



## Biosurfaktanty drobnoustrojów (część 2)

### Microbial biosurfactants (part 2)

Katarzyna Paraszkiwicz<sup>1</sup>, Anna Kuśmierska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii  
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

#### Streszczenie

Biosurfaktanty pochodzenia drobnoustrojowego (produkowane głównie przez bakterie i drożdże) wykazują szereg zalet w porównaniu ze swoimi syntetycznymi odpowiednikami. Należą do nich m.in.: niższa toksyczność, wyższa podatność na biodegradację, lepsze dostosowanie się do środowiska i wyższa aktywność w ekstremalnych warunkach. Ponadto związki te są wytwarzane ze źródeł odnawialnych, w tym możliwa jest produkcja oparta na utylizacji odpadów i produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego. Niemniej ze względu na niskie koszty procesów chemicznych na rynku dominują obecnie syntetyczne środki powierzchniowo czynne. Niniejszy artykuł przeglądowy omawia wybrane aspekty strategii biotechnologicznych mających na celu poprawę wydajności produkcji i komercyjnego upowszechnienia biosurfaktantów – związków określanych mianem tzw. „zielonej chemii”.

#### Słowa kluczowe

biosurfaktant, skrining, produkcja, strategia omikowa

**Abstract**

*Biosurfactants of microbial origin (produced mainly by bacteria and yeast) exhibit such advantages over synthetic counterparts as lower toxicity, higher biodegradability, better environmental compatibility and higher activity under extreme conditions. Moreover, they are produced from renewable resources including wastes and by-products generated by agriculture and food processing. Nevertheless, now mainly synthetic surfactants are available in the market due to their very low price. This review article is focused on some aspects involved in the biotechnological strategies developed for improving biosurfactant production and a wider implementation of these "green chemicals" into the market.*

**Keywords**

*Biosurfactant, screening, production, omics strategy*

## **Czynniki przyspieszające postęp badań i komercjalizację biosurfaktantów**

Biosurfaktanty drobnoustrojów określane są mianem zielonego (ekologicznego) rozwiązania (*green solution*) lub zielonej chemii (*green chemistry*). Związki te charakteryzują się szeregiem zalet w porównaniu z syntetycznymi odpowiednikami. Należą do nich m.in. niższa toksyczność, wyższa aktywność powierzchniowa, różnorodna aktywność biologiczna oraz większa podatność na biodegradację, a tym samym krótszy czas zalegania w środowisku [1]. Duże znaczenie ma fakt, że biosurfaktanty produkowane są przy wykorzystaniu odnawialnych źródeł węgla, możliwe jest także użycie (jako składników podłoży mikrobiologicznych) odpadów i produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego. Dlatego dodatkowym czynnikiem stymulującym jest przyjęty przez Unię Europejską dokument proponujący wsparcie dla działań rozwijających gospodarkę o obiegu zamkniętym – opartą na możliwie największym wykorzystaniu odpadów i produktów ubocznych [2]. Innym, równie ważnym dokumentem unijnym jest Dyrektywa EC No 648/2004 [3], według której wymagany jest opis podatności na biodegradację surfaktantów przeznaczonych do użycia w ochronie środowiska oraz w ochronie zdrowia.

