowanie glukozy przy użyciu kwasu palmitynowego i jego pochodnych (w tym estru metylowego, winylowego, tripalmityny i bezwodnika), największą wydajność, sięgającą poziomu 80 %, uzyskali stosując palmitynian winylu. Podyktowane jest to nieodwracalnym etapem tautomerizacji uwalnianego alkoholu winylowego do acetaldehydu. Wykorzystując lipazę N-435 Ward i wsp. [52] przeprowadzili estryfikację dziesięciu kwasów tłuszczowych (laurynowego, mirystynowego, palmitynowego, stearynowego, arachidowego, behenowego, oleinowego, arachidonowego, eikozapentaenowego i dokozaeksaenowego) 1,2-*O*-izopropylideno-D-ksylofuranozą. Przy zastosowaniu substratów w stosunku molowym 1 : 1, wydajność reakcji kształtowała się na poziomie średnio od 32 % w przypadku kwasu behenowego do 90 % – kwasu laurynowego. Na podstawie tych badań wnioskowano, że reakcje z zastosowaniem nienasyconych kwasów tłuszczowych cechują się większą wydajnością.

W kontekście osiągania największych wydajności syntezy estrów sacharydów, przy zastosowaniu zróżnicowanych stężeń molowych substratów Yoo i wsp. [57] wykazali, że w syntezie oleinianu ksylitolu korzystne jest użycie substratów (cukier/kwas tłuszczowy) w stosunku molowym 3 : 1. W zastosowanych przez autorów warunkach zapewniało to przereagowanie rzędu 98 %. Zupełnie odmienne rezultaty opisują Antczak i wsp. [3]. Autorzy podają, że optymalna wartość stosunku molowego substratów, warunkująca maksymalną wydajność wielu syntetyzowanych estrów sacharydów wynosi 1 : 4 (cukier/kwas tłuszczowy). Należy zatem pamiętać, że każda zaplanowana biosynteza konkretnego surfaktantu wymaga indywidualnego dopracowania warunków środowiskowych, doboru właściwych substratów i ich stężeń oraz przetestowania różnych katalizatorów.

Biotransformacje z udziałem lipaz umożliwiają syntetyzowanie nie tylko estrów sacharydów, ale również estrów aminokwasów i amidów. Związki te cechują się dobrymi właściwościami emulgującymi, a także aktywnością przeciwdrobnoustrojową i znajdują zastosowanie w medycynie, kosmetyce czy żywieniu. Z udziałem lipaz z powodzeniem syntetyzowano oleilo-L-homoserynę [32]. Biosurfaktant ten wykazywał dobre właściwości emulgujące i był skutecznym w stabilizacji emulsji typu o/w. Sposobem biotransformacji prowadzono także m.in. acylację grupy aminowej aminokwasów amidowych, z zastosowaniem wolnych kwasów tłuszczowych lub ich estrów

metylowych. Wydajność tych procesów sięgała poziomu 50 %. Produkty reakcji były następnie ilościowo przekształcane pod wpływem karboksyeptydazy Y w *N*-acylowane aminokwasy. Przy udziale lipazy *Mucor miehei* syntetyzowano również *N*-acylolizynę. Proces prowadzono przez 7 dni w temperaturze 90 °C, stosując jako substraty wolne aminokwasy i olej roślinny [43].

Podczas syntezy enzymatycznej otrzymywane są również fosfolipidy – surfaktanty szczególnie stosowane w medycynie i kosmetyce. Naturalnie występujące fosfolipidy były z sukcesem modyfikowane m.in. przez lipazy z drożdży *Candida cylindracea* i grzybów *Rhizopus delemar*. Przy udziale drożdżowej fosfolipazy D (PLD), kodowanej w genie *spo14*, możliwa była wysoko wydajna synteza fosfatydyloseryny i fosfatydyloglicerolu – fosfolipidów wytwarzanych naturalnie w niewielkich ilościach. Substratami w tych reakcjach były lecytyna (fosfatydylocholina) i odpowiednio: seryna bądź glicerol [43].

