

## ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ХІМІЧНОГО СКЛАДУ І БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Т.П. Пирог<sup>1,2</sup>, Л.В. Ключка<sup>1</sup>, Т.А. Шевчук<sup>2</sup>, Ф.В. Мучник<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій,  
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна  
e-mail: [tapirog@nuft.edu.ua](mailto:tapirog@nuft.edu.ua)

*Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) є продуктами мультифункціонального призначення, проте в різних умовах культивування продуцентів їх склад та властивості можуть змінюватися.*

*В огляді наведено дані літератури і власних експериментальних досліджень щодо залежності антимікробної активності ПАР мікробного походження від хімічного складу, а також щодо впливу умов культивування на властивості поверхнево-активних речовин. Аналіз даних літератури засвідчив, що антибактеріальна та антифунгальна активність ліпепептидів залежить від розміру та складу пептидної частини, конформації та довжини ацильного ланцюга, рамноліпідів – від співвідношення моно- і дирамноліпідів у складі комплексу, софороліпідів – від співвідношення лактонної та нелактонної форм цих ПАР. Згідно з даними літератури основними підходами до регуляції біологічних властивостей мікробних ПАР є їх постферментаційна хімічна модифікація, а також вдосконалення штамів-продуцентів методами метаболічної та генетичної інженерії. Результати власних досліджень засвідчують про те, що виявлення потенційних активаторів і/або інгібіторів ключових ферментів біосинтезу компонентів комплексу вторинних метаболітів, відповідальних за певні властивості, з наступною відповідною модифікацією складу поживного середовища дає змогу регулювати склад комплексу, а отже, й властивості цільового продукту.*

*Ключові слова: ліпепептиди, рамноліпіди, софороліпіди, антимікробна та антиадгезивна активність, умови культивування, хімічний склад.*

Нині поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження через ряд переваг (низька токсичність, біодеградабельність, стабільність у широкому діапазоні рН та температури) є конкурентно спроможними на ринку хімічних сполук [1–3]. Такі переваги, а також унікальні біологічні властивості (антимікробна та антиадгезивна активність, здатність до руйнування біоплівки) роблять їх потенційними для використання у харчовій, фармацевтичній промисловості, сільському господарстві та медицині [1–3].

Проте недоліком мікробних ПАР є можливість зміни їх властивостей залежно від умов культивування продуцента, оскільки вони є вторинними метаболітами і синтезуються у вигляді комплексу подібних сполук, про

що йшла мова у наших попередніх роботах [4–6]. У цих працях ми акцентували увагу на тому, що на теперішній час дослідження впливу умов культивування на властивості мікробних ПАР залишаються поза увагою дослідників. Разом з тим упродовж останніх 5–7 років у літературі стали з'являтися відомості про залежність біологічних властивостей мікробних ПАР від їх хімічного складу [7–13]. Так, дослідження синтезу комплексів ліпопептидних ПАР показало, що, модифікуючи хоча б один із компонентів структурного ланцюга, можна впливати на прояв біологічних властивостей [9–12]. Це явище було описане на прикладі ліпопептидних ПАР: зміна кількості амінокислот у складі ліпопептиду впливала на спектр дії щодо певних тест-культур. Проте у деяких роботах [11, 12] зазначається, що такі модифікації ліпопептидів можливі лише хімічним шляхом або одержанням генно-інженерних штамів. У сучасній літературі є тільки поодинокі повідомлення про залежність властивостей ПАР від умов культивування продуцента [13].

Мета даного огляду – узагальнення наявних у літературі відомостей про взаємозв'язок хімічного складу і біологічних властивостей мікробних поверхнево-активних речовин, а також використання цих даних для регуляції властивостей цільового продукту.

#### **Біологічні властивості ліпопептидів залежно від їх хімічного складу.**

Циклічні ліпопептиди складаються з олігопептиду, з'єданого амідним зв'язком з ацильним ланцюгом. Лінійна або розгалужена ліпідна частина ліпопептидів може відрізнятися за довжиною ацильного ланцюга (як правило, С<sub>6</sub>–С<sub>18</sub>) [14, 15]. Пептидна частина (містить до 25 амінокислот) утворює лактон або лактам з гідроксилом, фенолом або амінофункціональною групою, наявною або в бічних ланцюгах пептиду, або в частині ліпідного фрагмента, утворюючи таким чином макроцикли різного розміру (зазвичай 4–16 амінокислот) [15]. Оскільки циклічні ліпопептиди синтезуються нерибосомальними пептидними синтетазами [14], в пептидній частині можуть бути присутні як непротеїногенні (наприклад, D-конфігуровані або β-амінокислоти), так і модифіковані амінокислоти (наприклад, 4-хлор-треонін) [15].

Найбільш вивченими продуцентами циклічних ліпопептидів є бактерії роду *Bacillus*. Дані ліпопептиди поділяють на три родини: сурфактини, ітурини та фенгіцини, які відрізняються кількістю та послідовністю амінокислот у своєму складі та довжиною ацильного ланцюга [11, 16]. Така відмінність і визначає спектр їх біологічної дії. Так, ітурин та фенгіцин, що містять 14 або 16 атомів вуглецю у ліпідній частині, проявляють підвищену антифунгальну активність [11], у той час як сурфактин з коротшим ацильним ланцюгом характеризується ширшим спектром антибактеріальної дії [16].

**Розмір та склад пептидної складової.** У деяких роботах [8, 10] дослідники зазначають, що прояв антимікробної та антифунгальної дії ліпопептидів залежить від довжини та послідовності амінокислот пептидної частини. Так, під час дослідження антимікробних властивостей ліпопептидів бактерій роду *Bacillus* (*Bacillus* sp. P34, *Bacillus licheniformis* P40, *Bacillus* sp. P7, *Bacillus* sp. P11, *Bacillus subtilis* P45B) було встановлено, що лише ліпопептид, синтезований *Bacillus* sp. P7, який на 98 та 97% гомологічний

ітуруину та сурфактину відповідно, проявляв антифунгальні властивості [8]. Фракціонування ліпопептидного комплексу штаму *Bacillus* sp. P7 і вивчення біологічних властивостей його складових показало, що ітурин, який містить  $\beta$ -аміножирну кислоту і сім  $\alpha$ -амінокислот з D-тирозином як другою амінокислотою і двома додатковими D-амінокислотами в положеннях 3 і 6 у поліпептидному ланцюзі, проявляє лише антифунгальні властивості, у той час як сурфактин, який містить лише 4 амінокислоти, зв'язані з жирнокислотним ланцюгом, є ефективним антимікробним, протипухлинним та протівірусним агентом [8].

Kim із співавт. [7] показали, що ліпопептиди *B. subtilis* CMB32, які за молекулярною масою та послідовністю амінокислот у пептидному ланцюзі ідентифіковані як представники класу ітуруину А, фенгіцину та сурфактину А, проявляли однаково антифунгальну дію на фітопатогенний гриб *Colletotrichum gloeosporioides*, який уражує такі комерційно важливі рослини як манго та папайя.

**Довжина, конформація та склад ацильного ланцюга.** На відміну від поодиноких повідомлень про вплив пептидної складової на біологічні властивості ліпопептидів, у літературі є більше інформації про залежність антифунгальної та антибактеріальної активності цих ПАР від довжини [9, 11, 16, 17], складу та конформації [18, 19] ацильного ланцюга.

**Антифунгальна активність.** Встановлено, що сполуки з довшим ацильним ланцюгом (C16–C18) є гідрофобнішими (на відміну від ПАР з коротшим ланцюгом, які є гідрофільними), завдяки чому вони можуть легше проникати через клітинні стінки грибів та дріжджів [17–19]. Так, *B. subtilis* B38 синтезує комплекс сполук (A1, A2 та A3), що належать до класу ітуринів [17]. Фракція A3 містить 16 атомів вуглецю у складі жирної кислоти і проявляє антифунгальний ефект щодо *Candida albicans* sp. 311: мінімальна антифунгальна активність (МАА) становила 59,07 мкмоль/мл, у той час як показник МАА для фракції A3, що містить 14 атомів карбону у складі ацильного ланцюга, був у 8 разів вищим [17].

