



УДК 542.06;615.331

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ОБНАРУЖЕНИЮ И КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ СУРФАКТИНА

© 2025 г. В. С. Трефилов*, Е. Ю. Линдин*, М. В. Монахова**, О. В. Кисиль***,
М. Б. Вирясов**, Т. С. Орецкая**, #, Е. А. Кубарева**

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

** Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

*** Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе,
Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11

Поступила в редакцию 08.11.2024 г.

После доработки 20.11.2024 г.

Принята к публикации 22.11.2024 г.

Микроорганизмы способны продуцировать широкий круг биологических поверхностно-активных веществ (биоПАВ). Высокий потенциал применения биоПАВ в различных сферах жизни человека обуславливает необходимость разработки и совершенствования методов поиска штаммов-продуцентов, определения содержания биоПАВ в различных природных образцах, а также их выделения и очистки. В данном обзоре рассмотрены структура, свойства и методы синтеза сурфактина – одного из наиболее интересных представителей класса липопептидов, относящихся к биоПАВ; систематизирована информация об инструментальных подходах к обнаружению и определению сурфактина в культуральной жидкости бактерий; обсуждены их доступность, чувствительность, селективность и общая эффективность.

Ключевые слова: биологические поверхностно-активные вещества, сурфактин, *Bacillus spp.*

DOI: 10.31857/S0132342325020016, **EDN:** LDBFYT

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	164
2. СУРФАКТИН И ЕГО АНАЛОГИ	165
2.1. Структура сурфактина	165
2.2. Свойства сурфактина и его применение	166
2.3. Способы получения сурфактина и его производных	167
3. ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУРФАКТИНА	170
3.1. Тонкослойная хроматография (ТСХ)	171
3.1.1. Традиционная ТСХ	171
3.1.2. Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)	172
3.2. ВЭЖХ и ТСХ – возможности и преимущества	173
3.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	174

Сокращения: НАТУ – гексафторфосфат азабензотриазол тетраметилмочевина; Sur – сурфактин; FTIR – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье; биоПАВ – биологические поверхностно-активные вещества; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография; ККМ – критическая концентрация мицеллообразования; ТСХ – тонкослойная хроматография.

Автор для связи: (тел.: +7 (916) 206-41-02; эл. почта: oretskaya@belozersky.msu.ru).

3.4. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье	178
3.5. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)	179
3.6. Масс-спектрометрия	180
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	182
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	182

1. ВВЕДЕНИЕ

Биологические поверхностно-активные вещества (биоПАВ), представляют собой главным образом низкомолекулярные вещества природного происхождения. Они продуцируются широким спектром микроорганизмов: бактериями (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Rhodococcus ruber* и др.), грибами (*Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. и др.), включая дрожжевые грибы (*Candida* spp. и *Saccharomyces cerevisiae* и др.) и водорослями *Dunaliella salina*, при этом бактерии выступают преобладающим биоПАВ-синтезирующим классом [1]. Исходя из особенностей строения биосурфактантов, их принято разделять на несколько групп: липопептиды, липопротеины, гликолипиды, жирные кислоты, нейтрально заряженные липиды и фосфолипиды. Также известно небольшое количество высокомолекулярных биоПАВ – эмульсан, липосан и биодисперсан [2].

Благодаря своему происхождению, биоПАВ обладают рядом потенциально полезных свойств, отсутствующих у синтетических ПАВ: они биоразлагаемы и биосовместимы, обладают меньшей токсичностью по отношению к живым организмам и меньшим раздражающим действием на кожу человека, а также могут быть получены из дешевого сельскохозяйственного сырья [3]. В последние годы активно ведутся работы по их внедрению в различные отрасли производства, такие как сельское хозяйство, нефтепереработка, фармацевтическая, пищевая и косметическая отрасли промышленности [1]. Однако биоПАВ все еще слабо интегрированы в промышленность ввиду высокой конечной стоимости, обусловленной низкой эффективностью их синтеза и сложностью очистки [4–6]. Тем не менее интерес к данным соединениям в научных кругах довольно велик [7–10].

Наиболее широко изученный класс биоПАВ – гликолипиды и липопептиды [11]. В данном обзоре в качестве предмета исследования были выбраны липопептиды, обладающие наиболее вы-

сокой поверхностной активностью и большим потенциалом использования в косметологии и фармацевтике [12]. В свою очередь, из всех липопептидов мы решили остановиться на сурфактине (Sur), одним из самых изучаемых на сегодняшний день биоПАВ, который впервые был выделен из культуральной жидкости бактерий *Bacillus subtilis* в 1968 г. [13]. Sur играет роль сигнальной молекулы в метаболизме клетки. Он участвует в активации системы “чувства кворума” (“quorum sensing”), что позволяет бактериальным клеткам дифференцироваться в различные субпопуляции, такие как каннибалы, споры, подвижные (“motile”) и матрикс-продуцирующие клетки [14].

По данным PubMed, более трети всех статей, опубликованных за последние 3 года и относящихся к теме биоПАВ, так или иначе связаны с Sur (137 из 408 за 2022 г., 137 из 346 за 2023 г. и 147 из 348 за 2024 г.). Кроме экспериментальных работ, в свободном доступе размещено ~25 обзорных статей, посвященных только Sur, а также обсуждающих его наряду с другими биоПАВ, в которых достаточно подробно описаны методы синтеза Sur, особенности его строения, физико-химические свойства, возможности применения в промышленности и др. [6, 15–43]. Однако ни в одном из существующих на сегодняшний день обзоров достаточно полно и подробно не рассмотрены способы идентификации и количественного определения ни конкретно Sur, ни биоПАВ в целом. Между тем задача качественного и количественного определения биоПАВ в различных образцах (чаще всего в культуральных жидкостях бактерий) достаточно актуальна и важна для фундаментальной науки и в прикладных аспектах.

В данном обзоре представлены систематизация и анализ имеющихся инструментальных методов определения Sur как представителя класса липопептидов и биоПАВ в целом. Также проведена сравнительная характеристика вошедших в обзор методов по таким параметрам, как точность,

специфичность, чувствительность, скорость и техническая сложность. Представленный материал облегчит выбор оптимальных способов определения и обнаружения Sur для конкретных исследовательских и практических задач и послужит основой для разработки новых, более совершенных методов анализа биоПАВ. Данный обзор не претендует на всестороннее изложение материала: во-первых, были рассмотрены только инструментальные подходы; во-вторых, авторы опустили подробное описание теоретических основ методов и сконцентрировались на конкретных задачах, решаемых с их помощью.

2. СУРФАКТИН И ЕГО АНАЛОГИ

2.1. Структура сурфактина

БиоПАВ представляют собой молекулы с достаточно сложной структурой, которые, как и в обычных синтетических ПАВ, можно условно разделить на гидрофильную и гидрофобную части

(“голову” и “хвост” соответственно). Sur, один из типичных представителей класса липопептидов, имеет в своем составе циклический гептапептидный фрагмент ($^1\text{Glu}_1\text{--}^1\text{Leu}_2\text{--}^{\text{D}}\text{Leu}_3\text{--}^1\text{Val}_4\text{--}^1\text{Asp}_5\text{--}^{\text{D}}\text{Leu}_6\text{--}^1\text{Leu}_7$) и остаток β -гидроксиалифатической кислоты ($\text{C}_{14}\text{--}\text{C}_{15}$) (рис. 1а). В отличие от обычных ПАВ, молекулу Sur довольно сложно строго разделить на “голову” и “хвост”. К гидрофильной части молекулы относятся отрицательно заряженные боковые группы остатков Asp и Glu и амидные группы, соединяющие аминокислотные остатки между собой в циклическом гептапептидном фрагменте, а к гидрофобной части – неполярные боковые группы остатков Leu, Ile и Val вместе с углеводородной цепью остатка жирной кислоты [16]. Именно поэтому в растворе Sur принимает креслоподобную конформацию, в которой составляющие гидрофобной и гидрофильной частей, разделенные во вторичной структуре, оказываются сближенными в пространстве (рис. 1б) [44].

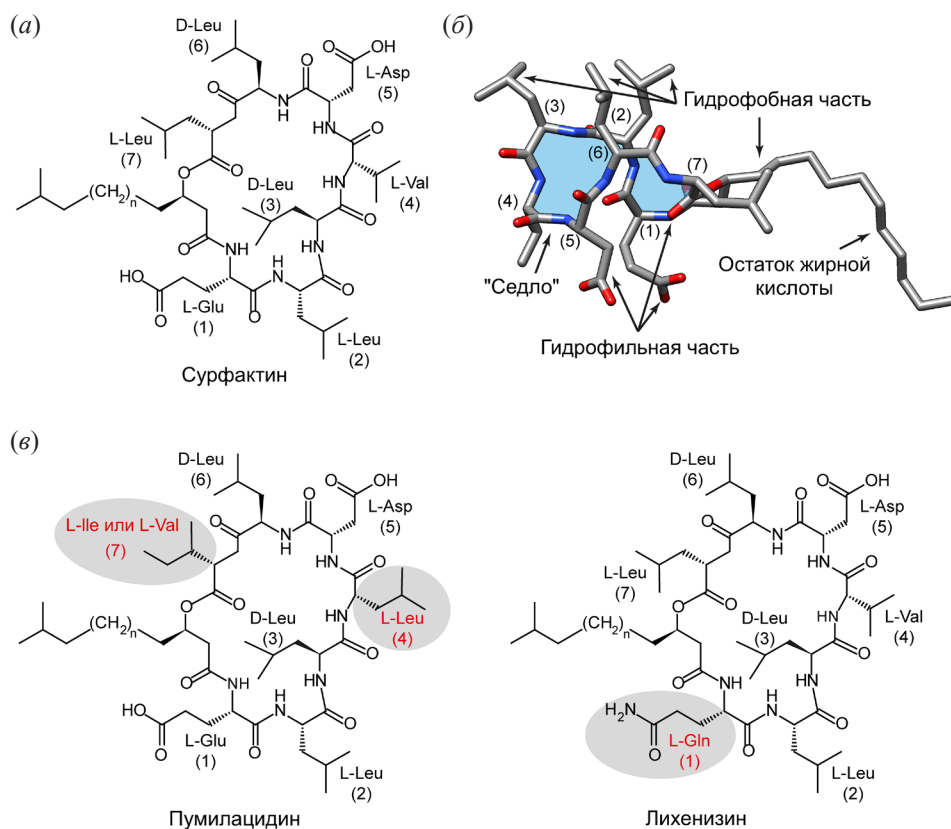


Рис. 1. Строение сурфактина и его аналогов. В каждой панели нумерация аминокислот дана в скобках; $n = 4\text{--}9$. (а) – Строение сурфактина; (б) – пространственная организация сурфактина в конформации “седло”. Структура сурфактина C_{14} , $n = 6$ (PDB: 2NPV). Красным цветом обозначены атомы кислорода, синим – пептидная связь; голубая заливка иллюстрирует конформацию “седло”. Стрелками указано пространственное расположение важных функциональных участков: гидрофобной и гидрофильной частей молекулы, остаток жирной кислоты; (в) – строение пумилацидина и лихенизина. Аминокислоты, отличающиеся от таковых в сурфактине, отмечены красным.