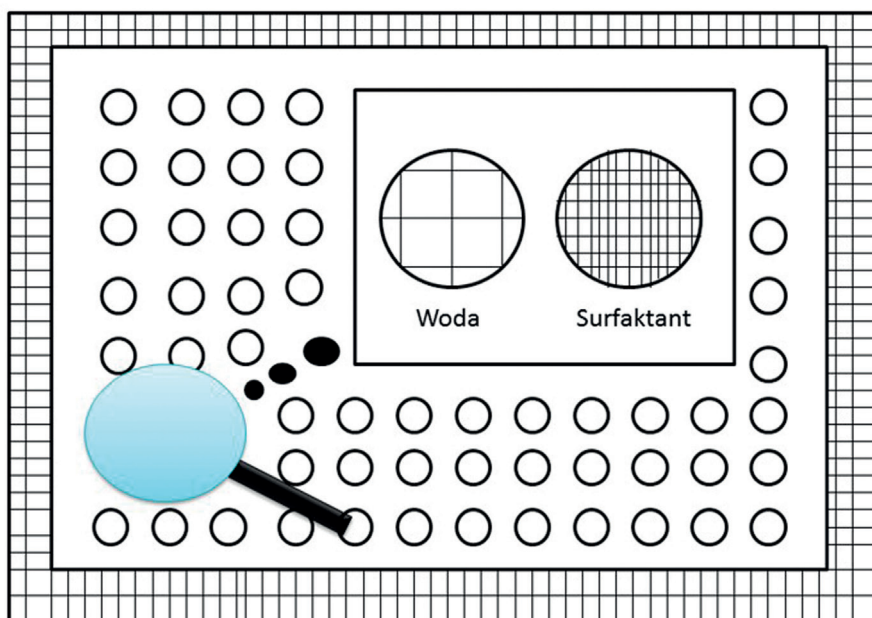
Opracowanie nowych technik badawczych (obejmujących m.in. metody chromatograficzne sprzężone ze spektrometrią mas), sposobów prowadzenia badań (tzw. strategia omikowa – *omics strategy*) oraz regulacje prawne i wzrost świadomości społeczeństwa odnośnie do konieczności ochrony środowiska naturalnego spowodowały znaczący postęp badań podstawowych, jak i prac aplikacyjnych poświęconych biosurfaktantom, w tym szczególnie ramnolipidom [4, 5, 6, 7], lipopeptydom [8, 9, 10, 11] oraz glikolipidom produkowanym przez drożdże [12, 13, 14, 15, 16].

## **Metody stosowane do szybkiej oceny obecności biosurfaktantów**

Metody te nie wymagają specjalistycznego sprzętu. Ze względu na szybkość i prostotę wykonania stały się bardzo użyteczne podczas badań skriningowych, w których z dużej liczby szczepów izolowane są drobnoustroje produkujące surfaktanty [17, 18]. W bezpośrednich metodach skriningowych pozwalających wskazać kolonie potencjalnych producentów ZPC wykorzystywane są:

1. podłoże stałe z warstwą oleju;
2. podłoże stałe z kationowym kompleksem CTAB-MB (*Cetyltrimethylammonium bromide-Methylene Blue*);
3. podłoże agarowe z krwią baranią (*blood agar*).

Ocena zdolności do hemolizy erytrocytów wykorzystywana jest przede wszystkim do izolacji szczepów produkujących lipopeptydy i niektóre ramnolipidy. Test ten charakteryzuje się jednak dość dużym odsetkiem fałszywych wyników, co wynika z możliwości wydzielania przez mikroorganizmy innych niż surfaktanty czynników hemolizujących. Kolejne techniki wymagają przygotowania hodowli płynnych uprzednio wyizolowanych czystych kultur. Wyznaczenie aktywności emulgacyjnej ( $E_{24}$ ) pozwala wykryć w płynie pochodowlanym emulgatory. Metody kolorymetryczne znalazły zastosowanie w testach wykrywających obecność anionowych biosurfaktantów (związki te tworzą z kationowymi odczynnikami barwne kompleksy). Test załamującej się kropli (*drop collapse test*) polega na umieszczeniu kropli płynu pochodowlanego na hydrofobowej powierzchni. W wypadku obecności biosurfaktantu kropla zmienia kształt i staje się płaska. W kolejnej metodzie (*oil spreading technique*) na powierzchnię wody nanoszona jest kropla oleju, na którą nakraplany jest płyn pochodowlany. Średnica powstającego przejaśnienia jest proporcjonalna do stężenia biosurfaktantu w próbie. Chen i wsp. [19] opracowali prosty w użyciu test, w którym 96-dołkowa płytka (zawierająca próby badanych płynów pochodowlanych) umieszczana jest na kartce papieru milimetrowego (Ryc.1). Obserwacja wzoru kratki pozwala wskazać szczepy, które są zdolne do syntezy ZPC, ponieważ obecność biosurfaktantów zmienia kształt formowanego przez płyn menisku. Tym samym próby działają jak soczewki przybliżające lub oddalające (zagęszczające) wzór kratki. Najczęściej jako układy odniesienia stosowana jest woda oraz roztwory syntetycznych surfaktantów (Tween 80 lub SDS) lub dostępnej w handlu surfaktyny.