У роботі [18] повідомляється про синтез штамом *B. subtilis* 109GGC020 ліпопептиду, що містить три фракції (1–3), які складаються з гептапептидів і  $\beta$ -гідроксигирних кислот. У складі фракції 1 жирні кислоти представлені 3- $\beta$ -гідрокси-11-метилтридеканойлом, у фракції 2 – 3- $\beta$ -гідрокси-9-11-диметилтридеканойлом. У складі фракції 3 виявлено ненасичену жирну кислоту 7,9-диметил-2-деканойн. Кожна з фракцій була протестована як антифунгальний агент. Проте біологічні властивості були притаманні лише суміші певних фракцій. Так, суміш фракцій 1 та 2, які є однаковими за складом, але відрізняються положенням замісників у ацильному ланцюзі, у концентрації 4 мкг/мл спричиняла інгібування росту грибів *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum acutatum*. Найнижчу активність проявляла фракція 3, що може бути зумовлене наявністю у її складі ненасичених жирних кислот, які не можуть проникати через мембрани грибів. Окрім цього, фракції 1–3 та їх суміші були протестовані як цитотоксичні агенти проти шести ліній ракових клітин (молочної залози MDA-MB-231, товстої кишки: HCT15, передміхурової залози PC-3, легенів NCI-H23, шлунку NUGC-3, нирок ACHN) з використанням як контролю антибіотика сульфарадаміну В. Усі зразки виявили помірну цитотоксичність, фракції 1–3 показали майже однаковий результат ( $LD_{50}$  10,0–21 мкг/мл).

У разі використання суміші фракцій 1 та 2 LD<sub>50</sub> становила 4,6 мкг/мл для клітин раку легенів. Найнижчий цитотоксичний ефект проявляла фракція 3, що ще раз вказує на вплив будови ацильного ланцюга ліпопептиду на його біологічні властивості [18].

Встановлено, що усі ліпопептидні гомологи (AF3, AF4 та AF5), синтезовані *B. subtilis* RLID 12.1, які відрізнялись між собою як довжиною ацильного ланцюга, так і конформацією жирних кислот у його складі (C17, ізо-C17 та ізо-C18 відповідно), проявляли антифугальну активність, але найактивнішим виявився гомолог AF4, що містив залишок кислоти ізо-C17, на відміну від AF3 (залишок кислоти – C17), та AF5 (залишок кислоти – ізо-C18) [19].

Цікавим є дослідження Asari із співавт. [20], які встановили, що *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 синтезує суміш лінійних фенгіцинів, коли зазвичай ці ліпопептиди зустрічаються виключно у циклічній формі [4, 18].

Лінійні фенгіцини були розділені на 14 фракцій, які проявили антагоністичні властивості щодо *Alternaria brassicicola*, *Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* та *Verticillium longisporum*, однак фракція 9 характеризувалася найвищою антифунгальною активністю. Аналіз хімічної будови дав змогу віднести фракцію 9 до родини C15-фенгіцину. Автори припускають, що всі інші фракції містять коротший ацильний ланцюг, тому є менш активними за фракцію 9.

Однак такі закономірності (ліпопептиди з довшим ацильним та більш розгалуженим ланцюгом проявляють вищу антифунгальну активність, ніж коротколанцюгові сполуки) не були встановлені для нових ліпопептидів орфамідного типу [21]. Орфаміди, які складаються з 10 амінокислот і містять ацильну частину у вигляді 3-гідроксидодеканової або тетрадеканової кислоти, синтезуються представниками роду *Pseudomonas*. Ма із співавт. [21] встановили, що *Pseudomonas* sp. CMR5C синтезує орфаміди В та G, які характеризуються однаковою амінокислотною послідовністю, але відрізняються довжиною ацильного ланцюга: C14 для орфаміду В та C16 для орфаміду G. Проте незалежно від довжини ацильного ланцюга жоден з орфамідів не проявляв антифунгальної активності щодо *Magnaporthe oryzae* VT5M1, однак за концентрації 50 мкмоль/мл не спостерігали розвитку апресорію *M. oryzae* VT5M1.

Зазначимо, що утворення комплексу сполук ліпопептидної природи ускладнює їх очищення та розділення. Інколи неможливо встановити точний склад як пептидної, так і жирнокислотної частини ліпопептидів [22]. Так, штам *B. subtilis* XF-1 продукує 8 гомологів фенгіцину, 7 дегідроксифенгіцину та 6 фенгіциноподібних циклопептидів. Детальне дослідження складу циклопептидного комплексу показало наявність фенгіцину типів А, В, С, D, і S. Конструктивно ці молекули є ліподекапептидами з β-жирним бічним ланцюгом, який відрізняється наявністю ненасичених або насичених жирних кислот. Авторам не вдалося розділити комплекс на індивідуальні біологічно активні ліпопептиди. У зв'язку з цим циклопептиди використовуються як комплексні антифунгальні сполуки, здатні інгібувати ріст *Plasmodiophora brassicae*. Так, після 24 год обробки розчином циклопептиду концентрацією 250 мкг/мл виживання клітин *P. brassicae* становило всього 14%. Механізм дії циклопептидів полягає у взаємодії зі

стерином та фосфоліпідами мембран, що супроводжується порушенням їх функціонування [22].

**Антибактеріальна активність.** Встановлено, що ліпопептид, синтезований *Streptomyces amritsarensis* sp. МТСС 11845<sup>T</sup>, який складається з шести амінокислот та С12 ацильного ланцюга, у концентрації 10 мкг/мл проявляв антибактеріальну активність щодо грампозитивних бактерій: зона затримки росту *B. subtilis* МТСС 619, *Staphylococcus epidermidis* МТСС 435 та *Mycobacterium smegmatis* МТСС 6 становила 21, 17 та 15 мм відповідно [9]. У той же час антимікробна активність проти грамнегативних бактерій та грибів була відсутня, що може бути зумовлене коротким (С12) ацильним ланцюгом ліпопептиду.

Із забруднених зразків ґрунту [11] виділено штами *Citrobacter* sp. S-3, S-6 та S-7, *Enterobacter* sp. S-4, S-5, S-9, S-10, S-11 та S-12. Усі штами здатні до синтезу суміші певних фракцій ліпопептидів, які проявляли антимікробну активність щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій. Дослідники встановили, що штами S-3 та S-11 синтезують фракції Fr-c та Fr-e, у складі яких наявні β-гідроксигирні кислоти з довжиною ланцюга С14 та С17 відповідно, що дає змогу віднести їх до родин фенгіцину та ітурину. Проте антимікробний ефект проявляла лише очищена ліпопептидна фракція Fr-c з коротшим ацильним ланцюгом: мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) щодо грампозитивних тест-культур *Micrococcus luteus* МТСС 106, *Staphylococcus aureus* МТСС 1430 та *Staphylococcus epidermidis* МТСС 435 становили 12, 15 і 16 мкг/мл відповідно, а грамнегативних *Serratia marcescens* та *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 27853 – 20 та 32 мкг/мл відповідно. Варто зазначити, що жоден з ліпопептидів не проявляв антифунгальної активності щодо *C. albicans* МТСС 1637.

