



Biosurfaktanty drobnoustrojowe – synteza i zastosowanie

Katarzyna Paraszkiwicz, Jerzy Długoński

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Uniwersytet
Łódzki, Łódź

Microbial surfactants – synthesis and commercial applications

Summary

This article reviews the information from the last decade in the world literature on microbial biosurfactants. Biosurfactants classification, kinetics of production and factors affecting synthesis of these compounds are described. Special emphasis is put on the natural roles played by surface active agents in the growth microorganisms which produce them. The development of biosurfactants genetics is presented and their potential commercial use is discussed.

Key words

surface active agents, biosurfactants, emulsifiers, microorganisms, biopolymers.

1. Wprowadzenie

Określenie „surfaktant” pochodzi od angielskiego terminu *surface active agent* i oznacza związek powierzchniowo czynny. Surfaktanty charakteryzują się amfifilową (amfipatyczną) budową cząsteczek, ponieważ posiadają zarówno część hydrofilową, jak i hydrofobową, pozwalającą im gromadzić się przy powierzchni oddzielającej dwie, nie mieszające się fazy fizyczne. Na skutek migracji stężenie cząstek surfaktanta na granicy faz jest większe, niż w roztworze. W konsekwencji, poprzez zmniejszenie energii swobodnej danego układu fizycznego, następuje spadek napięcia powierzchniowego między dwoma nie mieszającymi się fazami (1).

Adres do korespondencji

Katarzyna Paraszkiwicz,
Katedra Mikrobiologii
Przemysłowej
i Biotechnologii,
Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16,
90-237 Łódź.

biotechnologia

4 (63) 82–91 2003

Surfaktanty ze względu na zdolność obniżania napięcia międzyfazowego i stabilizowania emulsji wchodzi w skład wielu produktów chemii gospodarczej, żywności, leków i kosmetyków, a także są stosowane na różnych etapach produkcji papieru, tkanin, farb, wyrobów ceramicznych. Większość z nich otrzymywana jest na drodze syntezy chemicznej z ropy naftowej. Pod koniec XX w. produkcję surfaktantów oceniano na 3 miliony ton rocznie (2).

Zdolność do wytwarzania związków powierzchniowo czynnych wykazuje wiele organizmów należących do drobnoustrojów, roślin i zwierząt, przy czym dość powszechna jest synteza surfaktantów przez drobnoustroje. Mikroorganizmy charakteryzują się wysokim stosunkiem powierzchni do objętości i, jak się sądzi, sprzyja to produkcji różnorodnych, aktywnych powierzchniowo substancji, odgrywających dużą rolę w utrzymywaniu się w danym środowisku, bądź ułatwiających wykorzystywanie do wzrostu źródeł węgla o niskim powinowactwie do wody (3).

Dążenie do zastępowania surfaktantów, otrzymywanych na drodze syntezy chemicznej odpowiednikami pochodzenia biologicznego, wynika m.in. z niskiej toksyczności, szybkiej biodegradacji, oraz bardzo zróżnicowanych właściwości fizykochemicznych biosurfaktantów. Ich dodatkową zaletę stanowi fakt, że są wytwarzane w nieagresywnych warunkach środowiska, a do produkcji stosowane są głównie odnawialne źródła węgla, często stanowiące różnorodne odpady przemysłowe (4).