Ryc. 1. Metoda stosowana do szybkiej oceny obecności biosurfaktantów. 96-dołkowa płytki (zawierająca próbkę badanego płynu pochodowlanego) umieszczana jest na kartce papieru milimetrowego. Obserwacja wzoru krętek pozwala wskazać szczepy, które są zdolne do syntezy ZPC (obecność biosurfaktantów zmienia kształt formowanego przez płyn menisku).

### Czynniki regulujące syntezę biosurfaktantów

Substraty odżywcze obecne w środowisku mogą działać indukcyjnie lub powodować represję syntezy wielu biosurfaktantów. Do najczęściej opisywanych induktorów należą długołańcuchowe kwasy tłuszczowe oraz węglowodory alifatyczne typu alkanany. Dodatek tych związków do podłoża jest niezbędny podczas produkcji większości glikolipidów, lipopeptydów oraz niektórych biosurfaktantów złożonych. Natomiast represja syntezy biosurfaktantów obserwowana jest często w obecności łatwo metabolizowanych źródeł węgla np. glukozy, trójkarboksylowych kwasów czy glicerolu [20]. Rodzaj źródła węgla może wpływać zarówno na intensywność produkcji biosurfaktantów, jak i na strukturę chemiczną (a tym samym aktywność powierzchniową i/lub biologiczną) tych związków. Opisano biosurfaktanty, których wytwarzanie silnie zależy od zawartości źródła azotu oraz stężenia jonów niektórych metali, m.in.: Fe,

Mg, Ca oraz Mn [21]. Na przykład produkcja części ramnolipidów rośnie dopiero w warunkach ograniczonej dostępności azotu (przy odpowiednio wysokim stosunku C:N). Bardzo różnorodna jest także kinetyka wytwarzania związków powierzchniowo czynnych. Związki te mogą być produkowane w trakcie intensywnego wzrostu hodowli lub dopiero po osiągnięciu fazy stacjonarnej. Jeszcze inaczej (dwuetapowo) przebiega produkcja emulsanu. W logarytmicznej fazie wzrostu na powierzchni komórek gromadzony jest związek o strukturze zbliżonej do emulsanu. Wydzielanie do podłoża aktywnej formy tego surfaktantu następuje dopiero w fazie stacjonarnej. Zależnie od uzdolnień metabolicznych drobnoustrojów podłoża stosowane do produkcji surfaktantów zawierają jako źródło węgla: związki hydrofobowe (węglowodory ropy naftowej, tłuszcze zwierzęce, oleje roślinne) oraz/lub proste albo złożone węglowodany i alkohole (np. glukozę, laktozę, skrobię, etanol, glicerol). Jako źródło azotu mogą być wykorzystywane jony amonowe, azotanowe lub azot organiczny, np. w postaci hydrolizatów białkowych lub wyciągu namokowego z kukurydzy. Produkcja biosurfaktantów prowadzona jest najczęściej w podłożach płynnych, w warunkach hodowli okresowej lub hodowli ciągłej z zachowaniem małej szybkości rozcieńczania.