Innymi przykładami mikrobiologicznych syntez pożądaných surfaktantów mogą być transformacje *n*-alkanów do kwasów α,ω -dikarboksylowych, prowadzone z 70 % wydajnością przez mutanty *Candida tropicalis* bądź konwersja kwasu oleinowego do rycynowego przez bakterię glebową BMD-120 [14].

Zastosowanie biosurfaktantów

Z uwagi na różnorodne właściwości fizykochemiczne, małą toksyczność i szybką biodegradowalność biosurfaktanty znalazły szerokie zastosowanie przemysłowe. Związki te są coraz powszechniej wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, w produkcji detergentów, w przemyśle spożywczym, rolniczym, włókienniczym, celulozowym i papierniczym oraz petrochemicznym [4, 31, 45].

Dzięki właściwościom przeciwdrobnoustrojowym biosurfaktanty od wielu lat stosowane są jako antybiotyki. Przykładem są polimyksyny czy gramicydyny. Przeciwdrobnoustrojową aktywność wykazują m.in. ramnolipidy produkowane przez *P. aeruginosa* i większość lipopeptydów wytwarzanych przez rodzaj *Bacillus*. Coraz więcej badań wskazuje na biosurfaktanty, jako czynniki przeciwnowotworowe. Rola glikolipidów w hamowaniu rozwoju raka płuc, mózgu czy białaczki została potwierdzona przez wielu badaczy [4, 22]. Biosurfaktanty, z uwagi na zdolność obniżania napięcia powierzchniowego na granicy faz, mogą chronić różnego rodzaju powierzchnie przed przyleganiem do nich mikroorganizmów, co w medycynie ma istotne znaczenie. Zaobserwowano, że surfaktanty wydzielane przez probiotyczny szczep *Streptococcus thermophilus* hamują adhezję drożdży *Candida albicans* do silikonowych powierzchni, a biosurfaktant wytwarzany przez *Lactobacillus acidophilus* hamuje adhezję do silikonu nie tylko *Candida albicans*, ale również bakterii uropatogennych [22]. Podobne właściwości wykazuje biosurfaktant wytwarzany przez *Pseudomonas fluorescens* w stosunku do bakterii *Listeria monocytogenes* LO28 [44].

W przemyśle kosmetycznym, biosurfaktanty, dzięki swym przeciwdrobnoustrojowym właściwościom, stosowane są m.in. w produkcji: dezodorantów, past do zębów, płynów do soczewek kontaktowych, produktów przeciwtrądzikowych czy przeciwłupieżowych. Związki te są istotnymi składnikami również kremów i maseczek, w których pełnią rolę emulgatorów, środków dyspergujących czy zwilżających. Soforolipidy produkowane przez drożdże *Candida apicola* i *Candida bombicola* są przemysłowo wykorzystywane jako związki zwilżające przez koncern Kao Co. Ltd. w kosmetykach z serii Sofina [26].

Związki powierzchniowo czynne to składniki proszków i płynów do prania oraz środków do mycia naczyń. Dodatek biosurfaktantów w tych produktach umożliwia zmniejszenie stężenia stosowanego środka chemicznego. Ponadto, biodegradowalność biosurfaktantów i enzymów sprawia, że produkty je zawierające mogą mieć status „bio”. Biosurfaktanty (bioemulgatory) są dodawane również m.in. do rozpuszczalników chlorowanych, powszechnie stosowanych do czyszczenia płyt elektronicznych [41].

W przemyśle spożywczym biosurfaktanty stosowane są przede wszystkim jako emulgatory sosów i majonezów. Bioemulgator syntetyzowany przez drożdże *Candida utilis* stosowany jest m.in. w dressingach sałatkowych [4]. Surfaktanty wytwarzane mikrobiologicznie używane są również przy produkcji: margaryn, lodów, kremów cukierniczych, czekolad czy polew do ciast. Szczególną rolę pełnią tu estry sacharydów, które podczas produkcji margaryn umożliwiają tworzenie doskonałych emulsji typu w/o, poprawiają ich dyspersję, stabilizują właściwości kremów i bitej śmietany w spray’u, dodane do lodów poprawiają ich puszystość i zapobiegają wydzielaniu się tłuszczu podczas zamrażania [3]. W produktach mięsnych rola biosurfaktantów sprowadza się do polepszania właściwości reologicznych oraz sensorycznych finalnego wyrobu, poprzez poprawę stopnia związania wody technologicznej, lepsze zemulgowanie tłuszczu i jego równomierną i trwałą dyspersję przestrzenną w masie gotowego przetworu [4].