2. Budowa i podział biosurfaktantów

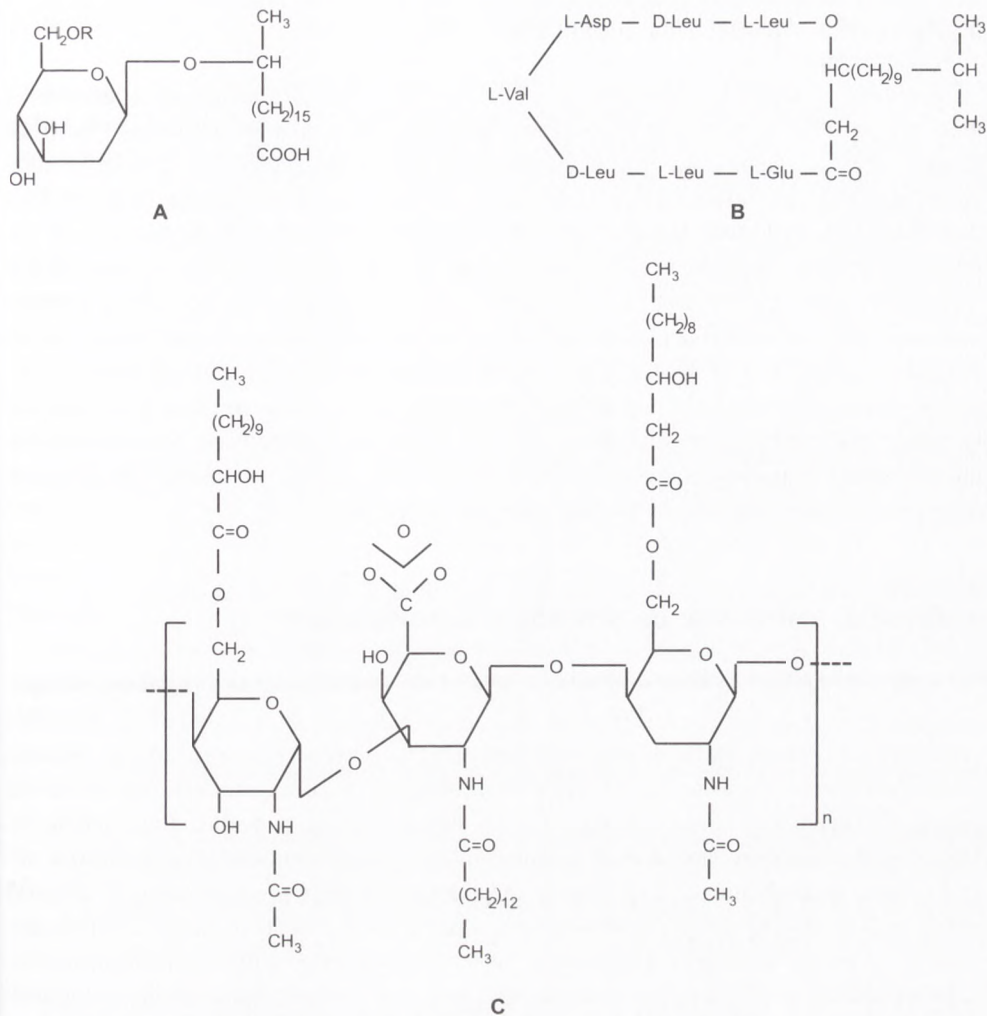
Biosurfaktanty drobnoustrojowe dzielone są zazwyczaj na dwie grupy: surfaktanty niskocząsteczkowe (np. glikolipidy, lipopeptydy, kwasy tłuszczowe), silnie obniżające napięcie powierzchniowe i międzyfazowe oraz surfaktanty wysokocząsteczkowe (zawierające m. in. wielocukry, białka, lipidy), zdolne do tworzenia stabilnych emulsji. W skład części hydrofilowej biosurfaktantów wchodzi m. in. glicerol, cukier, mleczan, fosfatydylocholina. Część hydrofobową buduje przeważnie długiłańcuchowy kwas tłuszczowy. W surfaktantach białkowo-cukrowych część hydrofobową stanowi fragment łańcucha polipeptydowego, ułożony przestrzennie tak, że przeważają w nim aminokwasy hydrofobowe. W tabeli przedstawiono podział biosurfaktantów ze względu na budowę chemiczną i wielkość cząstek, podano przykłady związków oraz ich producentów (2,5). Struktury chemiczne wybranych biosurfaktantów zamieszczono na rysunku.

Podział biosurfaktantów ze względu na skład chemiczny i wielkość cząsteczek (2,5,9,11)

Klasa	Wielkość cząsteczek	Grupa	Nazwa zwyczajowa surfaktanta	Producent
glikolipidy	N	ramnolipidy		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		trehalolipidy		<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Artbrobacter</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp.
		soforolipidy		<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i>
		cellobiolipidy		<i>Ustilago maydis</i>
lipopeptydy i lipoproteiny	N		gramicydyna S	<i>Bacillus brevis</i>
	W		polimyksyna surfaktyna subtilizyna serrawetyna lichenizyna	<i>Bacillus polymyxa</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
kwasy tłuszczowe lipidy fosfolipidy	N	kwasy tłuszczowe lipidy fosfolipidy		<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Penicillium spiculisporum</i>
złożone a) glikolipidy	W		BD4 emulsan alasan biodispersan mannoproteina liposan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD 413 <i>Acinetobacter radioresistens</i> KA 53 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida lipolitica</i>
złożone b) inne	W		Rag 1 emulsan Emulsan 378 peptydoglikolipid	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Curvularia lunata</i> IM 2901
specjalne	W	fimbrie składniki struktur komórkowych		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG 1 <i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i>

N – surfaktanty niskocząsteczkowe; W – surfaktanty wysokocząsteczkowe.