W literaturze opisano również metody otrzymywania niektórych ZPC przy użyciu hodowli w stałym złożu (*Solid State Fermentation, SSF*). Przykładem może być produkcja surfaktyny przez szczep *B. subtilis* namnażany na odpadach sojowych [22]. Zdolność do generowania i stabilizacji pian wykazuje wiele glikolipidów i lipopeptydów. Dlatego w hodowlach wgłębnych częstym problemem technologicznym jest pienienie. Stosowane rozwiązania technologiczne polegają m.in. na utrzymywaniu niskiego stężenia biosurfaktantu w podłożu hodowlanym. Na przykład podczas produkcji ramnolipidów hodowla jest zawracana do bioreaktora po uprzednim wydzieleniu surfaktantu na kolumnie adsorpcyjnej. Coraz częściej wykorzystuje się także metodę ciągłego odbierania i frakcjonowania płyny. Usuwanie biosurfaktantów w czasie prowadzenia hodowli ogranicza dodatkowo inhibicję produktem [23, 24].

### **Ekonomiczne aspekty produkcji mikrobiologicznych biosurfaktantów**

Według danych opublikowanych w raporcie CAGR (2014) [25] światowa produkcja ZPC wynosi obecnie około 15 Mton rocznie, w tym 344068,40 ton stanowią surfaktanty pozyskiwane ze źródeł biologicz-

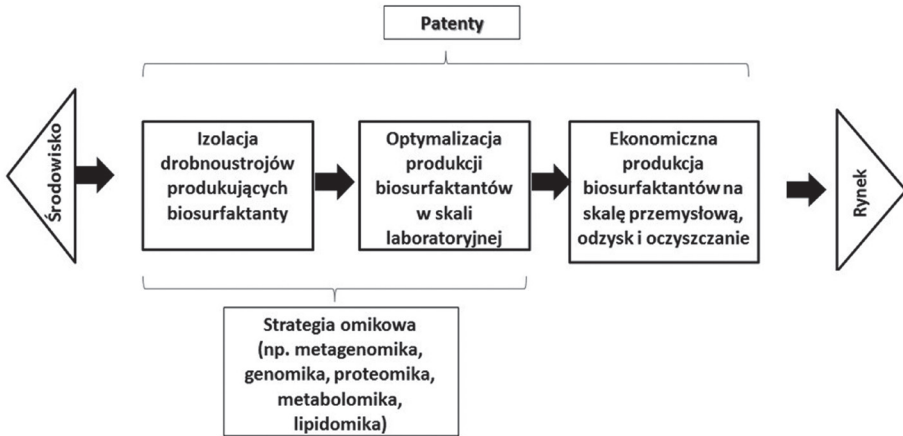
nych (*bio-based surfactants*), obejmujące głównie metyloestrosulfoniany (*metyl ester sulfonates*, MESs) oraz poliglukozydy alkilowe (*alkil polyglucosides*, APGs) otrzymywane w wyniku chemicznego przekształcania surowców roślinnych.

Tylko niektóre biosurfaktanty mikrobiologiczne osiągnęły opłacalność ekonomiczną. Należą do nich ramnolipidy, lipopeptydy, soforolipidy oraz emulsan. Do największych firm oferujących tego typu związki należą m.in. Soliance Company, Saraya Iwata Chemical Co. Ltd, Jeneil Biosurfactant Company (USA), Sigma oraz Lipofabrik. Cena drobnoustrojowych surfaktantów jest bardzo zróżnicowana i zależy m.in. od stopnia oczyszczenia (przeznaczenia produktu) oraz wydajności procesu produkcji (w tym przede wszystkim produktywności szczepu). Obecnie, w wyniku optymalizacji warunków hodowli oraz zastosowania szczepów zmodyfikowanych genetycznie, istotnie zwiększono wydajność otrzymywania niektórych ramnolipidów (do  $100 \text{ g l}^{-1}$ ) oraz soforolipidów (od 400 do  $700 \text{ g l}^{-1}$ ).

Prace zmierzające do obniżenia kosztów wytwarzania biosurfaktantów obejmują:

1. skryning drobnoustrojów o wysokiej wydajności produkcji ZPC lub surfaktantów zachowujących aktywność w szerokim zakresie temperatur, pH czy zasolenia,
2. udoskonalanie szczepów,
3. optymalizację składu podłoża i warunków prowadzenia bioprodukcji,
4. opracowanie tańszych i bardziej wydajnych metod wydzielenia i oczyszczania produktu,
5. ograniczenie ilości odpadów poprodukcyjnych oraz ustalenie możliwości ich dalszego wykorzystania [26].