Sur – один из самых эффективных не только среди ПАВ биологического происхождения, но и среди синтетических представителей. Поверхностное натяжение водного раствора Sur с концентрацией 10 мкМ, что примерно равно его критической концентрации мицеллообразования (ККМ), составляет 30 мН/м (против 73 мН/м для чистой воды) [45]. Для получения водного раствора додецилсульфата натрия, наиболее широко используемого синтетического ПАВ, с таким же значением поверхностного натяжения необходимо создать на ~3 порядка большую концентрацию [46].

Sur обладает значительной природной гетерогенностью химической структуры. Соединения пумилацин и лихенизин, продуцируемые, как и Sur, бактериями рода *Bacillus*, – это его изоформы. Они имеют в положении 4 пептидного фрагмента Leu вместо Val, в положении 7–Ile/Val вместо Leu в пумилацине и Gln вместо Glu в лихенизине соответственно (рис. 1б) [6]. Также в литературе описаны линейный (ациклический) и метилированный по остатку Glu природные варианты Sur. Первый обладает меньшими гемолитической и противоопухолевой активностями, а второй, за счет уменьшения суммарного отрицательного заряда молекулы, проявляет большую поверхностную активность, однако его противоопухолевая активность при этом уменьшается [47, 48]. Вариативной выступает и длина остатка β-гидроксигирной кислоты – известны изоформы C₁₂–C₁₇, но подавляющее большинство представляют варианты C₁₄–C₁₅. Также известны *n*-, *изо*- и *антеизо*- формы углеродной цепи [49]. Показано, что среди наиболее распространенных изоформ Sur с различной длиной углеродного “хвоста” наибольшей противоопухолевой и противовирусной активностью обладает C₁₅-сурфактин [50, 51].

2.2. Свойства сурфактина и его применение

Sur обладает рядом свойств, обеспечивающих высокий потенциал его практического применения в различных отраслях промышленности. За счет высокой поверхностной активности он может быть использован для более полного извлечения нефти из горных пород и промывных вод, очистки почв и водоемов от нефти и тяжелых металлов, при этом его биоразлагаемость уменьшает неже-

лательную экологическую нагрузку [18]. На сегодняшний день показан высокий потенциал использования биоПАВ в процессе очистки воды [52].

Sur обладает антибактериальными и противовирусными свойствами. Первые основаны на его способности образовывать поры в мембране бактерий, что, в свою очередь, вызывает отток питательных веществ и гибель бактериальной клетки [16]; механизм вторых на данный момент не установлен. Однако обе эти активности позволяют применять Sur в сельском хозяйстве для защиты корней и семян растений от вредителей [16]. Наиболее востребован Sur в косметологии и косметической индустрии. На 2022 г. около половины патентов (80 из 160), связанных с использованием биоПАВ в составе косметических средств (шампуней, в том числе для животных, кремов и средств против морщин), относятся к Sur [53–55]. По утверждению авторов, он предотвращает старение кожи, обладает антиоксидантными и заживляющими свойствами [56]. Косметические препараты, содержащие Sur вместо синтетических ПАВ, меньше раздражают кожу головы и рук, что говорит о высокой степени его биосовместимости [25]. Также известно использование биоПАВ в пищевой промышленности в качестве консервантов [57].

Sur, выступая мицеллообразующим биоПАВ с низкой ККМ, может быть использован для адресной доставки лекарств, что, наряду с его противоопухолевой и противовоспалительной активностями, обуславливает большой интерес к нему со стороны фармацевтических предприятий. Sur входит в состав препаратов для лечения ринитов и синуситов [58, 59].

При добавлении к крови животных и человека растворов Sur стенки эритроцитов разрушаются, что ведет к их лизису. Это характеризует Sur как потенциальное антикоагулянтное средство, например, для профилактики тромбозов и для предотвращения таких болезней, как инфаркт миокарда и легочная эмболия [60, 61, 62]. Однако гемолитическая активность – одно из основных препятствий для применения Sur в фармацевтической отрасли. Терапевтические концентрации Sur в крови опасны для человека из-за гемолиза. Проводятся многочисленные исследования по поиску изоформ с меньшей гемолитической активностью [50, 62, 63].

Главная проблема использования синтетических ПАВ – опасность загрязнения ими окружающей среды, при этом наибольшему риску подвержены объекты гидросферы и их обитатели, для которых синтетические ПАВ могут быть ядовиты [64]. Ежегодно увеличивающийся объем их производства ведет к параллельному развитию экологической проблемы загрязнения ПАВ природных объектов [65]. БиоПАВ, за счет интегрированности в биосферу, имеют естественных “антагонистов” (зачастую бактериального происхождения), способных за счет гидролизующих их ферментов регулировать содержание этих соединений в воде и почве [66]. Для Sur один из таких “антагонистов” – стрептомицеты, обитающие в почве и верхних слоях морской воды. Было показано, что штамм *Streptomyces* sp. Mgl содержит ген *sfhA*, кодирующий белок, отвечающий за гидролиз молекулы Sur, что обеспечивает устойчивость этих клеток к Sur как к антибактериальному агенту [67]. Таким образом, наличие природных бактериальных штаммов, способных разрушать молекулы Sur, делает его использование в промышленности экологически более целесообразным, чем синтетических ПАВ.

Несмотря на значительный потенциал практического применения, биосовместимость и биоразлагаемость, повсеместное использование Sur сильно ограничено из-за высокой стоимости его производства.

2.3. Способы получения сурфактина и его производных

Известны производные Sur, полученные в результате его химической модификации, а именно метилирования, амидирования и аминотансульфирования ($-\text{COOH}$ -группа превращается в $-\text{CONHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$) β - и γ -карбоксильных групп остатков Asp и Glu [68, 69]. Показано, что метилирование и амидирование приводит к увеличению поверхностной активности Sur, в то время как аминотансульфирование, наоборот, к заметному его падению. Скорее всего, это связано с изменением суммарного заряда молекулы, однако более конкретное объяснение этому явлению дать трудно.

Sur и ряд его производных (как циклических, так и ациклических) были получены с помощью твердофазного пептидного синтеза [47, 70]. Хи-

мический синтез Sur, хотя и возможный в лабораторных условиях, из-за сложности и многостадийности не может быть реализован в промышленных масштабах [6, 47, 70, 71]. Схема получения Sur и его аналогов подробно описана в работе [70]. Синтез включал пять стадий и осуществлялся на твердой фазе. Первая стадия представляет собой синтез полипептидов, которые получали последовательным присоединением аминокислот в присутствии активатора карбоксильной группы HATU и диизопропилэтиламина (эффективность реакций достигала 100%). В дальнейшем к полученному пептиду с высокой эффективностью присоединялась 3-гидроксигирная кислота. Следующая стадия – этерификация 3-гидроксильной группы кислоты карбоксильной группой Leu, которая проходит с достаточно низким выходом целевого продукта (~25%). После удаления полученного продукта с твердофазного носителя следует стадия циклизации. Выход конечного продукта составляет 4–22% в зависимости от состава соединения.

Изучение свойств полученных веществ показало, что циклический Sur и формы с большей длиной углеводородной цепи обладают гораздо большей поверхностной активностью, чем ациклический и формы с меньшей длиной цепи соответственно. В случае ациклического варианта Sur уменьшение заряда молекулы приводит к уменьшению, а не к увеличению (как это было для циклического варианта) его поверхностной активности. Вероятно, это связано с сильным различием двух- и трехмерной структур циклического и ациклического Sur [71].

Наконец, относительно недавно был разработан метод направленного генно-инженерного редактирования системы нерибосомального пептидного синтеза, позволяющий переключать биосинтетический аппарат клетки на производство изоформы практически любой структуры (замена, эпимеризация, вставка и удаление аминокислотных остатков, линеаризация кольцевого фрагмента, уменьшение вариативности длины углеводородной цепи). Однако для некоторых изоформ значительно падает эффективность их биосинтеза клетками-продуцентами. Выход конечного продукта варьируется от 32 до 99% в зависимости от структуры изоформы [72].

Основной способ получения Sur – микробиологический синтез. Наиболее изученные бактерии, способные продуцировать Sur, – это бактерии вида *B. subtilis*. Известно большое количество штаммов данного вида, синтезирующих Sur [73–75], однако для данных бактерий выход целевого Sur не превышает 0.5 г на 1 л культуральной жидкости (далее обозначается г/л) [76, 77]. Разумеется, известны и исключения. Описаны природные штаммы *B. subtilis* IB-17 и TNY-15, не подвергавшиеся генно-инженерным модификациям, выход Sur для которых составляет 1.8 и 1.24 г/л соответственно [78, 79]. Но и такие показатели выхода слишком малы для эффективного и конкурентноспособного крупномасштабного производства. При использовании имеющихся на данный момент способов выделения, очистки и микробиологического синтеза Sur, его примерная стоимость может достигать 1000 долларов США за килограмм [31], что на порядок больше стоимости синтетических ПАВ, например, додецилсульфата натрия. Поэтому разработка подходов по уменьшению конечной стоимости Sur – актуальная задача современной биотехнологии.

Существует несколько способов уменьшения производственных затрат при получении Sur. Предлагалось заменить питательную среду, обычно используемую для роста бактериальных клеток и составляющую 30–50% от конечной стоимости Sur, на отходы агропромышленного комплекса [31]. Изучено применение такого сырья, как растительные масла, кожура картофеля и яблок, отходы производства крахмала и глицерина [80–82]. Также необходимо решить проблему низкой эффективности биосинтеза Sur запатентованными штаммами-продуцентами. Один из подходов – подбор оптимальных условий их культивирования [83–85]. В работе [84], одной из самых исчерпывающих в этой области, варьировались такие параметры роста сурфактин-продуцирующих клеток *B. subtilis* BS5, как время роста, степень аэрации и температура клеточной суспензии, начальный pH питательной среды и отношение объема инокулируемой клеточной суспензии к объему конечной суспензии (“inoculum size”). Был подобран оптимальный состав питательной среды, а именно выбраны источники углерода и азота, обеспечивающие наибольший выход конечного соединения. В итоге авторам удалось добиться трехкратного увеличения вы-

хода Sur, который составил 1.12 г/л. Стоит, однако, отметить, что публикация не содержит подтверждение качественного или количественного состава синтезируемого клетками соединения, которое сами авторы называют “crude surfactin”.

Кроме того, эффективность биосинтеза Sur можно повысить путем добавления в культуральную среду индукторов, которые либо непосредственно инициируют или стимулируют биогенез соединения (гидрофильные индукторы), либо выполняют роль вторичного источника углерода (гидрофобные индукторы). Гидрофильные индукторы Sur в основном представлены ионами двухвалентных металлов (например, Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}), в то время как в качестве гидрофобных индукторов для биосурфактантов в целом используют различные насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты в индивидуальном виде и в составе природных масел. К сожалению, полного понимания того, какие соединения стимулируют конкретно биосинтез Sur, на сегодняшний день нет [86]. В единственной найденной по этой тематике работе было проанализировано влияние трех вторичных источников углерода – соевого масла, пальмитиновой и олеиновой кислот – в различных концентрациях (1, 2, 5 и 10%, масса к объему) на эффективность биосинтеза Sur. Оказалось, что добавление только пальмитиновой кислоты в концентрации 5% приводит к увеличению выхода конечного соединения; остальные вещества либо не давали эффекта, либо приводили к уменьшению выхода [87].