Interesujące wydaje się zastosowanie biosurfaktantów w rolnictwie. Dzięki aplikacji surfaktantów m.in. w środkach ochrony roślin, możliwa jest lepsza rozpuszczalność hydrofobowych pestycydów. Dodatkowo wytworzenie mikroemulsji ułatwia penetrację środka chemicznego poprzez znacznie większe pole powierzchni kontaktu. Środki ochrony roślin zawierające surfaktanty charakteryzują się ponadto dużą skutecznością działania biologicznego przy zmniejszonym ryzyku stosowania [4].

Pozytywne efekty stosowania biosurfaktantów zauważalne są również w przemyśle tekstylnym. Ich stosowanie zapewnia tkaninom lepszą trwałość w trakcie prania, zwiększa ich odporność na otarcia oraz pozwala osiągnąć większą gładkość tkaniny [4].

Istotnym aktualnie obszarem zastosowań biosurfaktantów jest przemysł wydobywczy ropy naftowej. Wprowadzanie do złóż roztworów surfaktantów i w efekcie obniżanie napięcia powierzchniowego pomiędzy ropą naftową a skałą przyczynia się do wydobycia większej jej ilości [16]. Biosurfaktanty wykorzystywane są także na szeroką skalę w remediacji i detoksyfikacji gruntów. W konwencjonalnym podejściu zanieczyszczenia usuwane są nieefektywnie, przy zaangażowaniu znacznej energii i kosztów. Przemywanie złoża roztworami biosurfaktantów, prowadzone *in situ*, powoduje znaczne obniżenie napięcia międzyfazowego i powierzchniowego pomiędzy zanieczyszczeniem i gruntem oraz umożliwia zmniejszenie sił kapilarnych odpowiedzialnych za zatrzymanie zanieczyszczeń w porach gruntu. Cały układ staje się wówczas bardziej mobilny i oderwanie zanieczyszczeń hydrofobowych od cząstek gleby jest dużo łatwiejsze [38]. Zachodzący proces solubilizacji intensyfikuje rozpuszczanie polarnych i niepolarnych związków chemicznych [53]. Prace w tym obszarze koncentrują się w głównej mierze na usuwaniu policyklicznych węglowodorów aromatycznych, polichlorowanych bifenyli czy chlorowcopochodnych węglowodorów nasyconych [30, 37].

Aktualnie prowadzone są liczne badania nad odpowiednim doбором i przygotowaniem zespołów współdziałających ze sobą mikroorganizmów – konsorcjów mikroorganizmów, wyspecjalizowanych w rozkładzie węglowodorów naftowych. Celem poprawy transportu tych węglowodorów do komórek mikroorganizmów i ich biodostępności analizowany jest dodatek związków powierzchniowo czynnych. Owsianiak i wsp. [36] na przykładzie konsorcjum mikroorganizmów wyizolowanych z ropy naftowej badali wpływ dodatku biosurfaktanta na stopień biodegradacji mieszaniny diesla i biodiesla. Przy wprowadzeniu do podłoża ramnolipidów w ilości 150 mg/dm^3 , stosując w mieszaninie 10, 30 i 50 % dodatek biodiesla obserwowano, że biosurfaktanty działają efektywnie jedynie przy niskiej (10 %) jego zawartości. Zbliżone badania prowadził również zespół Chrzanowskiego i wsp. [9]. Autorzy oceniali wpływ dodatku dostępnych handlowo ramnolipidów JBR425 na tempo biodegradacji diesla i mieszaniny B20 (20 % biodiesla i 80 % diesla (v/v)) przez konsorcjum bakterii pochodzących z zaolejonej gleby. Na podstawie badań zaobserwowano, że w warunkach tlenowych obecność ramnolipidów w ilości 150 mg/dm^3 korzystnie oddziałuje na degradację mieszaniny B20, natomiast nie wpływa na tempo rozkładu czystego diesla. Chrzanowski i wsp. [11] stosowali również dodatek ramnolipidów do modelowej mieszaniny węglowodorów i fenolu, 4-chlorofenolu oraz 2,4-dichlorofenolu. Ich badania potwierdziły, że ramnolipidy wchodzące w interakcję z chlorowcopochodnymi fenolu zmniejszały ich toksyczność, prowadziły do solubilizacji hydrofobowych związków, a w konsekwencji stymulowały proces biodegradacyjny.