Przebieg badań mających na celu ustalenie ekonomicznych metod produkcji biosurfaktantów przedstawiono schematycznie na Ryc. 2 [27].



Rycina 2. Etapy badań ukierunkowanych na ekonomiczną produkcję biosurfaktantów – od izolacji ze środowiska do wprowadzenia oczyszczonych preparatów na rynek. Zmodyfikowane na podstawie [27].

Szczepy produkujące biosurfaktanty występują w środowisku powszechnie. Często izolowane są ze środowisk zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi, z ryzosfery, fermentowanych produktów spożywczych, wód morskich i słodkich, a także z organizmów zwierzęcych [28, 29, 30, 31]. Szczególnie poszukiwane są biosurfaktanty zachowujące aktywność powierzchniową w ekstremalnych warunkach. Stąd częstą grupą środowisk badanych w kierunku obecności drobnoustrojów zdolnych do syntezy ZPC są tzw. środowiska ekstremalne [32, 33, 34].

Szczep przemysłowy powinien być zdolny zarówno do nadprodukcji biosurfaktantu, jak i charakteryzować się innymi cechami sprzyjającymi obniżeniu kosztów produkcji (np. łatwością flokulacji, małą wrażliwością na wahania składu podłoża i warunków produkcji czy niepatogennością). Obecnie na skalę przemysłową biosurfaktanty otrzymywane są przede wszystkim przy użyciu mutantów oraz rekombinantów transpozono-nych. Selekcja mutantów ukierunkowana jest m.in. na izolację szczepów o podwyższonej produktywności, mniej wrażliwych na jonowe detergenty oraz zdolnych do wzrostu na odpadach. Kierunki modyfikacji metodami inżynierii genetycznej obejmują z kolei: konstruowanie szczepów zdolnych do rozkładu laktozy (możliwość wykorzystania serwatki jako źródła składników odżywczych) oraz transfer genów odpowiedzialnych za syntezę biosurfaktantu, np. geny ramnolipidów patogennych szczepów



*P. aeruginosa* wprowadzane są m.in. do komórek szczepów *P. putida* lub *P. fluorescens*. Modyfikacje genu syntetazy peptydowej pozwoliły otrzymać różne odmiany surfaktyny, głównie o ograniczonej toksyczności wobec komórek *B. subtilis* oraz erytrocytów [7, 35].

W wypadku większości biosurfaktantów koszt składników podłoża hodowlanego może mieć bardzo znaczący udział (sięgający nawet 50%) w cenie końcowego produktu [36, 37]. Ograniczenie tej grupy wydatków polega na opracowaniu podłoży o optymalnym składzie i jednocześnie zawierających tanie źródła węgla i energii. Produkcja większości biosurfaktantów wymaga obok łatwo przyswajalnego źródła węgla (glukoza, sacharoza, etanol), także związków hydrofobowych (dawniej powszechnie stosowano węglowodory ropy naftowej). Z uwagi na rosnącą cenę tego surowca i jego nieodnawialny charakter prowadzone są badania nad możliwością użycia w skali przemysłowej podłoży zawierających różne surowce roślinne oraz odpady z przemysłu rolno-spożywczego. Wykorzystywane są m.in. melasa, serwatka, odpady powstające z przetwarzania ziemniaków, ryżu i zbóż, ścieki o wysokiej zawartości węglowodanów. Obecnie źródłem związków hydrofobowych są najczęściej oleje: słonecznikowy, rzepakowy, kukurydziany czy sojowy. Z uwagi na wysoką cenę tych produktów dąży się do zastąpienia ich olejami roślinnymi, które nie mają zastosowania w przemyśle spożywczym (np. ze względu na nieodpowiedni kolor, zapach lub skład chemiczny). Innym tanim źródłem mogą być odpady (makuchy) roślin oleistych, ścieki generowane podczas produkcji mydeł, z zakładów tłuszczowego oraz zużyte oleje spożywcze [22, 38, 39]. Drugim ważnym aspektem jest optymalizacja składu podłoża, sprzyjająca wysokiej produkcji biosurfaktantów. Wiele drobnoustrojów zwiększa intensywność wydzielania ZPC w warunkach ograniczonej dostępności źródła azotu lub po dodaniu jonów Fe lub magnezu. Dlatego opracowując skład podłoża hodowlanego, określa się optymalne dla ich produkcji wartości C:N, C:P, C:Fe oraz C:Mg. Poza takimi parametrami jak temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu (DOT), szybkość mieszania, pH i czas określa się także sprzyjającą produkcji danego biosurfaktantu metodę prowadzenia procesu (hodowla w stałym złożu, węgłbna, powierzchniowa, okresowa, półciągła itp.) oraz parametry dodawanego inokulum [40].