Помимо описанных методов повышения эффективности биосинтеза Sur, для этой цели можно использовать аппарат генной инженерии [88–90]. Из довольно большого числа методов исследователи, как правило, выбирают либо постановку под сильный промотор генов, необходимых для синтеза Sur или положительно влияющих на него, либо нокаут генов, оказывающих отрицательное влияние на биосинтез Sur [33]. За биосинтез Sur отвечает оперон *urfA* и ген *sfp*, кодирующие субъединицы мультиферментной нерибосомальной пептидной синтетазы сурфактина и белок Sfp, необходимый для активации ее работы соответственно [91, 92]. К генам, положительно влияющим на биосинтез Sur, относят гены, кодирующие активаторы транскрипции оперона *urfA*, синтетазы жирных кислот и аминокислот, входящих в

состав молекулы Sur (C_{14} – C_{15} ; Leu, Val, Ile, Asp, Glu), белки системы эффлюкса, отвечающие за секрецию Sur в культуральную жидкость. Напротив, к отрицательно влияющим на биосинтез Sur относят гены, кодирующие ингибиторы транскрипции оперона *surfA*, белки катаболизма используемых в биосинтезе Sur жирных кислот и аминокислот и белки, вовлеченные в процессы, синтетический аппарат которых архитектурно схож с биосинтетическим аппаратом Sur, за счет чего они конкурируют с биосинтезом Sur за внутриклеточные ресурсы [93]. Встречаются работы, в которых сразу несколько подобных генов нокаутированы или сверхэкспрессированы. Было получено 40 различных производных штамма *B. subtilis* 168, при этом для получения очередного производного проводили генетическую модификацию одного из штаммов-предшественников [89]. Итогом работы стал штамм, для которого выход Sur составил 12.8 г/л, что стало самым большим значением (при культивировании бактериальных клеток в колбах) на сегодняшний день.

Помимо вида *B. subtilis* в качестве продуцентов Sur использовали штаммы других видов рода *Bacillus*. Один из самых распространенных среди них – вид *B. amyloliquefaciens*. Природный (немодифицированный) штамм *B. amyloliquefaciens* MT45 синтезировал Sur с выходом 2.93 г/л, что является максимумом среди известных на данный момент природных продуцентов [94]. Для бактерий *B. amyloliquefaciens* также известны работы по целенаправленной стимуляции синтеза Sur. Например, для штамма *B. amyloliquefaciens* ES-2-4 использовали интересный метод случайной рекомбинации генома (genome shuffling), основанный на слиянии

инактивированных бактериальных протопластов и их последующей регенерации на чашках Петри со специальной средой (RM plates). После двух раундов случайной рекомбинации генома был получен штамм *B. amyloliquefaciens* F2-38, в котором в ~15 раз был увеличен уровень транскрипции оперона *surfA*, кодирующего сурфактинсинтетазу. Также наблюдалось увеличение выхода Sur в ~3.5 раза при культивировании клеток в колбах и в 10 раз при культивировании в биореакторе [95]. Как потенциальные продуценты Sur, рассматриваются виды *B. velezensis* и *B. licheniformis* [96, 97], однако работ, посвященных им, заметно меньше.

В табл. 1 суммированы упоминающиеся в тексте штаммы-продуценты Sur с указанием эффективности биосинтеза соединения в них.

Таким образом, процесс микробиологического синтеза Sur менее ресурсозатратный по сравнению с химическим синтезом, но требует серьезных улучшений для снижения цены конечного продукта. Так, биоПАВ класса софоролипидов, для которых налажено крупномасштабное промышленное производство, продуцируются дрожжами *Candida bombicola* с выходом >400 г/л [98], в то время как для Sur наибольший выход равен 30 г/л (при культивировании в биореакторе) [99]. Именно поэтому актуален поиск подходов к увеличению эффективности биосинтеза Sur штаммами-продуцентами до промышленно приемлемых уровней. В свою очередь, для оценки действенности того или иного подхода нужны мощные аналитические методы качественного и количественного определения Sur в культуральной жидкости бактерий.

Таблица 1. Примеры штаммов продуцентов сурфактина рода *Bacillus*

Бактериальный штамм	Выход продукции сурфактина, мг/л	Ссылка
<i>B. subtilis</i> S15	125.6	[74]
<i>B. subtilis</i> BS-37	585	[76]
<i>B. subtilis</i> 723	473.6	[77]
<i>B. subtilis</i> THY-15	1240	[78]
<i>B. subtilis</i> IB-17	1800	[79]
<i>B. subtilis</i> BS-5	1120	[84]
<i>B. subtilis</i> 168	12800	[89]
<i>B. amyloliquefaciens</i> S13	452.5	[74]
<i>B. amyloliquefaciens</i> MT45	2930	[94]
<i>B. amyloliquefaciens</i> F2-38	350	[95]
<i>B. velezensis</i> H3	488	[96]
<i>B. licheniformis</i> KGL11	391	[97]

3. ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУРФАКТИНА

Определение липопептидных биоПАВ, как и любых поверхностно-активных веществ, представляет довольно сложную аналитическую задачу из-за их поверхностно-активных свойств и наличия структурных фрагментов и функциональных групп, свойственных не только ПАВ, что не позволяет выполнить их высокоселективное определение. Практически все продуценты сурфактина (и других биоПАВ) синтезируют семейство изоформ и гомологов, отличающихся составом аминокислот пептидного фрагмента (рис. 1в) и длиной углеводородной цепи, которые очень часто подвергаются метилированию, ацилированию или гликозилированию [6]. Также многие штаммы-продуценты синтезируют несколько семейств биоПАВ, например, не только Sur, но и итурин, и фенгицин [100] (рис. 2).

Sur и другие биоПАВ определяют в сложных смесях с применением основных современных методов разделения и измерения содержания компонентов сложных смесей. Для обнаружения и количественного определения липопептидов в основном используют обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), а также высокоэффективную ТСХ (ВЭТСХ).

Критически важный этап для успешного использования этих методов – подготовка проб, которая заключается в экстракции определяемых биоПАВ из культуральных жидкостей и биологических

объектов. Сначала образец культуральной жидкости центрифугируют для осаждения клеток, впоследствии осаждают липопептиды, доводя кислотность раствора до pH 2 с помощью соляной кислоты [101]. Далее из осадка экстрагируют Sur, для этих целей применяют метанол [102], этанол [103] и дихлорметан [104].

Другой важный момент – определение количества аналита по градуировочным зависимостям с использованием стандартных образцов (метод внешнего стандарта). Здесь исследователи сталкиваются с проблемой корректности построения градуировочных зависимостей. Коммерчески доступные стандартные образцы, по которым можно построить градуировочную зависимость, представляют собой также смесь изоформ и гомологов, причем соотношение изоформ в анализируемом образце может отличаться от их соотношения в градуировочном стандартном образце. Градуировочная зависимость может быть получена с использованием ВЭЖХ [105] или же, например, по исследованию индекса эмульгирования, т.е. собственно поверхностной активности [106]. При этом определение раздельного содержания каждой из изоформ, как правило, не имеет существенного смысла. Например, Sur фирмы Sigma-Aldrich (США) представляет собой β -гидроксид- C_{15} -производное (с чистотой >98%), аналогичная изоформа сурфактина предлагается и компанией Santa Cruz Biotechnology (США) [107], причем липидный фрагмент в обоих случаях разветвлен [108]. Sur производства Focus

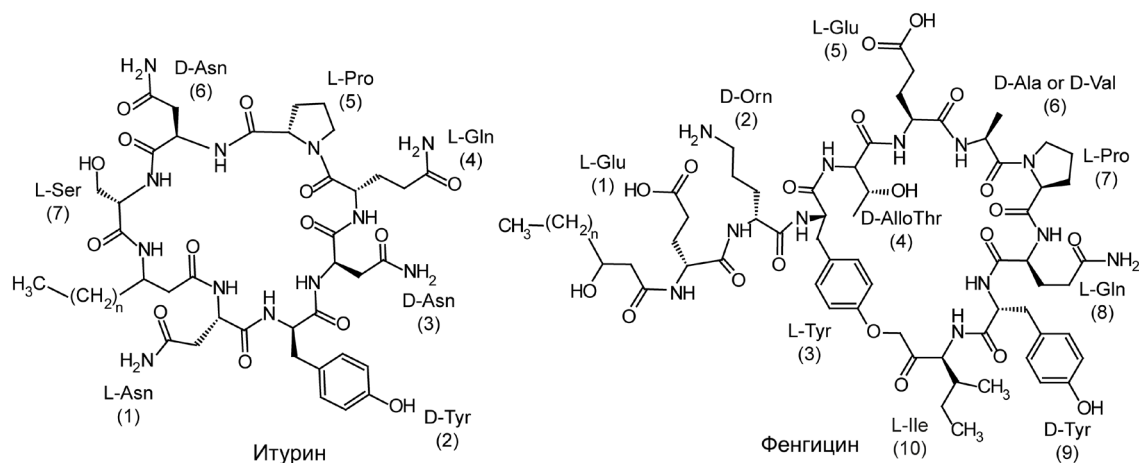


Рис. 2. Строение итурина и фенгидина. В каждой панели нумерация аминокислот дана в скобках; $n = 11-14$.

Biomolecules (США) представляет собой смесь C_{14} - и C_{15} -изоформ [109].

Для количественного определения биоПАВ используют сигнал суммы родственных изоформ каждого семейства липопептидов, т.е. вычисляют сумму площадей пиков семейства на хроматограмме ВЭЖХ или сканограмме ТСХ. Семейство состоит из очень близких по составу веществ, и чувствительность к ним любого детектора для количественных расчетов практически идентична, поэтому изменение соотношения компонентов семейства у разных образцов не влияет на правильность и точность получаемых результатов. Разумеется, погрешность определения суммы компонентов группы неизбежно будет превышать погрешность определения единственного компонента, и это надо учитывать при сравнении результатов анализа проб с сильно отличающимися наборами изоформ. Для минимизации погрешностей определения необходимо добиваться максимального разрешения при разделении компонентов семейства Sur и других липопептидов. Результат может быть достигнут при использовании ВЭЖХ и частично ВЭТСХ. Для идентификации выделенных хроматографически компонентов смеси изоформ и гомологов биоПАВ, а также комплексного изучения их структурных особенностей далее можно использовать ИК-спектроскопию с преобразованием Фурье, ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопию (1D и 2D), масс-спектрометрию в различных вариантах [110].

3.1. Тонкослойная хроматография (ТСХ)

ТСХ – более быстрый метод по сравнению с ВЭЖХ, также этот метод в классическом варианте не требует дорогостоящего оборудования. Кроме того, есть метод высокоэффективной ТСХ (ВЭТСХ), позволяющий анализировать большое количество образцов за меньшее время.