Do jednych z najlepiej zbadanych drobnoustrojowych surfaktantów należą glikolipidy. Zawierają one reszty takich cukrów jak: ramnoza, soforoza, lub trehaloza połączone z długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi. Z kolei lipopeptydy produkowane są niemal wyłącznie przez bakterie z rodziny *Bacillus* i składają się z krótkich peptydów zbudowanych od trzech do dwunastu aminokwasów, połączonych z częścią lipidową. Do grupy tej należy surfaktyna, jeden z najbardziej efektywnych surfaktantów, które dotąd opisano. Surfaktyna produkowana jest przez *B. subtilis* i jej obecność w roztworze w stężeniu 0,005%, powoduje spadek napięcia powierzchniowego z 72 mN/m (wartość charakterystyczna dla granicy woda/ powietrze) do wartości 27,9 mN/m (6). Wysokocząsteczkowe polimery są zazwyczaj efektywnymi emulgatorami i stanowią kompleksy lipidowo-białkowe, lipidowo-wielocu-



Rys. Struktury chemiczne wybranych drobnoustrojowych surfaktantów (2).

A – soforolipid (*Torulopsis bombicola*); B – cykliczny lipopeptyd [surfaktyna] (*Bacillus subtilis*); C – surfaktant złożony [emulsan] (*Acinetobacter calcoaceticus*).

krowo-białkowe lub inne. Masa tych związków może dochodzić do 1×10^6 . Do często badanych i stosowanych emulgatorów należy emulsan RAG-1, wytwarzany przez *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 czy mannoproteina, wchodząca w skład zewnętrznych osłon komórkowych *Saccharomyces cerevisiae* (7,8). Zdolność do produkcji biosurfaktantów przez mikroskopowe grzyby strzępkowe została dotąd opisana jedynie dla *Penicillium spiculisorum*, wydzielającego surfaktanty z grupy kwasów tłuszczowych, (9) oraz u *Curvularia lunata* (szczep wyjściowy 2901 oraz szczepy pochodne) produkującego wysokocząsteczkowy, białkowo-cukrowy emulgator (10,11).

3. Dynamika wytwarzania biosurfaktantów

Przebieg syntezy biosurfaktantów jest w różny sposób związany z dynamiką wzrostu populacji drobnoustrojów. Produkcja związków powierzchniowo czynnych może odbywać się podczas intensywnego wzrostu hodowli. W ten sposób wytwarzana jest glikoproteina AP-6 przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (12) lub bioldwuspersan w hodowli *Bacillus* sp. (13). Surfaktanty często są produkowane po osiągnięciu przez populację fazy stacjonarnej, w warunkach, w których wzrost komórek jest ograniczony zbyt niską zawartością azotu i żelaza. Taki przebieg syntezy opisano m.in. dla surfaktanta *Torulopsis apicola* oraz emulgatora wytwarzanego przez *Candida tropicalis* (14). Opisano także produkcję biosurfaktantów przez immobilizowane w żelach, nierosnące komórki. W procesie takim źródło węgla w podłożu jest w całości zużywane na syntezę związku czynnego powierzchniowo. Stosowanie komórek unieruchomionych istotnie redukuje koszt produkcji surfaktantów, głównie poprzez obniżenie kosztów wydzielenia produktu (2).