У 2017 р. з'явилася інформація про штам *Paenibacillus* sp. OSY-N, який синтезує суміш ліпопептиду ВМУ-28160, перметину А, нового циклічного ліпопептиду та його лінійних аналогів (паєніпептин А, В та С) [23]. Нижче наведено склад кожного з ліпопептидів:

### Ліпопептиди *Paenibacillus* sp. OSY-N

Ліпопептид	Склад
ВМУ-28160	дев'ять амінокислот у пептидній частині та С7-ацильний ланцюг
паєніпептини А	дев'ять амінокислот у пептидній частині (замість валіну наявний лейцин) та С7-ацильний ланцюг
паєніпептин А	дев'ять амінокислот у пептидній частині (замість валіну наявний лейцин) та С7-ацильний ланцюг
паєніпептин С	дев'ять амінокислот у пептидній частині (замість валіну наявний ізолейцин) та С8-ацильний ланцюг
паєніпептин В	лінійний аналог перметину А

Відмінності у складі цих сполук визначають їх різні біологічні властивості. Так, найвищу антимікробну активність проявляв паєніпептин С (містить С8-ацильний ланцюг та ізоамінокислоту у своєму складі): МІК щодо грампозитивних (*Bacillus cereus* АТСС 11778, *Listeria innocua* АТСС 33090, *Staphylococcus aureus* АТСС 25923, *S. aureus* АТСС 6538) та грамнегативних (*Escherichia coli* К-12, *E. coli* АТСС 25922, *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium* LT2) становили 2–4 та 0,5–2 мкг/мл відповідно. Таку активність паєніпептину С, на відміну від інших ліпопептидів, автори

пов'язують з більшою довжиною ацильного ланцюга, наявністю відмінних амінокислот та їх конформацією. Це дає змогу зробити висновок, що антибактеріальна активність ліпопептидів (так само як і антифунгальна) залежить від довжини ацильного ланцюга, складу та конформації амінокислот пептидної частини.

Узагальнені дані щодо антимікробної активності ліпопептидів залежно від довжини та складу ацильного ланцюга наведено у табл. 1. Ці дані засвідчують, що зазвичай вища антифунгальна активність притаманна ліпопептидам з довшим (C16–C18) ацильним ланцюгом, а ліпопептиди з меншою кількістю атомів карбону (C7–C14) у складі жирнокислотного залишку характеризуються антибактеріальною активністю. Крім того, антимікробна активність ліпопептидів залежить від складу і конфігурації ацильного ланцюга, наявності у ньому певних замісників. Разом з тим прояв антимікробної активності пєніпептину А і С залежав також і від складу пептидної частини. Проте, оскільки ці ліпопептиди відрізняються один від одного також і довжиною ацильного ланцюга, не можна зробити однозначний висновок про залежність властивостей ПАР або тільки від складу пептидної частини, або тільки від довжини жирнокислотного залишку.

Зазначимо, що на теперішній час у літературі є недостатньо інформації, аналіз якої дав би можливість зробити більш чіткі і конкретні висновки про вплив хімічного складу ліпопептидів на їх антимікробну активність. Інформація, викладена у роботах [7–11, 16–20, 23], свідчить про те, що біологічні властивості ліпопептидних ПАР залежать від складу як пептидної, так і ліпідної частини.

#### **Вплив умов культивування на біологічні властивості ліпопептидів.**

У більшості робіт, присвячених дослідженню складу та біологічних властивостей ліпопептидів, автори не акцентують увагу на умовах культивування продуцента. Наявні лише поодинокі роботи, в яких наведено подібну інформацію.

**Природа джерела вуглецю та азоту.** Vaindara із співавторами [24] встановили, що *B. subtilis* SK.DU4 синтезує комплекс бактеріоциноподібного пептиду і ітуриноподібного ліпопептиду з 15 атомами карбону в ацильному ланцюзі, причому склад комплексу і його біологічні властивості залишалися незмінними незалежно від природи джерела азоту (пептон, дріжджовий екстракт, м'ясний екстракт) та вуглецю (глюкоза, лактоза) у середовищі культивування. Дослідники показали, що бактеріоциноподібний пептид спричиняв антимікробну дію на *Micrococcus luteus* MTCC 106 і *Listeria monocytogenes* MTCC 839 (зона затримки росту 12 і 14 мм відповідно). За наявності лише ітуриноподібного ліпопептиду зона затримки росту обох тест-культур становила 11 мм. За використання суміші бацитрацину та ліпопептиду спостерігали збільшення зони затримки росту *M. luteus* MTCC 106 та *L. monocytogenes* MTCC 839 до 15 та 17 мм відповідно [24].

У 2014 р. з'явилася інформація про залежність антифунгальних властивостей ліпопептидів від природи джерела вуглецю у середовищі культивування штаму *Bacillus* sp. AR2 [13] (табл. 2). Встановлено, що штам AR2 синтезує суміш гомологів ітуруину, фєнгіцину та сурфактину, причому за умов росту на середовищі з сахарозою, глицерином, сорбітом та маль-

Таблиця 1

## Вплив довжини та складу ацильного ланцюга ліпопептидів на їх антимікробну активність

Продуцент ліпопептидів	Тест-культура	Ліпопептид	Ефективна концентрація	Література
<i>Bacillus subtilis</i> В38	<i>Candida albicans</i> sp. 311	Фракція А3 (С16 жирні кислоти)	59,07 мкмоль/л	[17]
		Фракція А2 (С15 жирні кислоти)	239,4 мкмоль/л	
		Фракція А1 (С14 жирні кислоти)	970,8 мкмоль/л	
<i>Bacillus subtilis</i> 109GGC020	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i>	Фракція 1 (3- $\beta$ -гідрокси-11-метилтридеканойл)	4 мкг/мл	[18]
		Фракція 2 (3- $\beta$ -гідрокси-9-11-диметилтридеканойл)		
<i>Bacillus subtilis</i> RLJD 12.1	<i>Candida albicans</i> SC5314	Фракція 3 (7,9-диметил-2-деканойл)	16-32 мкг/мл	[19]
		Фракція АF3 (С17 жирні кислоти)	8 мкг/мл	
		Фракція АF4 (ізо-С17 жирні кислоти)	2 мкг/мл	
<i>Raenibacillus</i> sp. OSY-N	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Фракція АF5 (ізо-С18 жирні кислоти)	4 мкг/мл	[23]
		(девіять амінокислот та С7 жирні кислоти) пептидини С (девіять амінокислот (замість валіну на вільній ізолеїцин) та С8 жирні кислоти)	32 мкг/мл 4 мкг/мл	

**Вплив природи джерела вуглецю у середовищі культивування  
*Bacillus* sp. AR2 на антифунгальну активність ПАР**

Джерело вуглецю	Зона затримки росту тест-культур, мм						
	<i>Fusarium solani</i> ATCC 36031	<i>Fusarium oxysporum</i> MTCC 7229	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC 16022	<i>Trichophyton rubrum</i> MTCC 296	<i>Microsporium gypseum</i> MTCC 4522	<i>Alternaria alternata</i> MTCC 2724	<i>Alternaria citri</i> MTCC 4875
Сахароза	38,0	40,0	34,0	34,0	42,0	36,0	36,0
Декстроза	37,0	36,0	32,0	30,0	40,0	34,0	37,0
Гліцерин	32,0	27,0	20,0	23,0	34,0	24,0	25,0
Мальтоза	26,0	25,0	19,0	20,0	35,0	24,0	23,0
Лактоза	30,0	29,0	22,0	24,0	36,0	25,0	23,0
Сорбіт	18,0	18,0	8,0	9,0	25,0	15,0	13,0

тозою однаковою домінуючою фракцією синтезованого ліпопептидного комплексу був С15 сурфактин. Проте найактивнішими антифунгальними агентами виявилися ліпопептиди, синтезовані на сахарозі (табл. 2). У разі використання лактози та декстрози як джерела вуглецю синтезувалися ліпопептиди, у складі яких домінуючою фракцією був С14 ітурин. Антифунгальна активність таких ПАР була невисокою: значення мінімальної інгібуючої концентрації перебували у межах 250–2000 мкг/мл, у той час як МІК ліпопептидів, синтезованих на середовищі з сахарозою та гліцерином, були нижчими (125–750 мкг/мл).