3.1.1. Традиционная ТСХ

ТСХ в одномерном варианте позволяет анализировать одновременно до 10 проб. Разделение проводят на пластинах с немодифицированным силикагелем, возможно использование силикагелевых пластин с УФ-флуоресцентным индикатором. Обращенно-фазовые разделения биоПАВ на пластинах с силикагелем C_{18} практически не

описаны. В ТСХ пластины используются однократно, поэтому, в отличие от ВЭЖХ, здесь нет влияния на результат разделения остаточных количеств компонентов ранее анализированных образцов, а также необратимой сорбции компонентов анализируемой пробы. “Классическая” ТСХ с ручным нанесением проб и визуальным детектированием для количественного определения Sur применяется редко, т.к. не обеспечивает достаточное разрешение и воспроизводимую форму зон для расчетов. Однако она может быть использована для полуколичественной оценки содержания Sur при скрининге различных образцов и отработке условий культивирования продуцентов, а также для микропрепаративного выделения Sur и других липопептидов с целью последующего анализа биологической активности образца [102].

В 2020 г. B. Dlamini et al. предложили экономичный и доступный метод количественного определения содержания поверхностно-активных липопептидов с помощью ТСХ. Метод включает три этапа: подготовку и нанесение образца на пластину со слоем силикагеля F_{254} , собственно хроматографию в камере с подвижной фазой (хлороформ–метанол–вода в соотношении 65 : 25 : 4) и последующую обработку пластины растворами примулина (для количественного определения сурфактина и наличия липидных примесей) или нингидрина (для определения наличия пептидных и белковых примесей) для визуализации и количественного определения ПАВ [111]. Разработанный метод был полностью валидирован в соответствии со стандартными критериями [112]. Установлена линейная зависимость между концентрацией Sur (г/л) и площадью соответствующих ему зон на ТСХ-пластинах ($R^2 = 0.99$). Воспроизводимость метода превышает 85%. Показаны его чувствительность и надежность: данные оставались неизменными (95–98%) при варьировании типа растворителя во время пробоподготовки, количества проб, наносимых на одну пластину, выполнении анализа в разные дни [111]. Метод ТСХ специфичен для Sur, т.к. позволяет определять его в присутствии примесей. Кроме того, разработанный метод [113] может быть использован для определения Sur в присутствии фенгигина, другого липопептида, продуцируемого *Bacillus* spp., ввиду различных значений R_f (0.50 ± 0.04 для Sur и 0.10 ± 0.01 для фенгигина).

ТСХ возможно автоматизировать и проводить анализ в тандеме с масс-спектрометрическими методами анализа. В работе [114] отмечали зоны индивидуальных компонентов образца биоПАВ. Вещества элюировали с ТСХ-пластины метанолом (60 с, скорость потока 0.1 мл/мин) с использованием интерфейса на основе элюирующей головки (Plate Express, Advion, США), подключенного к масс-спектрометру QExactive Plus (Thermo Fisher Scientific) для идентификации соединений.

3.1.2. Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)

Для количественного определения сурфактина и родственных липопептидных биоПАВ нередко используют вариант ВЭТСХ. Стадии процесса идентичны методу ТСХ. Основная разница заключается в характеристиках используемых пластин, сравнение которых приведено в табл. 2. В ВЭТСХ образуются более узкие зоны веществ, и, соответственно, уменьшается длина прохождения фронта растворителя, таким образом снижая время анализа ВЭТСХ до 3–20 мин и повышая чувствительность метода в 5–10 раз по сравнению со стандартной ТСХ [115]. Чаще всего используют приборы ВЭТСХ производства компании Camag (Швейцария) [116].

С помощью специального автоматического прибора – “аппликатора” или ТСХ-автосамплера – пробы малого объема наносят на пластину по всей линии старта. Для разделения используют специальные автоматические камеры. После хроматографии пластину при необходимости обрабатывают проявляющим реагентом, например, нингидрином или примулином. Далее сканируют полученную хроматограмму на денситометре для ТСХ-пластин с использованием специального программного обеспечения (например, Camag visionCATS, Швейцария). В сумме все это позволяет намного повысить чувствительность, точ-

ность и воспроизводимость количественного определения Sur.

Селективность разделения родственных изоформ Sur методом ВЭТСХ можно существенно повысить, используя двухстадийную последовательную хроматографию целевого вещества различными растворителями в одном и том же направлении. Первый этап хроматографии, как правило, проводят смесью хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 4, по объему), второй – смесью бутанол–этанол–уксусная кислота (0.1%) (1 : 4 : 1, по объему) [117].

Детектирование веществ на пластине ТСХ/ВЭТСХ для дальнейших количественных расчетов представляет непростую задачу из-за отсутствия единого универсального подхода к идентификации соединений. Sur и другие липопептиды не поглощают свет в видимом диапазоне и не флуоресцируют. Описано применение “классических” проявителей для визуализации липопептидов – пары иода, тушение флуоресценции красителя в слое сорбента и др. Проведено сравнение различных методов проявления ТСХ-пластин [114]. Для этого использовали следующие наборы реагентов: 1) суспензию флуоресцирующих бактерий *Aliivibrio fischeri* (биоПАВ влияют на люминесценцию бактерии: сурфактин увеличивает, а итурин ингибирует); 2) ацетилхолинэстеразу (AChE) (сурфактин и итурин, ингибирующие AChE, проявляются как белые зоны на фиолетовом фоне); 3) α -глюкозидазу (желтые зоны сурфактина и итурина, ингибирующих активность фермента, на фиолетовом фоне); 4) 2,2-дифенил-1-пикрилгидразин (DPPH), чувствительный к антиоксидантам (желтые зоны на фиолетовом фоне показывают антиоксидантную активность, которой не обладают сурфактин и итурин, но могут проявлять примеси); 5) нингидрин-коллидиновый реагент, позволяющий определить вещества с пептидными фрагментами. При смачивании пластины водой выявляются

Таблица 2. Сравнение параметров пластин в ТСХ и ВЭТСХ

Параметр	Значение в ТСХ	Значение в ВЭТСХ
Размер частиц силикагеля	10–15 мкм	5–6 мкм
Толщина слоя	250 мкм	100 мкм
Количество образцов на пластине	До 36 проб	До 10 проб
Объем пробы	1–5 мкл	0.1–0.5 мкл

гидрофильные участки биоПАВ при освещении УФ-светом пластин с флуоресцентной меткой (чувствительность к липофильным жирнокислотным фрагментам молекулы). К сожалению, эти методы не позволяют детектировать все группы липопептидных биоПАВ с сопоставимой чувствительностью, тогда как часто бывает необходимо одновременно определять все основные семейства биоПАВ (Sur, итурин, фенгицин), обеспечивающие суммарную поверхностную активность образца.

Оптимальный способ количественного определения липопептидов методом ВЭТСХ практически аналогичен детектированию липопептидов, применяемому в ВЭЖХ – сканирование пластин по поглощению в коротковолновой УФ-области (~200 нм) на ТСХ-сканере и последующая обработка денситограмм. Предел детектирования сурфактина методом ВЭТСХ составляет 13 нг/зона и предел определения – 47 нг/зона, диапазон линейности ($R^2 > 0.99$) – не менее 30–600 нг на зону [117]. Эти параметры сравнимы с параметрами определения данных биоПАВ методом ВЭЖХ. В работе [102] сделано детальное сопоставление метрологических характеристик определения липопептидных биоПАВ методами ВЭЖХ и ВЭТСХ, которые свидетельствуют о большей производительности ВЭТСХ.

Недостаток ВЭТСХ – необходимость использования нескольких специальных дорогостоящих приборов: “аппликатор” или “автосамплер” – устройство для нанесения проб заданного объема в виде полос, автоматический модуль для хроматографии, устройства для высушивания пластин и для нанесения реагентов для визуализации соединений, сканер и спектроденситометр. Отметим, что сканирование и обработка результатов занимают достаточно длительное время.

В работе [117] было показано, что для ВЭТСХ-разделения семейств липопептидов с максимальным разрешением изоформ биосурфактантов, продуцируемых *B. subtilis* DSM 10T, *B. amyloliquefaciens* DSM 7T и *B. methylotrophicus* DSM 23117, необходима предварительная пробоподготовка. Авторами был оптимизирован протокол экстракции биосурфактантов (Sur, итурин А, фенгицин) из клеточной жидкости. Оптимальным экстрагентом оказалась смесь хлороформ–метанол (2 : 1, по объему).

3.2. ВЭЖХ и ТСХ – возможности и преимущества

Количественное определение липопептидных биоПАВ с полным разделением всех изоформ каждого семейства достигается только применением ВЭЖХ. Этот метод также обеспечивает высокую чувствительность и максимальную селективность отделения от сопутствующих компонентов реальных объектов. Он незаменим для исследования состава и идентификации изоформ семейств липопептидных биоПАВ в различных объектах. Спектрофотометрическое детектирование в УФ-диапазоне 200–215 нм обеспечивает достаточную чувствительность и высокую точность определения. Основные недостатки метода – относительно большое время анализа каждой пробы (~20–40 мин), большой расход дорогостоящих растворителей высокой чистоты, высокая стоимость оборудования.

Прибор для ВЭЖХ, совмещенный с масс-спектрометром, позволяет сразу идентифицировать все изоформы семейств биоПАВ, однако для его эксплуатации нужен высококвалифицированный персонал и регулярная дорогостоящая сервисная поддержка.

С помощью ВЭТСХ достигается существенно большая производительность анализа при нанесении большого числа проб на одну пластину. При меньшем времени разделения смесей (3–20 мин) время анализа образца в целом снижается, но незначительно по сравнению с ВЭЖХ, т.к. все стадии процесса выполняют на специальных сложно устроенных приборах, а полное время анализа часто ограничено многими физико-химическими параметрами хроматографической системы. Селективность разделения индивидуальных изоформ семейств липопептидов и чувствительность метода не достигает полностью уровня селективности и чувствительности (нижняя граница определяемых содержаний) ВЭЖХ. Возможно, по причине сложности и дороговизны приборов ВЭТСХ не получила массового применения для определения биоПАВ, хотя в научной литературе встречаются интересные поисковые работы [102, 114, 117].

ТСХ на “обычных” коммерчески доступных силикагелевых пластинах с дальнейшими количественными расчетами с видеоденситометрией (обработка изображения пластины после разде-

ления) – наиболее быстрый, производительный и недорогой метод. Он может быть успешно применен для массового скрининга большого количества образцов (поиск и сравнение продуцентов сурфактина, контроль его биосинтеза и т.д.) с приемлемой чувствительностью и воспроизводимостью, особенно при необходимости сравнения содержания Sur и других биоПАВ в значительном количестве однотипных образцов.

3.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ) позволяет разделять компоненты семейства изоформ и гомологов сурфактина, продуцируемых различ-

ными микроорганизмами, а также отделить семейства изоформ других липопептидов (итурина, фенгигина), которые могут продуцироваться вместе с семейством сурфактина. Однако большинство этих исследований было проведено на аналитическом уровне для количественного определения и характеристики липопептидов [48, 102, 105, 106, 118–129] (табл. 3).