W pracach nad dodatkiem biosurfaktantów potwierdzono również ich wpływ na zmiany w hydrofobowości komórek bakteryjnych [36]. Obecnie na szeroką skalę pro-

wadzone są analizy funkcji ramnolipidów z perspektywy kolonizowania otoczenia, tworzenia i rozpadu biofilmów bakteryjnych oraz specyficznej aktywności wobec innych organizmów [10].

Podsumowanie

Biotechnologiczna synteza surfaktantów – przyjazna środowisku i człowiekowi – stanowi alternatywę dla typowych procesów chemicznych. Biosurfaktanty mają duży potencjał aplikacyjny, a ich zwiększająca się produkcja i zużycie dowodzą, że istnieje zapotrzebowanie na tę grupę substancji. Związki powierzchniowo czynne, otrzymywane przy zastosowaniu mikroorganizmów mających status GRAS, np. bakterii z rodzaju *Lactobacillus* czy drożdży, mogą być stosowane w branży spożywczej i medycznej. Perspektywa biosyntezy nowych typów surfaktantów z udziałem mikroorganizmów wiąże się m.in. z badaniem molekularnych mechanizmów ich tworzenia, poszukiwaniem nowych, bardziej wydajnych szczepów (np. wśród termofili, psychrofilii, bądź halofili), opracowaniem tańszych metod wydzielania biosurfaktantów (precypitacja, frakcjonowanie, filtracja, krystalizacja), a także z przemysłowym zagospodarowaniem w hodowli surowców odpadowych.

Literatura

- [1] Abouseoud M., Maachi R., Amrane A., Boudergua S., Nabi A.: Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 2008, **223**, 143-151.
- [2] Al-Araii L., Rahman R.N.Z.R.A., Basri M., Salleh A.B.: Microbial surfactants. *Asia Pac. J. Mol. Biol.*, 2007, **15** (3), 99-105.
- [3] Antczak T., Szczęsna-Antczak M., Patura J.: Wykorzystanie lipaz do otrzymywania estrów sacharydów, ich charakterystyka i zastosowanie. W: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*. Red. E. Kołakowski, W. Bednarski, S. Bielecki. Wyd. AR w Szczecinie, 2005, ss. 295-312.
- [4] Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S.: Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **53**, 495-508.
- [5] Bednarski W., Adamczak M., Tomasik J., Płaszczyk M.: Application of oil refinery waste in biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technol.*, 2004, **95**, 15-18.
- [6] Cameotra S.S., Makkar R.S.: Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **50**, 520-529.
- [7] Cao L., Fischer A., Bornscheuer U.T., Schmid R.D.: Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid ester. *Biocatal. Biotransfor.*, 1997, **14**, 269-283.
- [8] Cao L., Fischer A., Bornscheuer U.T., Schmid R.D.: Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid ester. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1999, **6**, 279-285.
- [9] Chrzanowski Ł., Dziadas M., Ławniczak Ł., Cyplik P., Białas W., Szulc A., Lisiecki P., Jeleń H.: Biodegradation of ramnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. *Bioresource Technol.*, 2012, **111**, 328-335.