4. Czynniki wpływające na produkcję biosurfaktantów

Budowa chemiczna biosurfaktantów, ich właściwości fizyczne i przebieg biosyntezy jest uwarunkowana genetycznie, niemniej jednak można wpływać na wielkość produkcji, a nawet modyfikować strukturę surfaktantów poprzez zmiany składu podłoża wzrostowego i warunków hodowli. Wykazano, że największe znaczenie dla produkcji tych związków ma rodzaj źródła węgla i azotu w podłożu wzrostowym. Liczne surfaktanty wytwarzane są podczas utylizacji hydrofobowych substratów odżywczych, np. n-alkanów (4,15). Znane są także drobnoustroje produkujące związki powierzchniowo czynne podczas wzrostu w podłożach z hydrofilowym źródłem węgla, np. glukozą, etanolem, glicerolem. Bardzo często proces hodowli drobnoustroju prowadzony jest z użyciem glukozy jako podstawowego źródła węgla, a dodatek niepolarnego związku stymuluje wydzielanie surfaktanta (16,17). Opisano produkcję, w której bakterie *Corynebacterium lepus* wytwarzały biosurfaktant rosnąc w podłożu z glukozą, jednakże dopiero dodatek heksadekanu powodował oddzielenie się surfaktanta od powierzchni komórek (18).

Rodzaj źródła azotu w podłożu odżywczym także oddziałuje na przebieg syntezy związków powierzchniowo czynnych. Częstym zjawiskiem jest wzrost produkcji surfaktantów w warunkach ograniczonej zawartości azotu. Niekiedy obecność określonych aminokwasów może wpływać na budowę, a tym samym na aktywność powierzchniową surfaktantów (zwłaszcza z grupy lipopeptydów). Inne czynniki hodowlane m. in. obecność soli mineralnych, odczyn środowiska, temperatura, dostępność tlenu mają wpływ na przebieg syntezy surfaktantów głównie poprzez oddziaływanie na wzrost i aktywność komórek (2,19).

5. Molekularne podstawy syntezy biosurfaktantów

Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za syntezę surfaktantów zostały dotąd poznane dla kilku lipopeptydów wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Bacillus*, ramnolipidu *Pseudomonas aeruginosa*, oraz wysokocząsteczkowego emulsanu, produkowanego przez *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (20).

U lipopeptydowych surfaktantów – surfaktyny i lichenizyny część peptydowa syntezowana jest poza rybosomami, przez wieloenzymatyczny kompleks syntetazy peptydowej. Geny odpowiedzialne za produkcję części peptydowej tych surfaktantów tworzą operony o wielkości ponad 25 kb. Do syntezy aktywnych związków wymagane są także dodatkowe geny. Dotąd nie scharakteryzowano od strony genetycznej acyltransferazy, enzymu łączącego resztę kwasu tłuszczowego z częścią peptydową surfaktanta. Wykazano, że indukcja oraz hamowanie syntezy tych lipopeptydów zależy od obecności związków służących komórkom do wzajemnego komunikowania się i informowania o wielkości populacji. System ten opisywany jako *quorum sensing* opiera się na wydzielaniu niskocząsteczkowych związków umożliwiających zarówno reagowanie komórek na zmiany gęstości populacji oraz kontrolowanie odczytu wybranych genów (21-23).

Za syntezę ramnolipidów u *P. aeruginosa* odpowiadają geny, które w większości tworzą operon *rhlAB*. Wyniki przeprowadzonych dotąd badań wskazują, że szlak syntezy kwasu tłuszczowego, wchodzącego w skład surfaktanta jest niezależny od syntezy pozostałych kwasów tłuszczowych w komórce. Produkcja ramnolipidów rozpoczyna się w fazie stacjonarnej i pozostaje pod kontrolą związków zaangażowanych w tzw. *quorum sensing* (24,25).

W porównaniu do niskocząsteczkowych surfaktantów synteza złożonych emulgatorów wymaga zaangażowania większej liczby genów. Do najlepiej poznanych od strony molekularnej emulgatorów należy emulsan RAG-1. Związek ten zawiera część wielocukrową, reszty kwasów tłuszczowych, a także niekowalencyjnie połączone białko. Emulsan podczas intensywnego wzrostu hodowli pozostaje na powierzchni komórek *A. calcoaceticus* w postaci mikrootoczek. Uwolnienie aktywnego emulgatora do podłoża hodowlanego odbywa się w fazie stacjonarnej. Dotąd ustalono budowę genu kodującego syntezę esterazy, enzymu odpowiedzialnego za oddzielenie się emulsanu od powierzchni komórek. Genetyczna analiza mutantów wytwarzających emulsan o obniżonej aktywności emulgacyjnej pozwoliła bliżej scharakteryzować lipazę biorącą udział w syntezie tego surfaktanta (20,26).