Время удерживания сурфактина на сорбенте определяют гидрофобные неполярные фрагменты молекулы. Он элюируется в ОФ-ВЭЖХ на колонках с октадецилсиликагелем (C18) при высоком содержании ацетонитрила/метанола в воде с 0.1%-ной трифторуксусной кислотой (рН 2.2) (реже 0.05%-ной ТФУ) (табл. 3). Для разделения чаще всего используют режим градиентного элюирования, позволяющий наиболее полно отделять семейства

Таблица 3. Примеры использования ОФ-ВЭЖХ в тандеме с другими аналитическими методами для решения конкретных научных задач, связанных с изучением сурфактина и других биосурфактантов

№	Цель исследования	Условия разделения (колонка, подвижная фаза, параметры элюирования)	Дополнительные методы исследования фракций	Ссылка
1	Разработка быстрого, эффективного разделения и очистки изоформ различных семейств липопептидов	InertSustain C ₁₈ (5 мкм, 250 × 4.6 мм), два элюента: (А): 0.1%-ный водный раствор ТФУ–метанол, 0–3 мин – метанол 70–75%, 3–8 мин – 75–85%, 8–30 мин – 85–95%; (В): 0.1%-ный водный раствор ТФУ–ацетонитрил, 0–3 мин – ацетонитрил 45–50%, 3–8 мин – 50–80%, 8–30 мин – 80–100%	Определение аминокислотного состава, MALDI-TOF MS	[118]
2	Характеристика нового производного сурфактина – метилового эфира с более высокими поверхностно-активными свойствами, анализ изоформ полученного биосурфактанта	HiQ sil C ₁₈ W (5 мкм, 250 × 21.2 мм), 0.05%-ный водный раствор ТФУ–метанол, 0–24 мин – 90% метанола, 24–34 мин – метанол 90–100%, 17 мл/мин	ГХ-МС, ЯМР-спектроскопия	[48]
3	Новый эффективный метод быстрой идентификации и количественного определения сурфактина	Chromolith high per-formance RP-18 (5 мкм, 100 × 4.6 мм), водный раствор ТФУ (3.8 мМ)–ацетонитрил, 20 : 80, 2.2 мл/мин	Не проводились	[105]
4	Выделение изолейцин-богатых сурфактинов из культуральной среды	Lichrosorb 7 C ₁₈ (250 × 15 мм), 0.01%-ный водный раствор ТФУ–метанол, 15 : 85, 4 мл/мин	ГХ-МС, аминокислотный анализ, ЯМР-спектроскопия, изучение поверхностно-активных свойств и способности связывать ионы кальция	[119]
5	Характеристика широкого ряда производных сурфактина (монометилловых и диметилловых эфиров), разделение различных изоформ сурфактина	En-Ca Pharm 100RP 18-TS (5 мкм, 250 × 16 мм), водный раствор ацетата аммония (10 мМ, рН 6.9) – ацетонитрил 60 : 40	MALDI-MS, ЯМР-спектроскопия, ТСХ	[120]

Таблица 3. (Продолжение)

№	Цель исследования	Условия разделения (колонка, подвижная фаза, параметры элюирования)	Дополнительные методы исследования фракций	Ссылка
6	Исследование качественного и количественного состава липопептидов, продуцируемых различными штаммами <i>Bacillus</i> spp.	Chromspher C ₁₈ (5 мкм, 250 × 4.6 мм), 0.05%-ный водный раствор ТФУ–ацетонитрил, 1 мл/мин	Измерение углов смачивания, колоночная хроматография гидрофобного взаимодействия	[121]
7	Выделение и характеристика биосурфактантов, продуцируемых <i>B. circulans</i>	Zorbax Eclipse plus C ₁₈ (5 мкм, 250 × 4.6 мм), 0.1%-ный водный раствор ТФУ–ацетонитрил, линейный градиент ацетонитрила от 5 до 95% за 40 мин, 0.4 мл/мин	Измерение поверхностного натяжения полученных фракций, ТСХ, FTIR	[122]
8	Характеристика нового биосурфактанта семейства сурфактинов, продуцируемых <i>Bacillus subtilis</i> MI113(pC115)	Prep-ODS (250 × 20 мм), водный раствор ТФУ (1.8 мМ)–ацетонитрил, 1 : 4, 7.5 мл/мин	МС и аминокислотный анализ	[123]
9	Исследование биосурфактантов семейства сурфактинов, применяемых против болезни “баканаз” риса	Perkin-Elmer C ₁₈ (5 мкм, 250 × 4.6 мм), 0.05%-ный водный раствор ТФУ–ацетонитрил, 80 : 20, 1 мл/мин	МС, исследование противогрибковых, антибактериальных свойств, анализ влияния pH и температуры на стабильность сурфактина	[124]
10	Характеристика изоформного состава липопептидов, продуцируемых <i>B. licheniformis</i> HSN 221	Hypersil ODS2 RP-C ₁₈ (5 мкм, 250 × 21.2 мм), 0.05%-ный водный раствор ТФУ–метанол, 0–55 мин – метанол 90%, 55–60 мин – метанол 90–100%, 60–80 мин – метанол 100%	ГХ-МС, МС, аминокислотный анализ	[125]
11	Исследование сурфактина и итурина А в качестве противогрибковых агентов в сельском хозяйстве	IBM Instruments C ₁₈ (5 мкм, 50 × 4.6 мм), 0.1%-ный водный раствор ТФУ–ацетонитрил, 4 : 1, 0.7 мл/мин	MS-ESI	[126]
12	Исследование сурфактина в качестве агента против бактерий рода <i>Legionella</i> , характеристика полученных изоформ сурфактина	Chromolith SpeedROD RP-18e (50 × 4.6 мм), вода с 0.2% муравьиной кислоты–ацетонитрил, 0–18 мин – ацетонитрил 60–100%, 18–23 мин – ацетонитрил 100%, 0.8 мл/мин	MS-ESI	[127]
13	Анализ биосинтеза сурфактина на коммерчески доступной среде	Thermo-Hypersil-Keystone ODS (5 мкм, 250 × 4.6 мм), 0.1%-ный водный раствор ТФУ–ацетонитрил (80 : 20 по объему) (А); 0.1%-ный водный раствор ТФУ–ацетонитрил (20 : 80 по объему) (В), 0–30 мин – 40% В, 30–40 мин – 40–100% В	MALDI-TOF MS	[106]
14	Исследование продукции сурфактина бактериями в ферментированной пище, характеристика изоформного состава	Agilent Zorbax C18 1100 Series (5 мкм, 250 × 4.6 мм), водный раствор ТФУ (3.8 мМ)–ацетонитрил 80 : 20, 1 мл/мин	ЖХ-МС	[128]
15	Очистка, выделение и характеристика липопептидных биосурфактантов, продуцируемых <i>B. velezensis</i> SK	Hiber C ₁₈ (5 мкм, 250 × 4.6 мм), 0.1%-ный водный раствор ТФУ–метанол, 80 : 20, 1 мл/мин	МС, ТСХ, FTIR, исследование антибактериальной активности	[102]
16	Оптимизация среды для микробиологического синтеза сурфактина с целью понижения ее удельной стоимости	Hypersil™ ODS-2 (250 × 4.6 мм), 0.1%-ная ТФУ в ацетонитриле (А); 0.1%-ный водный раствор ТФУ (В), 0–9 мин, градиент элюента А от 60 до 93%, 9–20 мин – изократический режим 93% элюента А, 0.84 мл/мин	Спектрофотометрическое определение количества продуцируемого сурфактина	[129]

инурина и фунгицина от Sur и разделять изоформы Sur. В статье [130] описан основанный на ОФ-ВЭЖХ метод быстрой очистки липопептидов на составляющие изоформы с использованием колонки C18 при градиентном элюировании, благодаря чему общее время очистки сократилось до 12 мин. Yang et al. [118] применили стратегию трехэтапного линейного градиентного элюирования для быстрой, высококачественной и одновременной очистки итуруина, фенгицина и сурфактина, которые отличались по химической структуре только одной аминокислотой или остатком жирной кислоты. Авторы этой работы оптимизировали условия градиентного разделения на колонках C18 с элюентами, представляющими собой водный раствор 0.1%-ной ТФУ–метанол/ацетонитрил. Было показано, что элюент вода–метанол позволяет разделять изоформы сурфактина при меньшем содержании органического компонента, но максимальное разрешение изоформ сурфактина достигается в градиенте вода–ацетонитрил, при 90–100% ацетонитрила. На рис. 3 приведена хроматограмма в условиях, описанных в работе [118] в качестве оптимальных.

В нескольких работах использовали водный компонент элюента не с ТФУ, а с другими соединениями (и значением pH), такими как 0.1%-ная уксусная кислота [131], 0.1%-ная муравьиная кислота [127], которую чаще всего используют для разделений ВЭЖХ-МС (т.к. муравьиная кислота

обеспечивает ионизацию аналитов в электроспрее ионного источника масс-спектрометра). Другие (не C18) типы ОФ-ВЭЖХ-колонок (октилсиликагель-C8, бутилсиликагель-C4, нитрилсиликагель-CN, фенилсиликагель и др.) для определения липопептидных биоПАВ применяют очень редко, т.к. эффективность и селективность разделения на них хуже, чем на колонках с сорбентом C18 [132].

Изократическое элюирование обеспечивает более низкую селективность и разрешение компонентов, но позволяет выделять изоформы сурфактина и других липопептидов в препаративном количестве для использования в пищевой, сельскохозяйственной и косметической промышленности с большим выходом при уменьшении расхода растворителей [130].

При определении липопептидных биоПАВ, как правило, используют спектрофотометрический детектор при длине волны 200–210 нм, реже при 215–220 нм (аналогично пептидам и липидам), т.к. они не содержат в своей структуре фрагментов, поглощающих при больших длинах волн. Как уже упоминалось выше, для количественных расчетов и построения градуировочных кривых используют суммарный сигнал пиков семейства сурфактина (сумма площадей пиков всех изоформ) [133]. Различные бактерии-продуценты могут нарабатывать различные комбинации изоформ липопептидных ПАВ в разном соотношении, однако это мало влияет на точность коли-

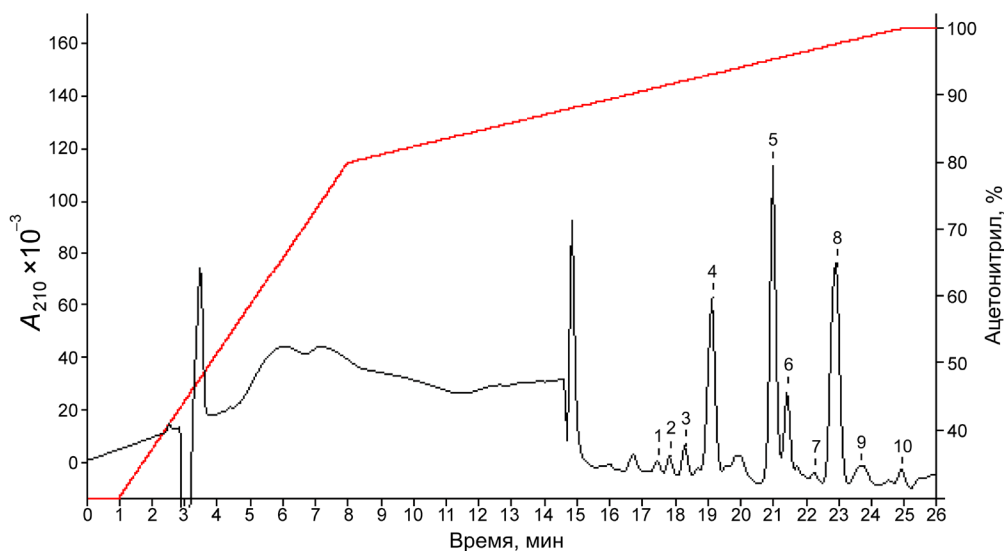


Рис. 3. Разделение препарата сурфактина (24 мкг) методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C18(II) (4.6 × 250 мм). Элюент — 0.1%-ная ТФУ (водный раствор), градиент ацетонитрила: 30% (0–1 мин), 30–80% (1–8 мин), 80–100% (9–24 мин). Скорость потока — 1 мл/мин. УФ-детектор — 210 нм.