- [10] Chrzanowski Ł., Ławniczak Ł., Czaczyk K.: Why do micro-organisms produce rhamnolipids? *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **28**, 401-419.
- [11] Chrzanowski Ł., Owsianiak M., Szulc A., Marecki R., Piotrowska-Cyplik A., Olejnik-Schmidt A.K., Staniewski J., Lisiecki P., Ciesielczyk F., Jesionowski T., Heipieper H.J.: Interaction between rhamnolipid biosurfactants and toxic chlorinated phenols enhance biodegradation of model hydrocarbon-rich effluent. *Internat. Biodeterior. Biodegrad.*, 2011, **65**, 605-611.
- [12] Das P., Mukherjee S., Sen R.: Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: An overview. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2008, **25**, 165-186.
- [13] Deleu M., Paquot M.: From renewable vegetables resources to micro-organisms: new trends in surfactants. *C.R. Chimie*, 2004, **7**, 641-646.
- [14] Desai J., Banat I.: Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1997, **61** (1), 47-64.
- [15] Dubey K., Juwarkar A.: Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **17**, 61-69.
- [16] Fiechter A.: Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Food Sci. Technol.*, 1992, **3**, 286-293.
- [17] Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A.: Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factor. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 1986, **24**, 443-448.
- [18] Gumienna M., Czarnecka M., Czarnecki Z.: Kondensat podezodoryzacyjny jako substrat tłuszczowy w biosyntezie związków powierzchniowo czynnych z wykorzystaniem drożdży *Candida bombicola*. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 2002, **1** (2), 71-82.
- [19] Gumienna M., Czarnecki Z.: Rola mikroorganizmów w syntezie związków powierzchniowo czynnych. *Nauka. Przyroda. Technologie*, 2010, **4**, 1-14.
- [20] Haba E., Espuny M., Busquets M., Manresa A.: Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, **88**, 379-387.
- [21] Holmberg K.: Natural surfactants. *Curr. Op. In Colloid & Interface Science*, 2001, **6**, 148-159.
- [22] Krasowska A.: Biomedyczna aktywność biosurfaktantów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, [online], 2010, **64**, 310-313.
- [23] Ławniczak Ł., Czaczyk K., Owsianiak M., Chrzanowski Ł.: Rola rhamnolipidów w środowisku naturalnym. *Post. Microbiol.*, 2011, **50**, 1, 17-30.
- [24] Makkar R.S., Cameotra S.S.: Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. *J. Surfactants Deterg.*, 1999, **2** (2), 237-241.
- [25] Makkar R.S., Cameotra S.S.: Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, **18**, 37-42.
- [26] Makkar R.S., Cameotra S.S.: An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **58**, 428-434.
- [27] Mazurkiewicz J.: Związki powierzchniowo czynne wytwarzane przez mikroorganizmy. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 1996, **3** (8), 60-70.
- [28] Mukherjee S., Das P., Sen R.: Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.*, 2006, **24** (11), 509-515.
- [29] Mulligan C.N.: Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.*, 2005, **133**, 183-198.
- [30] Mulligan C.N.: Recent advances in the environmental application of biosurfactants. *Curr. Opin. Colloid & Int. Sci.*, 2009, **14**, 372-378.
- [31] Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Ravi T.K., Sivachidambaram P.: Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Curr. Sci.*, 2008, **94**, 736-747.