У 2018 р. з'явилося ще одне повідомлення про залежність антимікробної активності ліпопептидів від природи джерела вуглецю у середовищі культивування продуцента [25]. Встановлено, що сурфактин, синтезований *B. subtilis* НН2 на суміші глюкози (0,33 %) і целюлози (0,67 %) характеризувався найвищою антимікробною активністю (зони затримки росту *E. coli* ССТСС АВ 212358 і *S. aureus* ССТСС АВ 91053 становили 16 і 14 мм відповідно за концентрації сурфактину 0,4 мг/мл). Ліпопептиду, одержаному на середовищі з 1 % глюкози, була притаманна невисока антимікробна дія.

Наведені дані засвідчують необхідність проведення досліджень впливу умов культивування продуцентів на біологічні властивості синтезованих поверхнево-активних речовин.

**Умови культивування, хімічний склад і біологічні властивості гліколіпідів.** Гліколіпіди – один з найважливіших класів промислово важливих мікробних поверхнево-активних речовин [26].

Ще у 1999 р. дослідники встановили, що в різних умовах культивування *Tsukamurella* spec. DSM 44370 синтезує комплекс гліколіпідів, що відрізняються за будовою і біологічними функціями [27]. Так, на середовищі з соняшниковою олією утворюється комплекс трегалозоліпиду (GL1),



трисахаридного ліпиду (GL2), тетрасахаридного ліпиду (GL3). У складі гліколіпідів GL2 і GL3 виявлений короткий жирнокислотний ланцюг (6–8 атомів карбону), у складі GL1 – довший ланцюг, що містить олеїнову та гексадеканоїлову кислоти. Додаткове внесення у середовище з соняшниковою олією глюкози супроводжувалося синтезом трегалозо-білка та тетрасахаридного ліпиду, у той час як у разі використання замість глюкози галактози, сахарози і трегалози не спостерігали синтезу жодного з компонентів комплексу. Під час культивування штаму *Tsukamurella* sp. DSM 44370 в умовах лімітування фосфором (0,35 ммоль/л) синтезувався гліколіпідний комплекс, у складі якого основним компонентом (59%) був трегалозоліпід (GL1), вміст GL2 становив 27%, GL3 – 14%. За умов росту на базовому середовищі (без лімітування фосфором) домінуючим компонентом комплексу був GL3 (55%) [20]. Трегалозоліпіди були протестовані як антимікробні агенти. Встановлено, що GL3 виявився ефективним щодо *E. coli*, *Bacillus megaterium* (МІК 150 мг/мл), GL2 спричиняв частковий вплив на клітини тест-культур, а GL1 взагалі не проявляв антимікробного ефекту. Щодо антифунгальної активності, то GL1 і GL2 були ефективнішими щодо *Ustilago violacea*, ніж GL3. Крім того, GL2 у концентрації 20 мг/мл спричиняв антимікробну дію на *Vibrio fischeri* [27].

**Рамноліпіди.** Рамноліпіди або рамнозовмісні гліколіпіди здебільшого синтезуються у вигляді гомологічних сполук та відрізняються кількістю залишків рамнози, зв'язаної з ліпідними фрагментами (1,3-гідроксидеканоїл-1,3-гідроксидеканоатом). Залежно від кількості молекул вуглеводів і жирних кислот зазвичай розрізняють монорамно-моноліпіди, монорамноділіпіди, дирамномоноліпіди та дирамноділіпіди [28–31].

Рамноліпіди, як правило, утворюються патогенними видами роду *Pseudomonas*, проте до їх синтезу здатні й інші мікроорганізми: *Burkholderia* sp., *Mycococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudoxanthomonas* sp., *Acinetobacter* sp. та деякі штами *Streptomyces* [32, 33]. Синтез рамноліпідів непатогенними штамми є перспективним з точки зору організації їх промислового виробництва, і в деяких дослідженнях повідомляється про біосинтез цих ПАР з використанням штамів *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* та *Burkholderia thailandensis* [34, 35].

*Вплив умов культивування на хімічний склад рамноліпідів.* Склад і співвідношення рамноліпідних фракцій варіюють залежно від штамів бактерій, умов культивування та складу середовища. Навіть для одного і того самого штаму-продуцента зміна складу поживного середовища може супроводжуватися зміною співвідношення різних форм рамноліпідів у комплексі синтезованих ПАР [36].

Gudiña із співавт. [37] встановили, що залежно від природи джерела вуглецю у середовищі культивування *Pseudomonas aeruginosa* №112 змінюється співвідношення моно- і дирамноліпідів. Так, на нетрадиційному середовищі, що містить кукурудзяний відвар (10%, об'ємна частка) та мелясу (10%), утворювалася суміш з восьми різних рамноліпідних гомологів, в якій основним компонентом був монорамноліпід (Rha-C10-C10). За умов росту на середовищі LB (lysogeny broth) (джерело вуглецю –

триптон) штам №112 синтезував 9 різних гомологів, причому домінуючим компонентом був дирамноліпід (Rha-Rha-C10-C10).

Аналіз складу рамноліпідів, синтезованих *P. aeruginosa* ST5 (NCIMB 30352) на глюкозі, гліцерині, олеїновій кислоті та гексадекані (2%) показав, що на всіх субстратах у складі комплексу ПАР основними компонентами були дирамноліпіди (Rha-Rha-C10-C10) та монорамноліпіди (Rha-C10-C10), проте вміст кожної з фракцій був різним [38]. Разом з тим незалежно від природи джерела вуглецю (гідрофільні чи гідрофобні субстрати) ацильний ланцюг рамноліпідів містив 10 атомів карбону, що узгоджується з дослідженнями 2008 р. [39], в яких встановлено, що C10-інтермедіати з циклу жирних кислот є попередниками біосинтезу рамноліпідів у *P. aeruginosa*.

Ndlovu із співавт. [40] показали, що за умов росту *P. aeruginosa* ST5 на гідрофільних (фруктоза, гліцерин, сахароза, глюкоза) та гідрофобних (дизель, соняшникова олія, гас) субстратах у складі комплексу ПАР були виявлені різні форми рамноліпідів (дирамноліпіди: Rha-Rha-C8-C10/Rha-Rha-C10-C8 (dRL1), Rha-Rha-C10-C10 (dRL2) та Rha-Rha-C12-C10/Rha-Rha-C10-C12 (dRL3) і монорамноліпіди: Rha-C8-C10/Rha-C10-C8 (mRL1), Rha-C10-C10 (mRL2) та Rha-C12-C10/Rha-C10-C12 (mRL3)), проте у різному співвідношенні.

Вплив хімічного складу на біологічні властивості рамноліпідів. Біологічні властивості рамноліпідів (антимікробна та антиадгезивна активність, здатність до руйнування біоплівки) залежать від співвідношення в їх складі моно- та дирамноліпідів [29, 37, 41–43].

Дослідження антимікробної дії моно- та дирамноліпідів, синтезованих *Burkholderia thailandensis* E264 (ATCC 700388) на гліцерині, показало, що дирамноліпідам притаманна вища антимікробна активність, ніж монорамноліпідам [41] (табл. 3). У той же час найвищою антимікробною активністю характеризувався супернатант, що містив суміш неочищених рамноліпідів, що може бути зумовлено синергічною дією фракцій, або наявністю інших, відмінних від рамноліпідів, антимікробних сполук.

**Таблиця 3**

**Мінімальні інгібуючі концентрації рамноліпідів  
*Burkholderia thailandensis* E264 [41]**

Фракція	МІК (мг/мл) щодо			
	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
Монорамноліпіди	1,25	1,25	2,50	–
Дирамноліпіди	0,15	1,25	0,3	–
Супернатант	0,15	0,15	0,15	0,3

Примітка. «–» – пригнічення росту не спостерігали.