чественных расчетов, т.к. чувствительность спектрофотометрического детектора при 200–210 нм практически одинакова для всех изоформ.

Условия ВЭЖХ-определения сурфактина и родственных биоПАВ, описанные рядом авторов, суммированы в табл. 3. Разделения проводили как в аналитическом варианте (на колонках диаметром до 4.6 мм), в том числе с монолитным сорбентом Chromolith C18, так и на препаративных колонках большего диаметра. Разделение на аналитических колонках позволяет добиться максимального разрешения компонентов изоформ биоПАВ.

Для препаративных разделений в режиме ОФ-ВЭЖХ в качестве элюента использовали 0.1 М ацетат аммония в воде (рН 6.9) и ацетонитрил [134]. Также применяли эксклюзионную ВЭЖХ на колонке LH-20 (1500 × 50 мм) с элюентом хлороформ–метанол (1 : 1) и последующее выделение изоформ ОФ-ВЭЖХ. Разделение методом ВЭЖХ сложных смесей, содержащих липопептидные биоПАВ, в препаративном режиме позволяет далее исследовать выделенные компоненты различными физико-химическими и химическими методами (масс-спектрометрия, ИК-спектроскопия, ядерный магнитный резонанс, аминокислотный анализ, жирнокислотный анализ и др.) для их идентификации, установления структуры и состава. С помощью препаративной ВЭЖХ можно получить значительные количества индивидуальных веществ из смесей изоформ различных биоПАВ, которые можно использовать в качестве стандартных образцов для построения градуировочных зависимостей для количественных определений этих соединений в реальных объектах.

Некоторые примеры исследований с использованием метода ВЭЖХ приведены в табл. 3. В большинстве работ, в которых количественно определяли липопептиды с помощью ВЭЖХ, анализировали состав изоформ семейств различными вариантами методов масс-спектрометрии (МС) и хромато-масс-спектрометрии – МС с ионизацией распылением в электрическом поле (ESI), времяпролетная МС с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF), квадрупольная времяпролетная МС с ионизацией распылением в электрическом поле и последующей МС (ESI-Q-TOF-MS/MS), времяпролетная МС с матрично-ассоциированной

лазерной десорбцией/ионизацией с последующей МС-МС (MALDI-TOF-MS/MS) и газовая хроматография с последующей МС (GC-MS) [130].

Отметим исследование ученых Das, Mukherjee и Sen, которые с помощью ВЭЖХ выделили биологически активную фракцию липопептидного биосурфактанта, продуцируемого морскими бактериями *B. circulans*. Неочищенные биосурфактанты были разделены на шесть фракций. Шестая фракция, показавшая наиболее высокие поверхностно-активные характеристики, снижала поверхностное натяжение воды с 72 до 28 мН/м. Было обнаружено, что только эта фракция обладает биологической активностью и проявляет выраженное противомикробное действие в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных патогенных и частично патогенных микроорганизмов [122].

В сложных средах, таких как почва и ризосфера, обнаружение и количественное определение липопептидов, продуцируемых *in situ*, представляет собой трудную задачу, поскольку эти амфифильные соединения могут адсорбироваться на частицах почвы или необратимо внедряться в липидные структуры, присутствующие на поверхности целевых и нецелевых организмов, сосуществующих в одной и той же экологической нише. В таких случаях для идентификации даже минимального количества липопептида успешно используют метод ВЭЖХ с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС-МС). В работе [124] оценивали биорегулирующую активность сурфактина А, полученного из *Bacillus subtilis* NH-100 и NH-217 и *B. amyloliquefaciens* FZB42, против “болезни баканоз” риса, вызванной *Fusarium moniliforme*. Для изучения биоконтролирующей активности сурфактина А при “болезни баканоз” риса его осаждали из бесклеточной культуры штаммов концентрированной соляной кислотой и выделяли методом ОФ-ВЭЖХ. Анализ ВЭЖХ-МС-МС показал, что этот штамм продуцирует изоформы сурфактина А с ацильными цепями C12, C13, C14, C15 и C16. Установлено, что штамм *B. subtilis* NH-100 продуцировал 178 мг/л сурфактина, *Bacillus* sp. NH-217 – 137 мг/л, а штамм *B. amyloliquefaciens* FZB42 – 161 мг/л.

Томашевич с соавт. использовали ВЭЖХ-МС для изучения метаболомного профиля перспек-

тивных для разработки биофунгицидов штаммов бактерий рода *Bacillus* [133]. В экстрактах метаболитов штаммов *B. siamensis* BZR 86, *B. amyloliquefaciens* BZR 277, *B. velezensis* BZR 517 и *B. velezensis* BZR 336g обнаружены сурфактин, итурин и фенгицин. Установлено, что штаммы *B. velezensis* BZR 336g и *B. amyloliquefaciens* BZR 277 продуцируют значительно больше сурфактина ($(3.22 \pm 0.46) \times 10^{-5}$ и $(4.64 \pm 0.10) \times 10^{-5}$ М соответственно) по сравнению с *B. siamensis* BZR 86 и *B. velezensis* BZR 517 ($(8.54 \pm 0.26) \times 10^{-6}$ и $(9.79 \pm 0.20) \times 10^{-6}$ М соответственно).

Сурфактин и/или итурин были выделены с помощью ОФ-ВЭЖХ в тандеме с твердофазной экстракцией и МС в биологически значимых количествах (25–180 мкг/г) из корней огурцов и окружающей почвы, инокулированных штаммом *B. subtilis* QST 713 [126]. *B. subtilis* QST 713 продуцирует три группы липопептидов, которые, действуя синергически, разрушают ростковые трубки и мембраны патогенов, что приводит к дезинтеграции их клеток. Агентство по охране окружающей среды США и международные службы контроля применения агрохимикатов признали препарат лиофилизированных бактерий на основе *B. subtilis* QST 713 безопасным для окружающей среды и здоровья человека; обработанные им плоды и овощи разрешается экспортировать без ограничений. Этот препарат безопасен для нецелевых объектов, в частности энтомофагов, совместим со многими синтетическими фунгицидами и идеально подходит для использования в интегрированных программах защиты растений [135].

3.4. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

Для определения функциональных групп и химических связей с последующим подтверждением структуры биоПАВ в ряде работ применяется инфракрасная (ИК) спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR). Наличие определенных полос поглощения в полученном ИК-спектре биоПАВ (характеристические колебания алифатической цепи жирной кислоты, пептидной связи, аминокрупп и сложноэфирных связей) позволяет судить о типе соединения, продуцируемого исследуемым штаммом. В одной из первых работ, содержащих спектральные

характеристики Sur, приведен только ИК-спектр, не содержащий отнесения полос поглощения разных функциональных групп [136].

Впоследствии с помощью FTIR были охарактеризованы отдельные элементы структуры Sur. Интенсивные спектральные полосы в диапазоне $3500\text{--}3240\text{ см}^{-1}$ с максимумом при 3317 см^{-1} соответствуют колебаниям связей N–H, C–H, –OH, а также говорят о наличии в соединении аминокруппы, связанной с атомом углерода, и об образовании внутримолекулярных водородных связей [122]. Полоса 1647 см^{-1} указывает на наличие амидной связи и карбонильной группы в полипептидной цепи [137]. Максимумы поглощения при 2825 и 2939 см^{-1} свидетельствуют о присутствии в соединении длинной алифатической цепи, соответствующей жирной кислоте (группы –CH, –CH₂ и –CH₃), максимумы при 1419 и 1450 см^{-1} указывают на C–H-связь при α -атоме углерода в Leu и/или Ile, а пик при 1112 см^{-1} – на наличие в молекуле сложноэфирной группы (колебание связи O=C–O–C) [138].

Данные FTIR используют для отнесения нового биосурфактанта к определенному семейству. Так, в работах [122, 137–139] биоПАВ, продуцируемые *B. velezensis* SH-B74, *B. subtilis* MTCC-8114, R1, *B. circulans* и другими представителями *Bacillus* spp., отнесены к семейству Sur, поскольку в ИК-спектре были представлены характерные полосы.

FTIR показала себя как эффективный метод исследования конформации молекулы Sur. По изменению интенсивности полос и смещению их максимума можно оценивать структурные изменения молекулы в различных условиях. Были изучены изменения структуры Sur при добавлении Ca²⁺ [140], особенности строения моно- и диметилированной молекулы Sur при варьировании растворителя и температуры [141], а также охарактеризован комплекс щелочной протеазы и Sur [142].

С помощью FTIR были изучены адсорбционные свойства Sur, которые обуславливают его применение для добычи полезных ископаемых [143]. Авторы исследовали адсорбцию Sur на угле, данные ИК-спектроскопии образца, полученного при смешении угля и растворов сурфактина различной концентрации, и показали, что преимущественный процесс их взаимодействия – это

физическая адсорбция с участием сложноэфирных групп Sur на поверхность угля.

FTIR также позволяет изучить взаимодействие молекул Sur с липидным бислоем липосом как моделей живой клетки. Изменение полосы поглощения в ИК-спектре, характерной для связи C–H, в процессе встраивания Sur в фосфолипидный бислой свидетельствует о взаимодействии Sur с ацильными фрагментами фосфолипида (рис. 4), что приводит к значительному повышению текучести (проницаемости) мембраны [144].

Обычно ИК-спектроскопия используется в сочетании с другими инструментальными методами исследования Sur. В основном, предварительно применяют ВЭЖХ (или ЖХ-МС) для разделения и выделения Sur из природной смеси биоПАВ [122, 137, 139].