Wydzielenie i oczyszczenie produktu to w wypadku wielu procesów mikrobiologicznych nawet 60% całkowitych kosztów produkcji. Duża

różnorodność metod izolacji biosurfaktantów (Tab. 1) [26] wynika przede wszystkim z różnic w budowie chemicznej tych związków. Niekiedy surfaktant można izolować, stosując odmienne techniki. Tylko niektóre biosurfaktanty wydzielane są do podłoża hodowlanego. Część z nich występuje w postaci warstwy (otoczki) przylegającej do powierzchni komórek lub stanowią składniki ściany komórkowej. W tym ostatnim przypadku wydzielenie ZPC wymaga dezintegracji komórek drobnoustrojów (przykładem może być mannoproteina *S. cerevisiae*). Spośród metod stosowanych do wydzielenia biosurfaktantów (Tab. 1) na uwagę zasługują: stosowanie pian, umożliwiające zarówno wydzielenie, jak i wstępne oczyszczenie niektórych surfaktantów, techniki ultrafiltracji oraz zastępowanie acetonu, metanolu czy chloroformu tańszymi i mniej toksycznymi rozpuszczalnikami (np. *methyl-tertiary-butyl ether*).

Tabela 1. Wybrane metody stosowane do wydzielenia i oczyszczania biosurfaktantów [26].

Metoda	Biosurfaktant
Precypitacja siarczanem amonu	Biosurfaktanty złożone, zawierające część białkową np. emulsan, biodispersan
Precypitacja acetonem	Biosurfaktanty złożone zawierające część polisacharydową oraz niektóre glikolipidy
Kwaśna precypitacja (po zakwaszeniu do pH 2) prowadzona w niskiej temperaturze	surfaktyna
Ekstrakcja organicznymi rozpuszczalnikami*	Glikolipidy oraz liposan
Kryształizacja	Glikolipidy
Wirowanie	Glikolipidy
Adsorpcja (Amberlit, węgiel aktywny), a następnie ekstrakcja	Ramnolipidy, lipopeptydy,
Wydzielenie z użyciem piany, a następnie precypitacja w niskim pH i ekstrakcja	Surfaktyna
Techniki filtracyjne:	glikolipidy

\* np. chloroform; chloroform/metanol; dichlorometan/metanol; octan etylu; butanol; heksan; obecnie zastępowane tańszymi i mniej toksycznymi rozpuszczalnikami

W zależności od przeznaczenia handlowym preparatem biosurfaktantu może być płyn pochodzący, wydzielony związek lub związek otrzymany w wyniku wielokrotnie powtórzonych etapów zateżenia i oczyszczania. Wymagany stopień oczyszczenia zależy od przeznaczenia biosurfaktantów i ma bardzo istotny wpływ na ostateczną cenę produktu. Wysoko oczyszczone związki wykorzystywane są w przemyśle farmaceutycznym oraz do produkcji większości środków spożywczych i kosmetyków. Z kolei biosurfaktanty o niskim stopniu oczyszczenia mogą być stosowane do usuwania związków naftowych i metali ciężkich ze środowiska, mycia ładowni tankowców, w produkcji farb oraz w przemyśle tekstylnym. Cena tej grupy produktów jest już konkurencyjna w porównaniu z syntetycznymi surfaktantami. Dodatkowe zalety mikrobiologicznych ZPC (niższa toksyczność, szybsze uleganie biodegradacji i możliwość stosowania w dużo niższych stężeniach) powoduje, że biosurfaktanty są coraz częściej używane w aplikacjach środowiskowych.