Штам *P. aeruginosa* AT10 на середовищі з відходами переробки соєвих бобів синтезує комплекс, що містить 7 гомологічних сполук [28]. Фракціонування комплексу і дослідження антимікробної активності окремих компонентів показало, що лише суміш двох з них (монорамноліпиду

L-рамнозил-1,3-гідроксидеканоїл-1,3-гідроксидеканоату та дирамноліпиду L-рамнол-рамнозил-1,3-гідроксидеканоїл-1,3-гідроксидеканоату) спричиняє антимікробну дію на бактерії та гриби, проте не на дріжджі. Так, значення МІК щодо *E. coli* та *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 становили 32 мкг/мл, для *Serratia marcescens* СЕСТ 274 – 16 мкг/мл. Мінімальні інгібуючі концентрації щодо інших бактерій (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 11228, *Arthrobacter oxidans* ATCC 8010, *Mycobacterium phlei* ATCC 41423) перебували у межах 8–16 мкг/мл, щодо грибів *Aspergillus niger* ATCC 14604 і *Gliocladium virens* ATCC 4645 – 16 мкг/мл, *Botrytis cinerea* і *Rhizoctonia solani* – 18 мкг/мл.

Встановлено, що саме дирамноліпиди, синтезовані *P. aeruginosa* № 112, виявляли антифунгальну активність щодо *Aspergillus niger* MUM 92.13 та *Aspergillus carbonarius* MUM 05.18, тоді як монорамноліпиди демонстрували слабку інгібуючу дію на гриби [42].

Крім того, автори показали, що додавання NaCl до очищених моно- та дирамноліпідів підвищувало їх антифунгальну дію. Так, суміш дирамноліпідів з концентрацією 0,375 г/л та 875 мМ NaCl повністю інгібувала ріст тест-культур *A. niger* MUM 92.13, у той час як сам розчин дирамноліпідів – лише на 40%. Крім того, додавання такої ж концентрації солі до розчину монорамноліпідів супроводжувалося інгібуванням росту тест-культури всього на 40%, при цьому розчин монорамноліпідів (без солі) зовсім не пригнічував ріст грибів. Ефект від додавання солі автори пояснюють тим, що NaCl відновлює структуру рамноліпідів, пошкоджену під час їх екстракції з культуральної рідини.

Янек із співавт. [30] показали, що суміш моно- і дирамноліпідів, а також фосфатидилетаноламін, виділені з комплексу, синтезованого *Pseudomonas putida* BD2, проявляють антиадгезивну активність. Суміш рамноліпідів у концентрації 0,5 мг/мл знижувала адгезію на полістиролі клітин *S. epidermitis* та *E. coli* в середньому на 43–79, дріжджів *Candida albicans* – 89–90%. Така ж концентрація фосфатидилетаноламіну знижувала адгезію бактеріальних та дріжджових тест-культур на 23–72 та 96–98% відповідно. Оскільки дослідники не розділяли суміш рамноліпідів на фракції, тому залишається невідомим, якій з них притаманна вища антиадгезивна активність.

Дирамноліпиди є не лише ефективними антимікробними агентами, а й можуть бути використані для руйнування бактеріальних біоплівки [43]. Так, новий штам *Lysinibacillus* sp. BV152.1 синтезує суміш дирамноліпідів (Rha)-Rha-C10-C10, Rha-Rha-C8-C10 і Rha-Rha-C10-C12 у співвідношенні 7:2:1, що здатні руйнувати біоплівки *P. aeruginosa* PAO1, *S. aureus* та *S. marcescens* у значно нижчих (5–10 мкг/мл) концентраціях, ніж комерційні дирамоноліпиди (50–75 мкг/мл).

Крім антимікробної та антиадгезивної, рамноліпідам притаманна й цитотоксична дія [29]. Так, у 2013 р. Christova із співавт. виявили у складі комплексу рамноліпідів *P. aeruginosa* BN 10 компоненти, які спричиняли цитотоксичний ефект на клітинні лінії раку крові HL-60, BV-173, SKW-3, JMSU-1. Ці складові комплексу були ідентифіковані як монорамноліпід L-рамнопіранозил-1-3-гідроксидеканоїл-1-3-деканоат та дирамноліпід рамнозил-рамноніл-3-гідроксидеканоїл-3-гідроксидеканоат. Подальші

експерименти показали, що монорамноліпід у невеликих концентраціях (25–50 мкМ) проявляв сильнішу дію (порівняно з дирамноліпідом) на ракові клітини (пригнічення росту понад 50% клітин), а також інгібував проліферацію клітин BV-173 (лейкемії крові людини) та індукував природний механізм їх апоптозу [29].

Отже, дирамноліпіди проявляють високу антимікробну активність та здатність до руйнування бактеріальних біоплівки, а монорамноліпіди є ефективними цитотоксичними агентами.

**Софороліпіди.** Основними продуцентами софороліпідів є дріжджі роду *Candida* (*Starmerella*), *Rhodotorula*, *Wickerhamomyces* [44]. Софороліпіди складаються із гідрофобної частини, представлені жирною кислотою, та гідрофільної, що складається з дисахариду софорози, з'єданого за  $\beta$ -1,2 зв'язком, причому софороза може бути ацетильованою у положенні 6' та/або 6". Карбоксильна група жирних кислот може залишатися вільною, утворюючи кислотну (нелактонну) структуру, або бути етерифікованою у положенні 4", формуючи лактонну форму [44].

Ще у 2005 р. [45] було встановлено, що фізико-хімічні властивості софороліпідів залежать від співвідношення у складі комплексу лактонної та нелактонної форм цих ПАР, а постферментаційна модифікація можлива лише для софороліпідів з вільним ацильним ланцюгом (нелактонна форма).

Пізніші дослідження показали, що співвідношення лактонної та нелактонної форм софороліпідів, а також ступінь ацилювання і довжина ацильного ланцюга залежать від природи джерела вуглецю у середовищі культивування [46–50].

Показано, що під час культивування *C. bombicola* ATCC 22214 на лауриловому спирті синтезувалися лактонні софороліпіди, які на відмінну від ПАР, отриманих на глюкозі, за концентрації 0,5–10 мг/мл повністю інгібували ріст грамнегативних (*E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027) та грампозитивних (*S. aureus* ATCC 6358, *B. subtilis* ATCC 6633) бактерій, а також дріжджів *C. albicans* ATCC 2091 [47]. Дані результати свідчать, що гідрофобні субстрати є придатнішими для утворення софороліпідів з високою антимікробною активністю.

Zhang із співавт. [48] встановили, що незалежно від наявності у суміші з глюкозою пальмітинової, стеаринової чи олеїнової кислот синтезовані *C. bombicola* софороліпіди практично не відрізнялися між собою за антимікробною щодо *Salmonella* spp. і *Listeria* spp. активністю.

Софороліпіди, синтезовані *C. bombicola* ATCC 22214 на кокосовій олії, проявляли вищу антимікробну активність щодо *E. coli* та *S. aureus*, ніж одержані на кукурудзяній олії [49]. Цілком ймовірно, що різна антимікробна активність софороліпідів зумовлена різною довжиною ацильного ланцюга, проте автори не акцентували на цьому увагу.

Solaiman із співавт. [50] виявили, що за умов росту *S. bombicola* ATCC 22214 на середовищі з глюкозою (10 г/л) з додаванням як косубстрату (2 г/л) пальмітинової, стеаринової та олеїнової кислот синтезуються софороліпіди (відповідно названі SL-p, SL-s, SL-o) з різною антимікробною активністю. МИК SL-p і SL-o щодо грампозитивних (*B. licheniformis*, *B. pumilus*, *Bacillus mycoides* *Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*,

*Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus cohnii*) та грамнегативних (*Pseudomonas luteola*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii* і *Vibrio fluvialis*) бактерій виявилися однаковими (19,5 мкг/мл), а МІК SL-s були нижчими і становили 4,88–9,76 мкг/мл.

Отже, на відміну від рамноліпідів, біологічні властивості яких практично недосліджені залежно від умов культивування продуцентів, для софороліпідів є відповідні (хоча і небагаточисельні) повідомлення про залежність їх антимікробної активності від складу поживного середовища.