3.5. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)

Впервые трехмерная структура Sur была охарактеризована методом ЯМР в 1994 г. с помощью ^2D - ^1H -ЯМР-спектра в дейтерированном DMSO [44]. Использование двумерной ^1H -ЯМР-

спектроскопии (в вариантах COSY и NOESY) позволило определить помимо структурной формулы расстояния между атомами в молекуле Sur. Построенные модели трехмерной структуры, согласованные с методами молекулярного моделирования, предполагали, что циклическая часть молекулы Sur находится в конформации “седло” (рис. 1б), причем боковые остатки Asp и Glu обращены в противоположную сторону от остатка жирной кислоты. Особенности расположения Asp и Glu объясняет способность Sur связывать и переносить ионы кальция и магния.

Опубликовано несколько работ, в которых ЯМР-спектроскопия используется для подтверждения структуры Sur и подобных ему соединений. Для определения количества аминокислотных остатков в пептидной части биосурфактанта оценивают количество сигналов в ^1H -ЯМР-спектре, соответствующих протонам N–H (δ 7.59–8.40 м.д.), а также количество сигналов для α -H (δ 4.05–4.56 м.д.). С помощью двумерной ЯМР-спектроскопии в вариантах TOCSY, DQF-COSY, NOESY и HSQC подтверждают качественный состав пептидной части молекулы и последовательность amino-

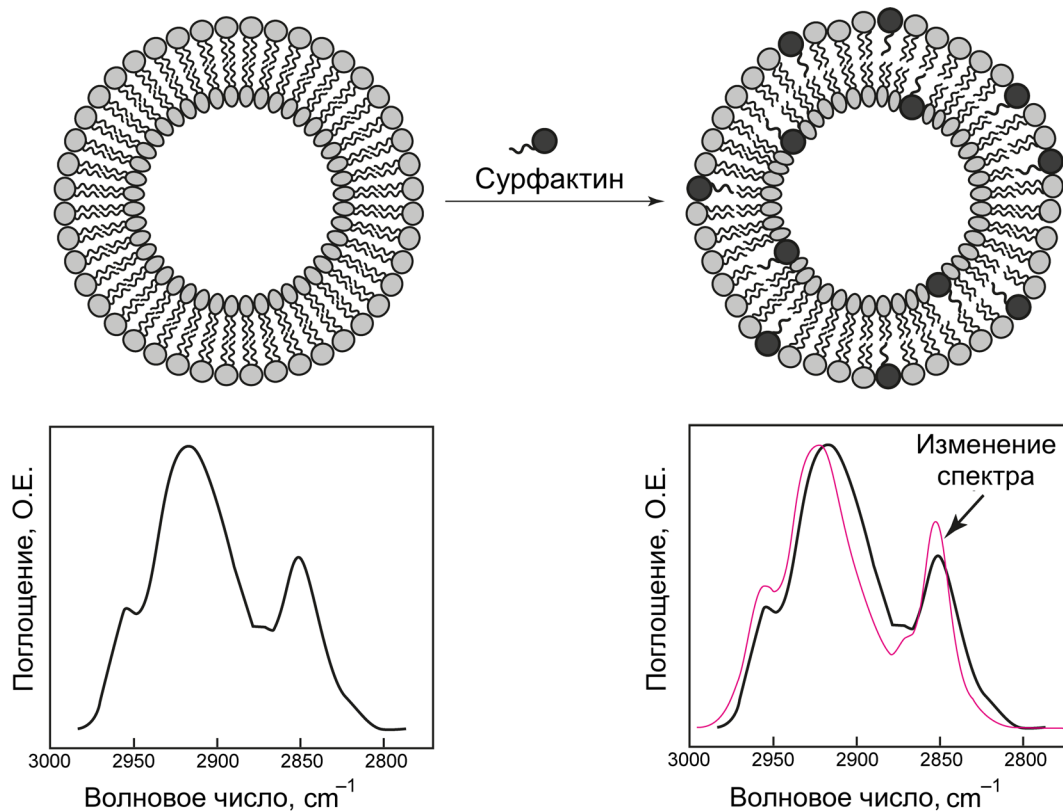


Рис. 4. Изменение в ИК-спектре при встраивании сурфактина в мицеллу. Адаптировано из работы [144].

кислот. Сигнал в области δ 1.25 м.д. свидетельствует о присутствии липидного фрагмента, структура которого не может быть определена методом ЯМР. Так, в работе [145] было описано несколько различных липопептидных сурфактиноподобных биоПАВ, отличающихся только длиной липидного фрагмента при тождественности пептидной части молекулы. Также в данной работе приведены значения химических сдвигов в ЯМР-спектрах (^{13}C и ^1H) Sur в $\text{DMSO}-d_6$ (600 МГц). Спустя год, другая группа авторов получила значения характерных химических сдвигов для нового биосурфактанта семейства сурфактина в CDCl_3 (600 МГц) (β -гидрокси- C_{11} -Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) [63].

ЯМР-спектроскопия используется для подтверждения строения других продуцируемых клетками биоПАВ. Например, с помощью двумерного ROESY-ЯМР был охарактеризован аминокислотный состав и предложена структура биоПАВ, продуцируемого *B. halotolerans*, причем результаты свидетельствовали о схожести его структуры с Sur [146].

ЯМР-спектроскопия может быть использована для изучения динамических свойств Sur. Так, с помощью двумерной ЯМР-спектроскопии (COSY, NOESY, TOCSY) исследовали поведение Sur в биомиметической среде, имитируя ее с помощью включения молекулы липопептида в мицеллы додецилсульфата и додецилфосфохолина натрия [147]. Показано, что время релаксации Sur в цвиттер-ионных и анионных мицеллах отличается, но изменение конформации молекулы Sur от начальной до равновесной в различных мицеллах не зависит от электростатической природы мицеллообразователя. При замене мицеллярной среды на органический растворитель остаток жирной кислоты Sur остается связанным с мицеллой: обменное взаимодействие между остатком жирной кислоты и средой при переходе в DMSO не наблюдалось.

Таким образом, ЯМР-спектроскопия дает представление о пространственной структуре молекулы Sur, ее строении и взаимном расположении атомов в ней. В современных работах метод используется в основном для исследования структурных особенностей Sur или же для определения структуры новых продуцируемых микроорганизмами биоПАВ. Данный метод практически всегда применяется в сочетании с масс-спектрометрическими или хроматографическими методами анализа.

3.6. Масс-спектрометрия

Один из наиболее применяемых методов масс-спектрометрического анализа для характеристики биосурфактантов в неочищенных природных смесях – времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной десорбцией и ионизацией с использованием матрицы (MALDI-TOF MS). Гликопептиды и липопептиды массой <5000 Да, содержащие свободные аминокислотные группы, эффективно протонируются с использованием α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в качестве матрицы. Эти соединения часто дают интенсивные сигналы в масс-спектрах. С помощью MALDI-TOF MS можно обнаружить Sur в диапазоне m/z 1000–1100 в однократно протонированных формах или в виде натриевых и калиевых солей (для сурфактина А с остатком гептадекановой кислоты (C_{16}): для однократно протонированной формы $m/z = 1036.68$; для натриевой соли $m/z = 1058.67$; для калиевой соли $m/z = 1074.65$). Помимо этого, масс-спектрометрический анализ позволяет различать изоформы биосурфактантов, которые отличаются длиной углеводородного “хвоста” жирной кислоты, а также модификациями аминокислотного фрагмента [148].

В работе [149] показано, что при ионизации молекула Sur может подвергаться фрагментации. Основные пути – гидролиз сложноэфирной связи, пептидной связи и раскрытие цикла аминокислотного фрагмента. В масс-спектре сурфактина были обнаружены сигналы с $m/z = 685.44$ (протонированный полипептид Val-Leu-Asp-Val-Leu-Leu), $m/z = 671.43$ (протонированный полипептид Leu-Leu-Asp-Val-Leu-Leu), $m/z = 699.46$ (протонированный и метилированный полипептид Leu-Leu-AspOMe-Val-Leu-Leu), $m/z = 699.46$ (протонированный полипептид Leu-Leu-Asp-Leu-Leu-Leu). Помимо этого, в спектре был зарегистрирован сигнал с $m/z = 370.26$ (остаток глутаминовой кислоты с цепью алифатической жирной кислоты), который соответствует фрагментации по пути разрыва аминокислотного цикла и гидролизом одной пептидной связи [149].

С использованием масс-спектрометрического анализа было показано, что биосурфактанты семейства Sur не образуют димеры, тримеры и прочие многомерные аддукты. Авторы сообщают об оптимизации эффективного метода для определения состава смеси биосурфактантов и разрешением различных изоформ Sur и иных семейств [118].

В работе [150] был использован метод масс-спектрометрии с визуализацией (Imaging mass-spectrometry) для демонстрации роли Sur в формировании окружающей бактериальной среды и смешанного сообщества бактерий на примере *Paenibacillus dendritiformis* и *B. subtilis* NCIB 3610, совыделяющихся из почвы, растений и ризосферы. С помощью данного метода показано, что бактерия *P. dendritiformis* активно разлагает Sur, продуцируемый *B. subtilis*, и накапливает образовавшиеся продукты, которые служат маркерами среды обитания этой бактерии. Установлено, что Sur – молекула, привлекающая *P. dendritiformis* и способствующая движению клеток этой бактерии по направлению к *B. subtilis*.

Масс-спектрометрия позволяет характеризовать достаточно сложные смеси биосурфактантов, различающихся между собой аминокислотным составом и/или фрагментом жирной кислоты. Были охарактеризованы 49 различных изоформ Sur, продуцируемых *B. subtilis* OKB 105, а также его моно- и диметилловых эфиров, выделенных из смеси с помощью ОФ-ВЭЖХ,

структура молекул была разрешена с помощью двумерной ^1H -ЯМР-спектроскопии. Значения m/z для ряда изоформ Sur приведены в табл. 4 [120].

Несмотря на то что масс-спектрометрия позволяет с высокой точностью определять молекулярные массы компонентов биоПАВ даже в сложных смесях, данный метод анализа целесообразно использовать в tandem с методами разделения или подтверждения структуры получаемых молекул. Данные табл. 4 показывают, что одному и тому же значению m/z в масс-спектре могут соответствовать сразу несколько изоформ Sur, поэтому необходимо дополнительно разрешать структуру с помощью иных методов. Например, универсальный подход – жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией (см. выше). В данном методе объединены разделяющая способность хроматографии и аналитическая точность масс-спектрометрии. Также для подтверждения структуры можно использовать ЯМР-спектроскопию или инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье [81].