- [32] Nagao A., Kito M.: Synthesis of O-Acyl-L-Homoserine by lipase. *J. Am. Oil Chemists' Society* 1989, **66**, 710-713.
- [33] Nitschke M., Costa S.G.V.A.O.: Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci Tech.*, 2007, **18**, 252-259.
- [34] Nitschke M., Pastore G.: Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technol.*, 2006, **97**, 336-341.
- [35] Ohno A., Ano T., Shoda M.: Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.*, 1995, **80** (5), 517-519.
- [36] Owsianiak M., Chrzanowski Ł., Szulc A., Staniewski J., Olszanowski A., Olejnik-Schmidt A., Heipieper H.J.: Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. *Bioresource Technol.*, 2009, **100**, 1497-1500.
- [37] Pacwa-Płociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S.: Environmental Application of Biosurfactants: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, **12**, 633-654.
- [38] Paraszkiwicz K., Długoński J.: Wykorzystanie drobnoustrojowych surfaktantów do usuwania metali ciężkich z gleby. *Biotechnologia*, 2007, **2** (77), 81-94.
- [39] Patil D., Leonardis A., Nag A.: Synthesis of biosurfactants from natural resources. *J. Food Biochem.*, 2011, **35**, 747-758.
- [40] Ron E.Z., Rosenberg E.: Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.*, 2001, **3**, 229-236.
- [41] Rosenberg E., Ron E.Z.: High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **52**, 154-162.
- [42] Saharan B.S., Sahu R.K., Sharma D.: A review of biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genet. Eng. Biotechnol. J.*, 2011, **7**, 1-38.
- [43] Sarney D.B., Vulfson E.N.: Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Focus*, 1995, **13**, 164-172.
- [44] Singh P., Cameotra S.S.: Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.*, 2004, **22** (3), 142-146.
- [45] Singh A., Hamme J.D., Ward O.P.: Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.*, 2007, **25**, 99-121.
- [46] Stuver O., Hommel R., Haferburg D., Kieber H.P.: Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. *J. Biotechnol.*, 1987, **6**, 259-269.
- [47] Sullivan E.R.: Molecular genetics of biosurfactant production. *Curr. Opin. Biotech.*, 1998, **9**, 263-269.
- [48] Sutthivanitchakul, B., Thaniyavorn J., Thaniyavorn S.: Biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* F2.2. *Thai J. Biotechnol.*, 1999, **1**, 46-53.
- [49] Šabeder S., Habulin M., Knez Z.: Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *J. Food Engin.*, 2006, **77**, 880-886.
- [50] Tarahomjoo S., Alemzadeh I.: Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme Microb Tech.*, 2003, **33**, 33-37.
- [51] Van-Hamme J.D., Singh A., Ward O.P.: Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, 2006, **24**: 604-620.
- [52] Ward O.P., Fang J., Li Z.: Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid. *Enzyme Microb. Tech.*, 1997, **20**, 52-56.
- [53] Wyrwas B., Chrzanowski Ł., Ławniczak Ł., Szulc A., Cyplik P., Białas W., Szymański A., Holderna-Odachowska A. Utilization of Tryton X-100 and polyethylene glycols during surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel. *J. Hazard. Mater.* 2011, **197**, 97-103.

- [54] Xu Q., Nakajima M., Liu Z., Shiina T.: Soybean-based surfactants and their applications. 2010, Chapter 20, 342-364 (online).
- [55] Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., Fredrickson, H.L.: Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermo-tolerant and halo-tolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl. Environ. Microbiol., 1995, **61**, 1706-1713.
- [56] Yan Y., Bornscheuer U.T., Cao L., Schmid R.D.: Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters: Removal of byproducts by azeotropic distillation. Enzyme Microb Tech., 1999, **25**, 725-728.
- [57] Yoo I.S., Park S.J., Yoon H.H.: Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters. J. Ind. Eng. Chem., 2007, **1 (13)**, 1-6.
- [58] Zhang I., Sun J., Hao Y., Zhu J., Chu J., Wei D., Shen Y.: Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. J. Ind. Microbial. Biotechnol., 2010, **37 (8)**, 857-862.

BIOTECHNOLOGICAL SYNTHESIS OF SURFACE ACTIVE COMPOUNDS AND EXAMPLES OF THEIR PRACTICAL APPLICATIONS

S u m m a r y

Surfactants, i.e. surface active agents, are an important group of chemical compounds that are studied and applied to industry and in chemical laboratories. Presently, a tendency is observed to produce surfactants from renewable and biodegradable sources. Bio-surfactants constitute such a group; they, compared to synthetic surfactants, show a lower toxicity and a higher environmental compatibility. Bio-surfactants can be produced either using a biotransformation method or a fermentation process with the use of bacteria, yeast, or fungi.

In this paper, the bio-surfactants are briefly described, the bio-technological methods of their synthesis are depicted, and, also, there are shown some selected trends in practical applications of surface active compounds.

Key words: bio-surfactants, surface active compounds, biosynthesis, micro-organisms, application of bio-surfactants ☒