**Регуляція біологічних властивостей поверхнево-активних речовин.** Сучасні дані літератури засвідчують, що досягти біосинтезу мікробних ПАР певного складу з наперед заданими властивостями можна лише в результаті постферментаційної хімічної їх модифікації або вдосконаленням штамів-продуцентів методами генетичної або метаболічної інженерії. У зв'язку з цим багато які дослідження останніх років фокусуються саме на таких методах регуляції біологічних властивостей мікробних ПАР.

**Хімічна модифікація.** Руйнування біоплівки за наявності трьох дирамноліпідів, синтезованих *Lysinibacillus* sp. BV152.1, а також їх напівсинтетичних амідних похідних: бензил (Bn), піперидин (Pip) і морфолін (Mor) показало, що хімічна модифікація дирамноліпідів супроводжувалася підвищенням ступеня деструкції біоплівки *P. aeruginosa* PAO1, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. marcescens* ATCC 27117, *P. aeruginosa* DM50 порівняно з нативними ПАР [43]. Найвищий ступінь руйнування (> 90%) досягався за дії ди-Rha-Bn і ди-Rha-Pip на біоплівку *S. aureus* ATCC 25923. Усі три похідні рамноліпідів руйнували більш, ніж на 80 % біоплівку *S. marcescens* ATCC 27117.

Sleiman із співавт. [51] показали, що етилові ефіри моно- та діацетат-похідних софороліпідів є ефективнішими антибактеріальними агентами, ніж нативні софороліпіди у лактонній формі.

Ribeiro із співавт. [52] розробили спосіб виділення з суміші лактонної і нелактонної форм софороліпідів на основі полімерних сорбентів Amberlite XAD16NTM, XAD18TM та XAD1600NTM і показали, що лактонним софороліпідам притаманна вища сперміцидна та протиракова активність.

**Генетична та метаболічна інженерія.** Методи генетичної та метаболічної інженерії використовуються дослідниками для одержання потенційних промислових штамів рамноліпідів [53–55]. Необхідність проведення таких досліджень зумовлена насамперед тим, що основні продуценти рамноліпідів є штамми патогенних бактерій *P. aeruginosa*. У процесі створення генно-інженерних штамів непатогенних представників роду *Pseudomonas* (*P. putida*) і *Burkholderia* було встановлено, що співвідношення моно- і дирамноліпідів у складі синтезованих ПАР можна модифікувати зміненням рівня експресії генів *rhlB* і *rhlC* [53], причому гени *rhlA* і *rhlB* незалежно беруть участь у синтезі рамноліпідів [55], а не у вигляді гетеродимерного комплексу *rhlAB*, як передбачалося раніше.

Tiso із співавт. [54] за допомогою метаболічної інженерії створили штамми *P. putida*, які синтезували різні за складом суміші монорамноліпідів, моно- і дирамноліпідів, а також продуценти тільки β-гідроксижирних кислот і гідроксиалканоїлалканоатів. На жаль, у цій роботі не визначали біологічні властивості цих поверхнево-активних речовин.

Властивості рамноліпідів визначаються не тільки співвідношенням моно- і дирамноліпідів [43, 53], а також і довжиною їх ацильного ланцюга [56]. Штами *P. aeruginosa* синтезують переважно коротколанцюгові рамноліпіди (Rha-Rha-C10-C10), у той час як представники роду *Burkholderia* – довголанцюгові (Rha-Rha-C14-C14). На основі *Burkholderia glumae* було одержано генно-інженерний штам *P. putida* KT2440, здатний до синтезу довголанцюгових рамноліпідів [56].

Roelants із співат. [57] виявили фермент, відповідальний за лактонізацію софороліпідів. Відкриття гену *sble*, що кодує цю лактонестеразу, дало змогу одержати штам *S. bombicola*, здатні до синтезу або лактонної, або нелактонної форм цих гліколіпідів.

В іншій роботі [12] досліджували біологічні властивості аміноліпідів *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. Встановлено, що тільки дві фракції комплексу з шести (бацитрацин Д і фенгіцин) спричиняли антифунгальну дію на *Fusarium oxysporum*. Дослідники отримали генно-інженерні штам *SQR9M1* і *SQR9M2*, які синтезували тільки фенгіцин і бацитрацин. Ці результати засвідчують можливість регуляції властивостей мікробних аміноліпідів з використанням генно-інженерних штамів, які синтезують тільки певні складові комплексу ПАР.

**Фізіологічні основи регуляції біологічних властивостей ПАР.** Нами показано, що виявлення потенційних активаторів і/або інгібіторів ключових ферментів біосинтезу компонентів комплексу мікробних ПАР, відповідальних за певні властивості, з наступною відповідною модифікацією складу поживного середовища дає змогу регулювати склад комплексу, а отже й властивості цільового продукту [4–6]. Так, у *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 і *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 ключовим ферментом біосинтезу аміноліпідів, відповідальних за антимікробну активність ПАР, є НАДФ<sup>+</sup>-залежна глутаматдегідрогеназа, активаторами якої у штаму IMB B-7241 є катіони кальцію, магнію і цинку, у IMB Ac-5017 – кальцію, у IMB B-7405 – кальцію, натрію і калію. Додаткове внесення або підвищення вмісту активаторів ферменту в середовищі культивування досліджуваних штамів супроводжувалося підвищенням НАДФ<sup>+</sup>-залежної глутаматдегідрогеназної активності в 1,5–3 рази в порівнянні з такою на базовому середовищі.

Встановлено, що додаткове внесення CaCl<sub>2</sub> (0,1 г/л) у середовище культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017, підвищення концентрації цієї солі до 0,4 г/л в середовищі для вирощування *N. vaccinii* IMB B-7405, а також додавання CaCl<sub>2</sub> (0,1 г/л), збільшення вмісту MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O до 0,2 г/л або внесення Zn<sup>2+</sup> (38 мкМ) в середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 супроводжувалося синтезом ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо тест-культури були в 1,2–13 разів нижчими, їх адгезія на абіотичних поверхнях, оброблених такими ПАР, – в середньому на 10–40% нижчою, а ступінь руйнування біоплівки – на 7–20% вищим порівняно з показниками, встановленими для ПАР, отриманих на базовому середовищі.

Отже, аналіз даних літератури показав, що біологічні властивості мікробних поверхнево-активних речовин залежать від їх хімічного складу. Так, антимікробна активність ліпопептидів залежить від якісного та кількісного складу амінокислот у пептидній частині, а також конформації та довжини ацильного ланцюга і наявності у ньому замісників. Антибактеріальна та антифунгальна активність рамноліпідів визначається співвідношенням моно- та дирамноліпідів у їх складі, а софороліпідів – співвідношенням лактонної та нелактонної форм. Зазначимо, що кількість робіт, присвячених залежності біологічних властивостей ПАР від їх хімічного складу, хоча і стала збільшуватися в останні роки, все ж залишається обмеженою. На жаль, у цих роботах автори не акцентують увагу на взаємозв'язку умов культивування продуцентів, хімічного складу синтезованих ПАР та їх біологічних властивостей, і на теперішній час дослідження впливу умов культивування на антимікробну та антиадгезивну активність ПАР залишається поза увагою науковців. У літературі є поодинокі повідомлення про вплив складу поживного середовища (зокрема, природи джерела вуглецю) на біологічні властивості ПАР, проте у цих роботах автори просто констатували факт такої залежності, не намагаючись встановити причини, не кажучи вже про розробку фізіологічних підходів до регуляції властивостей в процесі культивування продуцентів, що необхідно для отримання цільового продукту зі стабільними, заданими властивостями залежно від сфери практичного застосування. Нині основними підходами до регуляції біологічних властивостей мікробних ПАР є їх постферментаційна хімічна модифікація, а також вдосконалення методами метаболічної та генетичної інженерії штамів-продуцентів, які синтезують окремі складові комплексу поверхнево-активних речовин, відповідальних за певні властивості.