Poznanie molekularnych mechanizmów syntezy surfaktantów ma istotne znaczenie dla pogłębienia wiedzy w tej dziedzinie. Badania te mogą w istotny sposób przyczynić się do rozwinięcia produkcji wybranych biosurfaktantów w skali przemysłowej. Wskazywana jest przy tym możliwość genetycznej modyfikacji surfaktantów, jak też wprowadzania genów odpowiedzialnych za syntezę tych związków do komórek niechorobotwórczych, stosowanych powszechnie w biotechnologii drobnoustrojów (20).

6. Fizjologiczna rola surfaktantów

Surfaktanty wytwarzane przez drobnoustroje charakteryzują się dużą różnorodnością budowy chemicznej i właściwości fizykochemicznych. Prawdopodobnie, dlatego pełnią one różne, czasem unikatowe, a nawet przeciwstawne funkcje. Tylko w nielicznych przypadkach udało się porównać właściwości szczepów wyjściowych i mutantów, które utraciły zdolność do syntezy związków powierzchniowo czynnych (3).

Jedną z najczęściej opisywanych funkcji biosurfaktantów jest wpływ na szybkość rozkładu hydrofobowych substratów odżywczych (np. węglowodorów). Następuje to w wyniku intensyfikacji transportu związków hydrofobowych do wnętrza komórek, poprzez przyspieszenie ich desorpcji z różnych środowisk, zwiększanie pola powierzchni związków o niskiej rozpuszczalności w wodzie przez tworzenie układów micelarnych. Zdolność do syntezy surfaktantów o aktywności emulgacyjnej jest szczególnie często spotykana u drobnoustrojów wykorzystujących hydrofobowe związki odżywcze. Emulgatory odgrywają rolę w rozkładzie olejów, głównie poprzez wytwarzanie mikroemulsji w bezpośrednim sąsiedztwie komórek i wówczas proces ten jest niezależny od gęstości komórek w populacji. W obecności niskocząsteczkowych surfaktantów następuje przyłączenie cząsteczek węglowodorów do fragmentów hydrofobowych związków powierzchniowo czynnych. Proces ten zwiększa rozpuszczalność węglowodorów w wodzie oraz ich biodostępność, a w konsekwencji przyspiesza biodegradację (3,27,28).

Surfaktanty często chronią komórki przed szkodliwym działaniem niektórych czynników chemicznych i fizycznych (antybiotyki, metale ciężkie, fagocytoza, susza). Ma to duże znaczenie dla drobnoustrojów, które ze względu na wysoki stosunek powierzchni do objętości są szczególnie narażone na niekorzystne oddziaływanie środowiska zewnętrznego. Wykazano, że ramnolipid może brać udział w usuwaniu kadmu, ołowiu i cynku z gleby, a także zmniejsza toksyczność kadmu. Mechanizm tego zjawiska prawdopodobnie polega na kompleksowaniu kationów metalu oraz ograniczeniu transportu kadmu do wnętrza komórek (29-31). Emulgatory zawierające w swoim składzie część wielocukrową (np. emulsan) często są zdolne do wiązania metali ciężkich, a także chronią komórki przed toksycznym działaniem różnych substancji (32,33).

Niektóre biosurfaktanty tworzą na powierzchni drobnoustroju warstwę, która wpływa na właściwości hydrofobowe komórek. Obecność surfaktantów może tym samym ułatwiać oddzielanie się komórek od powierzchni lub przeciwnie, zwiększać stopień ich przylegania. Regulacja stopnia przylegania komórek do różnych powierzchni ma istotne znaczenie w utrzymywaniu się drobnoustrojów w niszach ekologicznych sprzyjających rozwojowi (3). Wykazano istnienie zjawiska polegającego na przekazywaniu wysokocząsteczkowych emulgatorów z komórek producentów na powierzchnię innych drobnoustrojów. Może to wskazywać na udział surfaktantów w komunikowaniu się bakterii, tworzeniu wspólnych, mieszanych populacji oraz formowaniu warstw o charakterze biofilmów (34,35).