Regulacje prawne związane z ochroną środowiska, a także rosnące opłaty za składowanie odpadów powodują, że koszty zagospodarowania odpadów poprodukcyjnych mają coraz większy udział w całkowitych kosztach prowadzenia bioprodukcji. Poza dążeniem do ograniczenia ilości otrzymywanych odpadów badane są także potencjalne możliwości dalszego ich wykorzystania i sprzedaży.

## Piśmiennictwo

1. Reis RS, Pacheco GJ, Pereira AG, Freire DMG. Biosurfactants: production and applications. W: Chamy R, Rosenkranz F, editors. Biodegradation – Life of Science. InTech; 2013. str. 31-61.
2. Communication EU Commission. 2012. "Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe". COM Brussels, 13.2.2012 COM(2012) 60 final.
3. Regulation EC No. 648/2004 of the European Parliament and of the Council on detergents. Official Journal of the European Union L 104. [Internet] 2004 March 31 [cited 2017 March 29]; str. 1-35. Available from: [eur42319.pdf](#).

4. Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 86: 1323–1336.
5. Müller MM, Kügler JH, Henkel M, Gerlitzki M, Hörmann B, Pöhnlein M, Syldatk C, Hausmann R. Rhamnolipids-next generation surfactants? *J Biotechnol* 2012; 31: 366–380.
6. Silva VL, Lovaglio RB, Von Zuben CJ, Contiero J. Rhamnolipids: solution against *Aedes aegypti*? *Front Microbiol* 2015; 6: 88
7. Dobler L, Vilela LF, Almeida RV, Neves BC. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *N Biotechnol* 2016; 25: 123–135.
8. Mulligan CN. Characterization, production and applications of lipopeptides. W: Mulligan CN, Sharma SK, Mudhoo A, editors. *Biosurfactants: Research Trends and Applications*. CRC Press Taylor & Francis Group; 2014. str.147-176.
9. Mnif I, Ghribi D. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers* 2015; 104: 129–147.
10. Walia NK, Cameotra SS. Lipopeptides: biosynthesis and applications. *J Microb Biochem Technol* 2015; 7: 103–107.
11. Meena KR, Kanwar SS. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int* 2015; 9 pages, doi: 10.1155/2015/473050.
12. Van Bogaert INA, Zhang J, Soetaert W. Microbial synthesis of sophorolipids. *Proc Biochem* 2011; 46: 821–833.
13. Paraszkiwicz K, Jasińska A, Słaba M. Budowa produkcja i zastosowanie soforolipidów. *Pol J Cosmet* 2012; 15(1): 15–20.

14. Roelants SL, De Maeseneire SL, Ciesielska K, Van Bogaert IN, Soetaert W. Biosurfactant gene clusters in eukaryotes: regulation and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98: 3449-3461.
15. Yu M, Liu Z, Zeng G, Zhong H, Liu Y, Jiang Y, Li M, He X, He Y. Characteristics of mannosylerythritol lipids and their environmental potential. *Carbohydr Res* 2015; 407: 63-72.
16. Morita T, Fukuoka T, Imura T, Kitamoto D. Mannosylerythritol lipids: production and applications. *J Oleo Sci* 2015; 64: 133-141.
17. Satpute SK, Banpurkar AG, Dhakephalkar PK, Banat IM, Chopade BA. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit Rev Biotechnol* 2010; 30: 127-144.
18. Walter V, Syldatk C, Hausmann R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Adv Exp Med Biol* 2010; 672: 1-13.
19. Chen CY, Baker SC, Darton RC. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *J Microbiol Methods* 2007; 70: 503-510.
20. Santos AS, Sampaio AP, Vasquez GS, Santa Anna LM, Pereira NJr, Freire DM. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Biochem Biotechnol* 2002; 98-100: 1025-1035.
21. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti G, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 87: 427-444.
22. Das K, Mukherjee AK. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochem* 2007; 42: 1191-1199.