Наші результати свідчать про те, що існує значно простіший і не менш ефективний спосіб отримання мікробних ПАР з певними властивостями, а також показують можливість регуляції біологічних властивостей ПАР в процесі культивування продуцента на модифікованому середовищі, що містить активатори ферментів, відповідальних за синтез компонентів комплексу поверхнево-активних речовин з певними необхідними властивостями.

## **ВЗАИМОСВЯЗЬ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРОБНЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

*Т.П. Пирог<sup>1,2</sup>, Л.В. Ключка<sup>1</sup>, Т.А. Шевчук<sup>2</sup>, Ф.В. Мучник<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Национальный университет пищевых технологий,  
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина*

<sup>2</sup>*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

### Резюме

Микробные поверхностно-активные вещества (ПАВ) являются продуктами мультифункционального назначения, однако в различных условиях культивирования продуцентов их состав и свойства могут изменяться.

В обзоре приведены данные литературы и собственных экспериментальных исследований о зависимости антимикробной активности ПАВ микробного происхождения от химического состава, а также о влиянии условий культивирования на свойства поверхностно-активных веществ. Анализ данных литературы показал, что антибактериальная и антифунгальная активность липопептидов зависит от размера и состава пептидной составляющей, конформации и длины ацильной цепи; рамнолипидов - от соотношения моно- и дирамнолипидов в составе комплекса; софоролипидов - от соотношения лактонной и нелактонной форм этих ПАВ. Согласно данным литературы основными подходами к регуляции биологических свойств микробных ПАВ является их постферментационная химическая модификация, а также усовершенствование штаммов-продуцентов методами метаболической и генетической инженерии. Результаты собственных исследований свидетельствуют о том, что выявление потенциальных активаторов и/или ингибиторов ключевых ферментов биосинтеза компонентов комплекса вторичных метаболитов, ответственных за определенные свойства, с последующей соответствующей модификацией состава питательной среды позволяет регулировать состав комплекса, а следовательно, и свойства целевого продукта.

*Ключевые слова:* липопептиды, рамнолипиды, софоролипиды, антимикробная и антиадгезивная активность, условия культивирования, химический состав

## **INTERRELATION OF CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF MICROBIAL SURFACTANTS**

*T.P. Pirog<sup>1,2</sup>, L.V. Kliuchka<sup>1</sup>, T.A. Shevchuk<sup>2</sup>, F.V. Muchnyk<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>National University of Food Technologies,  
68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine*

*<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

### **Summary**

Microbial surfactants are products of multifunctional application, however, their composition and properties may change under different cultivation conditions of producers.

The review presents literature data and its own experimental researches on dependence of the antimicrobial activity of surfactants on the chemical composition, as well as on the influence of cultivation conditions on the properties of final product. Analysis of literature data showed that antibacterial and antifungal activity of lipopeptides depends on the size and composition of the peptide component, conformation and length of the acyl chain; rhamnolipids – ratio of mono- and dirhamnolipid in the complex; sophorolipids – ratio of lactone and non-lactone forms of these surfactants. According to the literature, the main approaches to the regulation of the biological properties of microbial surfactants are their post-fermentation chemical modification, as well as the improvement of producer strains by methods of metabolic and genetic engineering. The results of our own research indicate that the identification of potential activators and/or inhibitors of key enzymes of biosynthesis of components responsible for certain properties, followed by appropriate modification of medium cultivation composition allows to regulate properties of final product.

*Key words:* lipopeptides, rhamnolipids, sophorolipids, antimicrobial and antiadhesive activity, cultivation conditions, chemical composition.



1. Santos DK, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(3):401. doi: 10.3390/ijms17030401.
2. Mnif I, Ghribi D. Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. *J Sci Food Agric.* 2016; 96(13):4310–20. doi: 10.1002/jsfa.7759.
3. De Almeida DG, Soares Da Silva RC, Luna JM, Rufino RD, Santos VA, Banat IM, et al. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Front Microbiol.* 2016; 7:1718. doi: 10.3389/fmicb.2016.01718.
4. Pirog TP, Sidor IV, Lutsai DA. Calcium and magnesium cations influence on antimicrobial and antiadhesive activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants. *Biotechnologia acta.* 2016; 9(6):50–7. <https://doi.org/10.15407/biotech9.06.050>.
5. Pirog TP, Nikituk LV, Shevchuk TA. [Influence of divalent cations on synthesis of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants with high antimicrobial and anti-adhesion activity]. *Mikrobiol Z.* 2017; 79(5):13–22. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.05.013>.
6. Pirog TP, Shevchuk TA, Petrenko NM, Paliichuk OI, Iutynska GO. [Influence of Cultivation Conditions of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 on the Properties of Synthesized Surfactants]. *Mikrobiol Z.* 2018; 80(4):13-27. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.04.013>.
7. Kim PI, Ryu J, Kim YH, Chi YT. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechnol.* 2010; 20(1):138-45.
8. Velho RV, Medina LF, Segalin J, Brandelli A. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiol (Praha).* 2011; 54(4):279-303. doi:10.1007/s12223-011-0056-7.
9. Sharma D, Mandal SM, Manhas RK. Purification and characterization of a novel lipopeptide from *Streptomyces amritsarensis* sp. nov. active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *AMB Express.* 2014; 4:50. doi: 10.1186/s13568-014-0050-y.
10. Mandal SM, Sharma S, Pinnaka AK, Kumari A, Korpole S. Isolation and characterization of diverse antimicrobial lipopeptides produced by *Citrobacter* and *Enterobacter*. *BMC Microbiol.* 2013; 13:152. doi: 10.1186/1471-2180-13-152.
11. Mandal SM, Barbosa AE, Franco OL. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(5):338–45. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.004.
12. Zhihui X, Jiahui S, Bing L, Xin Y, Qirong S, Ruifu Z. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(3):808–15. doi: 10.1128/AEM.02645-12.
13. Singh AK, Rautela R, Cameotra SS. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2. *Microb Cell Fact.* 2014; 13:67. doi: 10.1186/1475-2859-13-67.
14. Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 2008; 16(3):115-25. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009.

15. Götze S, Herbst-Irmer R, Klapper M, Görts H, Schneider KRA, Barnett R, et al. Structure, biosynthesis, and biological activity of the cyclic lipopeptide anikasin. *ACS Chem Biol*. 2017; 12(10):2498-502. doi: 10.1021/acscchembio.7b00589.
16. Meena KR, Kanwar SS. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:473050. doi: 10.1155/2015/473050.
17. Tabbene O, Kalai L, Ben Slimene I, Karkouch I, Elkahoui S, Gharbi A, et al. Anticandida effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* B38. *FEMS Microbiol Lett*. 2011; 316(2):108-14. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02199.x.
18. Tareq FS, Lee MA, Lee HS, Lee JS, Lee YJ, Shin HJ. Gageostatins A–C, antimicrobial linear lipopeptides from a marine *Bacillus subtilis*. *Mar. Drugs*. 2014; 12(2):871-85. doi: 10.3390/md12020871.
19. Ramachandran R, Shrivastava M, Narayanan NN, Thakur RL, Chakrabarti A, Roy U. Evaluation of antifungal efficacy of three new cyclic lipopeptides of the class bacillomycin from *Bacillus subtilis* RLID 12.1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(1): e01457-17. doi: 10.1128/AAC.01457-17.
20. Asari S, Ongena M, Debois D, De Pauw E, Chen K, Bejai S et al. Insights into the molecular basis of biocontrol of *Brassica* pathogens by *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 lipopeptides. *Ann Bot*. 2017, 120(4):551-62. doi: 10.1093/aob/mcx089.
21. Ma Z, Geudens N, Kieu NP, Sinnaeve D, Ongena M, Martins JC et al. Biosynthesis, chemical structure, and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. *Front Microbiol*. 2016; 7:382. doi: 10.3389/fmicb.2016.00382.
22. Li XY, Mao ZC, Wang YH, Wu YX, He YQ, Long CL. Diversity and active mechanism of fengycin-type cyclopeptides from *Bacillus subtilis* XF-1 against *Plasmodiophora brassicae*. *J Microbiol Biotechnol*. 2013; 23(3):313-20.
23. Huang E, Yang X, Zhang L, Moon SH, Yousef AE. New *Paenibacillus* strain produces a family of linear and cyclic antimicrobial lipopeptides: cyclization is not essential for their antimicrobial activity. *FEMS Microbiol Lett*. 2017; 364(8). doi: 10.1093/femsle/fnx049.
24. Baidara P, Mandal SM, Chawla N, Singh PK, Pinnaka AK, Korpole S. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express*. 2013; 3(1). doi: 10.1186/2191-0855-3-2.
25. Zhou Z, Liu F, Zhang X, Zhou X, Zhong Z, Su H, et al. Cellulose-dependent expression and antibacterial characteristics of surfactin from *Bacillus subtilis* HH2 isolated from the giant panda. *PLoS One*. 2018; 13(1):e0191991. doi: 10.1371/journal.pone.0191991.
26. Cortés-Sánchez Ade J, Hernández-Sánchez H, Jaramillo-Flores ME. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiol Res*. 2013; 168(1):22-32. doi: 10.1016/j.micres.2012.07.002.
27. Vollbrecht E, Rau U, Lang S. Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. *Lipid Fett*. 1999; 101(10):389-94.