U drobnoustrojów chorobotwórczych surfaktanty, o ile stanowią jeden z czynników wirulencji, produkowane są w populacji o wysokiej gęstości komórek, na tyle dużej, aby spowodować zlokalizowany atak na organizm gospodarza. Surfaktanty lipopeptydowe, których produkcja została opisana niemal u wszystkich gatunków *Bacillus* wytwarzane są podczas sporulacji. Dlatego wysuwane jest przypuszczenie, że surfaktanty tej grupy biorą udział w procesie wytwarzania i dojrzewania przetrwalników (36).

7. Praktyczne zastosowanie biosurfaktantów

Praktyczne zastosowanie biosurfaktantów związane jest głównie z wydobywaniem, transportem ropy naftowej i olejów przemysłowych, a także usuwaniem z wody i gleby zanieczyszczeń zawierających ten surowiec lub jego pochodne. Potwierdzono możliwość użycia surfaktantów jako środków ułatwiających czyszczenie przemysłowych zbiorników magazynujących ropę naftową oraz do zwiększania szybkości przepływu związków olejowych w rurociągach (37,38).

Zdolność wielu surfaktantów do wiązania metali ciężkich oraz rozpuszczania (a tym samym zwiększania biodostępności) związków ropopochodnych może być wykorzystana do opracowania nowoczesnych metod bioremediacji środowiska naturalnego. Wykazano, że alasan produkowany przez *Acinetobacter radioresistens* zwiększa rozpuszczalność fanantrenu i w konsekwencji skraca czas biologicznego rozkładu tego związku. Wysokocząsteczkowe surfaktanty, jako efektywne emulgatory mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym oraz jako składniki niektórych kosmetyków (37,39). Drożdże: *Candida apicola* oraz *Candida bombicola* wytwarzają soforolipidy o silnym powinowactwie do skóry i właściwościach nawilżających. Opracowano metody hodowli pozwalające uzyskać nawet do 300 g soforolipidów z litra podłoża hodowlanego. Soforolipidy dodawane są do środków pielęgnacji skóry i włosów w kosmetykach o nazwie Sofina, produkowanych przez japońską firmę Kao Chemical Corporation (2,16).

W rolnictwie surfaktanty mogą służyć do zwiększania właściwości hydrofilowych gleby, a także jako dodatek do nawozów sztucznych i pestycydów. Stwierdzono, że glikopeptydy produkowane przez *Bacillus* sp. powodują wzrost rozpuszczalności hydrofobowych środków ochrony roślin oraz zwiększają przyswajalność nawozów sztucznych (5).

Surfaktanty o charakterze emulgatorów, podobnie jak niektóre zewnątrzkomórkowe wielocukry drobnoustrojowe, mogą być stosowane podczas produkcji papieru, tkanin i wyrobów ceramicznych. Ich obecność ułatwia usuwanie wody i zagęszczanie otrzymywanego produktu (4,37,40).

8. Podsumowanie

Drobnoustrojowe biosurfaktanty stanowią bardzo zróżnicowaną, pod względem budowy i właściwości fizycznych grupę związków. Dlatego mogą one znaleźć zastosowanie praktyczne w wielu gałęziach przemysłu, jako składniki produktów lub czynniki wpływające na przebieg różnorodnych procesów. Badania laboratoryjne wskazują na możliwość użycia biosurfaktantów w procesach bioremediacji środowiska naturalnego, np. podczas usuwania ropy naftowej z powierzchni mórz i plaż. Przeszkodą w powszechnym stosowaniu biosurfaktantów jest przede wszystkim około 10-krotnie wyższy koszt produkcji niż syntetycznych odpowiedników. Na wysoką cenę biosurfaktantów składają się przede wszystkim koszty podłoży oraz nieekonomiczne metody oddzielania i oczyszczania produktu. Wiele obecnie prowadzonych prac zmierza do zwiększenia powszechności stosowania biosurfaktantów. Obecne badania skupiają się m. in. na pozyskiwaniu i ulepszaniu szczepów zdolnych do syntezy surfaktantów, ograniczaniu kosztów produkcji, w tym ceny podłoży i kosztów wydzielenia produktu oraz na opracowaniu metod wykorzystania produktów ubocznych oraz biomasy drobnoustrojów (4,14,36).