23. Heyd M, Kohnert A, Tan TH, Nusser M, Kirschhöfer F, Brenner-Weiss G, Franzreb M, Berensmeier S. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391: 1579-1590.
24. Henkel M, Müller MM, Kügler JH, Lovaglio RB, Contiero J, Sylдатk C, Hausmann R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochem* 2012; 47: 1207-1219.
25. CAGR report. Biosurfactants market by product (Market Research Report Code, GVR20). Grand View Research Inc. [Internet] 2015 April. [cited 2017 March 29] Available from: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biosurfactants-industry>.
26. Mukherjee S, Das P, Sen R, Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* 2006; 24: 509-515.
27. Paraszkiwicz K, Długoński J, Trzmielak D. Application of Recent Omics Achievements in Bioremediation Processes Illustrated by Progress in Microbial Surfactants Commercialization. W: Długoński J, editor. *Microbial Biodegradation: From Omics to Function and Application*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2016. str. 219-232.
28. Joshi S, Bharucha C, Desai AJ. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Biore-sour Technol* 2008; 99(11): 4603-4608.
29. Ebrahimi A, Tashi N, Lotfalian S. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oily skin areas of small animals. *Jundishapour J Microbiol* 2012; 5(2): 401-404.
30. Ibrahim ML, Ijah UJJ, Manga SB, Bilbis LS, Umar S. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *Int Biodeterior Biodegradation* 2013; 81: 28-34.

31. Płaza G, Chojniak J, Rudnicka K, Paraszkiwicz K, Bernat P. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. *J Appl Microbiol* 2015; 119: 1023-1034.
32. Janek T, Łukaszewicz M, Rezanka T, Krasowska A. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour Technol* 2010; 101: 6118-6123.
33. Jadhav VV, Yadav A, Shouche YS, Aphale S, Moghe A, Pillai S, Arora A, Bhadekar, RK. Studies on biosurfactant from *Oceanobaçillus* sp. BRI 10 isolated from Antarctic sea water. *Desalination* 2013; 318: 64-71.
34. da Silva FS, Pylro VS, Fernandes PL, Barcelos GS, Kalks KH, Schaefer CE, Tótola MR. Unexplored Brazilian oceanic island host high salt tolerant biosurfactant-producing bacterial strains. *Extremophiles* 2015; 19(3): 561-572.
35. Cha M, Lee N, Kim M, Lee S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresour Technol* 2008; 99: 2192-2199.
36. Marchant R, Banat IM. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol* 2012; 30: 558-565.
37. Satpute SK, Płaza GA, Banpurkar AG. Biosurfactants' production from renewable natural resources: example of innovated smart technology in circular bioeconomy. *Management Systems in Production Engineering* 2017; 1: 46-54.
38. Košaric N, Vardar Sukan F, red. *Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2014.
39. Moya RI, Tsaousi K, Rudden M, Marchant R, Jurado Alameda E, García Román M, Banat IM. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresour Technol* 2015; 198: 231-236.

40. Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R, Nyayanit NV. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front Microbiol* 2014; 5: 697-708.

#### **Adres do korespondencji**

Katarzyna Paraszkiwicz  
e-mail: [katarzyna.paraszkiwicz@biol.uni.lodz.pl](mailto:katarzyna.paraszkiwicz@biol.uni.lodz.pl)  
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii  
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii,  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16,  
90-237, Łódź,  
tel. (48-42) 6354146,  
fax(48-42)6655818.