28. Pinazo A, Infante MR, Casals M, Garcí'a F, Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. 2001; 17(5):1367-71.
29. Christova N, Tuleva B, Kril A, Georgieva M, Konstantinov S, Terziyski I, et al. Chemical structure and in vitro antitumor activity of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BN10. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013; 170(3):676-89. doi: 10.1007/s12010-013-0225-z.
30. Janek T, Lukaszewicz M, Krasowska A. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013, 110:379-86. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.05.008.
31. Das P, Yang XP, Ma LZ. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. *Front Microbiol*. 2014; 5:696. doi: 10.3389/fmicb.2014.00696.
32. Ohlendorf B, Lorezen W, Kehraus S, Krick A, Bode HB, König GM. Myxotyrosides A and B, unusual rhamnosides from *Myxococcus* sp. *J Nat Prod*. 2009; 72(1):82-6. doi: 10.1021/np8005875.
33. Čejková A, Schreiberová O, Jezdik R, Chudoba J, Jirku V, Řezanka T. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* and *Pseudomonas aeruginosa* as producers of rhamnolipids. *J Biotechnol*. 2014; 185:S119-S120.
34. Díaz De Rienzo MA, Kamalanathan ID, Martin PJ. Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC9027 using foam fractionation. *Process Biochem*. 2016; 51(7):820-7.
35. Paulino BN, Pessôa MG, Mano MC, Molina G, Neri-Numa IA, Pastore GM. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100(24):10265-93.
36. Raza ZA, Khalid ZM, Banat IM. Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. *J Environ Sci Health A*. 2009; 44(13):1367-73. doi: 10.1080/10934520903217138.
37. Gudiña EJ, Rodrigues AI, Alves E, Domingues MR, Teixeira JA, Rodrigues LR. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. *Bioresour Technol*. 2015; 177:87-93. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.069.
38. Rudden M, Tsauosi K, Marchant R, Banat IM, Smyth TJ. Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the quantitative determination of rhamnolipid congeners. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(21):9177-87. doi: 10.1007/s00253-015-6837-1.
39. Zhu K, Rock CO. RhIA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the betahydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2008; 190(9):3147-54. doi: 10.1128/JB.00080-08.
40. Ndlovu T, Rautenbach M, Khan S, Khan W. Variants of lipopeptides and glycolipids produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* cultured in different carbon substrates. *AMB Express*. 2017; 7(1):109. doi: 10.1186/s13568-017-0367-4.

41. Elshikh M, Funston S, Chebbi A, Ahmed S, Marchant R, Banat IM. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. *N Biotechnol.* 2017; 36:26-36. doi: 10.1016/j.nbt.2016.12.009.
42. Rodrigues AI, Gudiña EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR. Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. *Sci Rep.* 2017; 7(1):12907. doi: 10.1038/s41598-017-13424-x.
43. Aleksic I, Petkovic M, Jovanovic M, Milivojevic D, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J et al. Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. *Front Microbiol.* 2017; 8:2454. doi: 10.3389/fmicb.2017.02454.
44. Oliveira MR, Magri A, Baldo C, Camilios-Neto D, Minucelli T, Celligoi M. Sophorolipids a promising biosurfactant and its applications. *Int J Adv Biotechnol Res.* 2015; 6:161-74.
45. Ashby RD, Nuñez A, Solaiman DKY, Foglia TA. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. *JAOCS.* 2005; 82(9):625–30.
46. Borsanyiova M, Patil A, Mukherji R, Prabhune A, Bopegamage S. Biological activity of sophorolipids and their possible use as antiviral agents. *Folia Microbiol (Praha).* 2016; 61(1):85-9. doi: 10.1007/s12223-015-0413-z.
47. Dengle-Pulate V, Chandorkar P, Bhagwat S, Prabhune AA. Antimicrobial and SEM studies of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol. *J Surfactant Deterg.* 2014; 17(3):543–52.
48. Zhang X, Ashby R, Solaiman DK, Uknalis J, Fan X. Inactivation of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. by palmitic, stearic, and oleic acid sophorolipids and thiamine dilauryl sulfate. *Front Microbiol.* 2016; 7:2076. doi: 10.3389/fmicb.2016.02076.
49. Morya VK, Park JH, Kim TJ, Jeon S, Kim EK. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. *Bioresour Technol.* 2013; 143:282-8. doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.094.
50. Solaiman DK, Ashby RD, Birbir M, Caglayan P. Antibacterial activity of sophorolipids produced by *Candida bombicola* on gram-positive and gram-negative bacteria isolated from salted hides. *JALCA.* 2016; 111:358-64.
51. Sleiman JN, Kohlhoff SA, Roblin PM, Wallner S, Gross R, Hammerschlag MR et al. Sophorolipids as antibacterial agents. *Ann Clin Lab Sci.* 2009; 3 (1):60-3.
52. Ribeiro IA, Bronze MR, F Castro M, Ribeiro MH. Selective recovery of acidic and lactonic sophorolipids from culture broths towards the improvement of their therapeutic potential. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2016; 39(12):1825–37. doi: 10.1007/s00449-016-1657-y.
53. Chong H, Li Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microb Cell Fact.* 2017; 16(1):137. doi: 10.1186/s12934-017-0753-2.
54. Tiso T, Zauter R, Tulke H, Leuchtle B, Li WJ, Behrens B, et al. Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: production and characterization. *Microb Cell Fact.* 2017; 16(1):225. doi: 10.1186/s12934-017-0838-y.
55. Wittgens A, Kovacic F, Müller MM, Gerlitzki M, Santiago-Schübel B, Hofmann D, et al. Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017; 101(7):2865-78. doi: 10.1007/s00253-016-8041-3.

56. Wittgens A, Santiago-Schuebel B, Henkel M, Tiso T, Blank LM, Hausmann R, et al. Heterologous production of long-chain rhamnolipids from *Burkholderia glumae* in *Pseudomonas putida* – a step forward to tailor-made rhamnolipids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(3):1229-1239. doi:10.1007/s00253-017-8702-x.
57. Roelants SL, Ciesielska K, De Maeseneire SL, Moens H, Everaert B, Verweire S, et al. Towards the industrialization of new biosurfactants: Biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmerella bombicola*. *Biotechnol Bioeng.* 2016; 113(3): 550–9. doi: 10.1002/bit.25815.

Отримано 11.12. 2018