Literatura

1. Stauffer C. E., (2001), *Emulgatory*, WNT, Warszawa, 11-34.
2. Desai J. D., Banat I. M., (1997), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 47-64.
3. Ron E. Z., Rosenberg E., (2001), *Environmen. Microbiol.*, 3, 229-236.
4. Makkar R. S., Cameotra S. S., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 428-434.
5. Rosenberg E., Ron E. Z., (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 154-162.
6. Wei Y. H., Chu I. M., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 724-728.
7. Rosenberg E., Ron E. Z., (1997), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 313-316.
8. Cameron D. R., Copper D. G., Neufeld R. J., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1420-1425.
9. Mulligan N., Yong R. N., Gibbs B. F., (2001), *Engineering Geology*, 60, 371-380.
10. Kanwal A., Paraszkiwicz K., Długoński J., (2001), *Microbios*, 104, 27-38.
11. Paraszkiwicz K., Kanwal A., Długoński J., (2002), *J. Biotechnol.*, 92, 287-294.
12. Person A., Oesterberg E., Dostalek M., (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 1-4.
13. Cooper D. G., Goldenberg B. G., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 224-229.
14. Singh M., Saini V., Adhikari D. K., Desai J. D., I Sista V. R., (1990), *Biotechnol. Lett.*, 12, 743-746.
15. Cameotra S. S., Makkar R. S., (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 520-529.
16. Davila A. M., Marchal R., Vandecasteele J. P., (1997), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 496-501.
17. Robert M., Mercade M. E., Bosch M. P., Parra J. L., Espuny M. J., Manresa M. A., Guinea J., (1989), *Biotechnol. Lett.*, 11, 871-874.
18. Duvnjak Z., Kosaric N., (1985), *Biotechnol. Lett.*, 7, 793-796.
19. Guerra-Santos L. H., Kappeli O., Flechter A., (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 443-448.
20. Sullivan E. R., (1998), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 263-269.
21. Marahiel M. A., (1997), *Chem. Biol. Chem.*, 4, 561-567.
22. Peypoux F., Bonmatin J. M., Wallach J., (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 553-563.
23. Yakimov M. M., Abraham W. R., Meyer H., Laura G., Golyshtin P. N., (1999), *Biochim. Biophys. Acta*, 1438, 273-280.
24. Campos-Garcia J., Caro A. D., Najera R., Miller-Maier R. M., Al-Tahhan R. A., Soberon-Chavez G., (1988), *J. Bacteriol.*, 180, 4442-4451.

25. Pearson J. P., Pesci E. C., Iglewski B. H., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 5756-5767.
26. Alon R. N., Gutnick D. L., (1993), *Microbiol. Lett.*, 112, 275-280.
27. Hommel R. K., (1990), *Biodegradation*, 1, 107-119.
28. Bognolo G., (1999), *Appl. Physicochemic. Engineering Aspects*, 152, 41-52.
29. Herman D. C., Artiola J. F., Miller R. M., (1995), *Environm. Sci. Technol.*, 29, 2280-2285.
30. Gutnick D. L., Bach H., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 451-460.
31. Volesky B., (2001), *Appl. Hydrometallurgy*, 59, 203-216.
32. Shabtai Y., Gutnick D., (1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 192-197.
33. Zosim Z., Gutnick D., Rosenberg E., (1983), *Biotech. Bioeng.*, 25, 1725-1735.
34. Marin M., Pedregosa A., Laborda F., (1996), *App. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 660-667.
35. Zhang Y., Miller R. M., (1994), *App. Environ. Microbiol.*, 60, 2101-2106.
36. Grossman A. D., (1995), *Ann. Rev. Genet.*, 29, 477-508.
37. Banat I. M., Makkar R. S., Cameotra S. S., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 495-508.
38. Riis V., Brandt M., Miethé D., Babel W., (2000), *Appl. Chemosphere*, 41, 1001-1006.
39. Shepherd R., Rockey J., Sutherland I. W., Roller S., (1995), *J. Biotechnol.*, 40, 207-217.
40. Pellerin N. B., Staley J. T., Ren T., Gratf G. L., Treadwell D. R., Aksay I. A., (1991), *Mater. Res. Soc. Sym. Proc.*, 218, 123-128.