Таблица 4. Значения m/z для различных изоформ сурфактина по данным масс-спектропии с ионизацией распылением в электрическом поле

№	Аминокислотная последовательность пептидного фрагмента Sur	Сигнал m/z			Длина фрагмента алифатической жирной кислоты
		в масс-спектре немодифицированного Sur	в масс-спектре монометилированного Sur	в масс-спектре диметилированного Sur	
1	Glu–Leu–Leu–Val–Asp–Leu–Leu	1008	1022	1036	C ₁₃
		1022	1036	1050	C ₁₄
		1036	1050	1064	C ₁₅
2	Glu–Leu–Leu–Val–Asp–Leu–Val	994	1008	1022	C ₁₃
		1008	1022	1036	C ₁₄
		1022	1036	1050	C ₁₅
3	Glu–Ile–Leu–Val–Asp–Leu–Val	994	1008	–	C ₁₃
		1008	1022	1036	C ₁₄
		1022	1036	1050	C ₁₅
4	Glu–Leu–Leu–Val–Asp–Leu–Ile	1008	1022	1036	C ₁₃
		1022	1036	1050	C ₁₄
		1036	1050	1064	C ₁₅
5	Glu–Ile–Leu–Val–Asp–Leu–Ile	–	–	–	C ₁₃
		–	–	–	C ₁₄
		1036	1050	1064	C ₁₅
6	Glu–Val–Leu–Val–Asp–Leu–Val	–	–	–	C ₁₃
		–	1008	1022	C ₁₄
		–	–	–	C ₁₅

Примечание: прочерк означает отсутствие в литературе данных по сурфактину такого состава с указанными модификациями.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БиоПАВ – многообещающая замена обычных, синтетических ПАВ. Они не уступают им по уровню поверхностной активности и потенциальных сфер применения, при этом обладают более выраженными биосовместимостью и биоразлагаемостью. Сурфактин, как один из наиболее широко изучаемых и потенциально полезных биоПАВ, может использоваться для увеличения эффективности нефтедобычи, а также в медицинской, косметической и сельскохозяйственной отраслях промышленности. При этом Sur обладает значительной природной гетерогенностью, а эффективность его биосинтеза природными штаммами-продуцентами не слишком велика. Эти причины обуславливают необходимость разработки способов качественного и количественного определения Sur в сложных природных смесях. Основной метод количественного определения Sur (наряду с другими биоПАВ) – высокоэффективная жидкостная хроматография. Он обладает достаточной точностью и относительно прост в реализации, но требует большого количества времени и расходных материалов. Альтернатива ВЭЖХ – ВЭТСХ, которая, несмотря на высокую скорость анализа, не может быть использована как единственный метод количественного определения Sur.

Помимо хроматографических подходов, для изучения Sur (и других биоПАВ) широко используется метод масс-спектрометрии. С ее помощью можно обнаружить Sur в сложных природных смесях, а также проводить качественный анализ смеси природных изоформ Sur или смеси Sur с другими биоПАВ. Совместное использование масс-спектрометрии с хроматографическими методами разделения (преимущественно ВЭЖХ) – один из мощнейших аналитических тандемных подходов по качественному и количественному определению большинства природных объектов, в том числе биоПАВ.

Наряду с хроматографией и масс-спектрометрией, к инструментальным способам исследования Sur относят ИК-спектроскопию с преобразованием Фурье и ЯМР. Помимо решения задач качественного определения и подтверждения состава, данные подходы могут быть использованы для изучения трехмерного строения молекулы Sur, а также ее динамических свойств в

различных растворах и характера взаимодействия с твердыми частицами и липидными бислоями как моделью биологических мембран. Таким образом, объединение нескольких рассмотренных в данном обзоре инструментальных методов анализа Sur (и биоПАВ в целом) позволяет решить широкий спектр исследовательских задач, связанных с фундаментальным и практико-ориентированным изучением данного соединения.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 24-24-00193.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равный вклад в анализ данных литературы и написание обзора.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Markande A.R., Patel D., Varjani S. // Bioresour. Technol. 2021. V. 330. P. 124963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963>
2. Shekhar S., Sundaramanickam A., Balasubramanian T. // Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 2015. V. 45. P. 1522–1554. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955631>
3. Cameotra S.S., Makkar R.S., Kaur J., Mehta S.K. // Biosurfactants / Ed. Sen R. New York: Springer New York, 2010. V. 672. P. 261–280. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_20
4. Singh P., Patil Y., Rale V. // J. Appl. Microbiol. 2019. V. 126. P. 2–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>

5. *Pereira J.F.B., Gudiña E.J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J. A., Coutinho J.A.P., Rodrigues L.R.* // *Fuel*. 2013. V. 111. P. 259–268.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>
6. *Théâtre A., Cano-Prieto C., Bartolini M., Laurin Y., Deleu M., Niehren J., Fida T., Gerbinet S., Alanjary M., Medema M.H., Léonard A., Lins L., Arabolaza A., Gramajo H., Gross H., Jacques P.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. V. 9. P. 623701.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.623701>
7. *de Souza Araújo L., Santana L.A.R., Otenio M.H., Nascimento C.W., Cerqueira A.F.L.W., Rodarte M.P.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2024. V. 196. P. 9049–9063.
<https://doi.org/10.1007/s12010-024-05036-9>
8. *Kumari S., Debnath M., Joshi S., Sonawane S.H.* // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2024. V. 63. P. 13189–13207.
<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.4c00168>
9. *Shaikhah D., Loise V., Angelico R., Porto M., Calandra P., Abe A.A., Testa F., Bartucca C., Oliviero Rossi C., Caputo P.* // *Molecules*. 2024. V. 29. P. 301.
<https://doi.org/10.3390/molecules29020301>
10. *Aqif M., Shah M.U.H., Khan R., Umar M., Haider S., Razak S.I.A., Wahit M.U., Khan S.U.-D., Sivapragasam M., Ullah S., Nawaz R.* // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2024. V. 31. P. 47475–47504.
<https://doi.org/10.1007/s11356-024-34248-z>
11. *Naughton P.J., Marchant R., Naughton V., Banat I.M.* // *J. Appl. Microbiol.* 2019. V. 127. P. 12–28.
<https://doi.org/10.1111/jam.14243>
12. *Sarubbo L.A., Silva M.G.C., Durval I.J.B., Bezerra K.G.O., Ribeiro B.G., Silva I.A., Twigg M.S., Banat I.M.* // *Biochem. Engineer. J.* 2022. V. 181. P. 108377.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>
13. *Arima K., Kakinuma A., Tamura G.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1968. V. 31. P. 488–494.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90503-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90503-2)
14. *Rahman F.B., Sarkar B., Moni R., Rahman M.S.* // *Biotechnol. Rep. (Amst).* 2021. V. 32. P. e00686.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00686>
15. *Saiyam D., Dubey A., Malla M.A., Kumar A.* // *Braz. J. Microbiol.* 2024. V. 55. P. 281–295.
<https://doi.org/10.1007/s42770-023-01228-3>
16. *Кисиль О.В., Трефилов В.С., Садыкова В.С., Зверева М.Э., Кубарева Е.А.* // *Прикл. биохим. микробиол. Т. 59. С. 1–13.*
<https://doi.org/10.31857/S0555109923010026>
17. *Qi X., Liu W., He X., Du C.* // *Arch. Microbiol.* 2023. V. 205. P. 313.
<https://doi.org/10.1007/s00203-023-03652-3>
18. *Zhen C., Ge X.-F., Lu Y.-T., Liu W.-Z.* // *AIMS Microbiol.* 2023. V. 9. P. 195–217.
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2023012>
19. *Xia L., Wen J.* // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2023. V. 43. P. 1111–1128.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2095252>
20. *Karamchandani B.M., Pawar A.A., Pawar S.S., Syed S., Mone N.S., Dalvi S.G., Rahman P.K.S.M., Banat I.M., Satpute S.K.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. P. 1047279.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1047279>
21. *Pardhi D.S., Panchal R.R., Raval V.H., Joshi R.G., Poczai P., Almalki W.H., Rajput K.N.* // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. P. 982603.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982603>
22. *Chen X., Lu Y., Shan M., Zhao H., Lu Z., Lu Y.* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 38. P. 143.
<https://doi.org/10.1007/s11274-022-03323-3>
23. *Nitschke M., Marangon C.A.* // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2022. V. 42. P. 294–310.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1933890>
24. *Mishra S., Lin Z., Pang S., Zhang Y., Bhatt P., Chen S.* // *J. Hazard Mater.* 2021. V. 418. P. 126253.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126253>
25. *Aziz Z.A.A., Setapar S.H.M., Khatoon A., Ahmad A.* // In: *Biosurfactants for a Sustainable Future: Production and Applications in the Environment and Biomedicine. Chapter 18* / Ed. Sarma H., Prasad M.N.V. Wiley, 2021. P. 397–421.
<https://doi.org/10.1002/9781119671022.ch18>
26. *Yang R., Lei S., Xu X., Jin H., Sun H., Zhao X., Pang B., Shi J.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. P. 8077–8087.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10801-x>
27. *Sajid M., Khan M.S.A., Cameotra S.S., Al-Thubiani A.S.* // *Immunol. Lett.* 2020. V. 223. P. 71–77.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.04.003>
28. *Penha R.O., Vandenberghe L.P.S., Faulds C., Soccol V.T., Soccol C.R.* // *Planta*. 2020. V. 251. P. 70.
<https://doi.org/10.1007/s00425-020-03357-7>
29. *Jahan R., Bodratti A.M., Tsiannou M., Alexandridis P.* // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2020. V. 275. P. 102061.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
30. *Fenibo E.O., Ifoma G.N., Selvarajan R., Chikere C.B.* // *Microorganisms*. 2019. V. 7. P. 581.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7110581>

31. Zanotto A.W., Valério A., De Andrade C.J., Pastore G.M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 8647–8656.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10123-7>
32. Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M. // *J. Nat. Prod.* 2019. V. 82. P. 2038–2053.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>
33. Hu F., Liu Y., Li S. // *Microb. Cell Fact.* 2019. V. 18. P. 42.
<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1089-x>
34. Patel S., Homaei A., Patil S., Daverey A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 27–37.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9434-2>
35. Hayes D.G., Solaiman D.K., Ashby R.D. // *Biobased Surfactants*. Amsterdam: Elsevier, 2019.
<https://doi.org/10.1016/C2016-0-03179-0>
36. Zhao P., Xue Y., Gao W., Li J., Zu X., Fu D., Bai X., Zuo Y., Hu Z., Zhang F. // *Peptides*. 2018. V. 101. P. 10–16.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.018>
37. Santos V.S.V., Silveira E., Pereira B.B. // *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 2018. V. 21. P. 382–399.
<https://doi.org/10.1080/10937404.2018.1564712>
38. Wu Y.-S., Ngai S.-C., Goh B.-H., Chan K.-G., Lee L.-H., Chuah L.-H. // *Front. Pharmacol.* 2017. V. 8. P. 761.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00761>
39. Najmi Z., Ebrahimipour G., Franzetti A., Banat I.M. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2018. V. 65. P. 523–532.
<https://doi.org/10.1002/bab.1641>
40. Zhao H., Shao D., Jiang C., J Shi J., Li Q., Huang Q., Rajoka M.S.R., Yang H., Jin M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. P. 5951–5960.
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>
41. Henkel M., Geissler M., Weggenmann F., Hausmann R. // *Biotechnol. J.* 2017. V. 12. P. 1600561.
<https://doi.org/10.1002/biot.201600561>
42. Otzen D.E. // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2017. V. 1859. P. 639–649.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.09.024>
43. Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. // *J. Biotechnol.* 2018. V. 285. P. 44–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
44. Bonmatin J.M., Genest M., Labbé H., Ptak M. // *Biopolymers*. 1994. V. 34. P. 975–986.
<https://doi.org/10.1002/bip.360340716>
45. Ishigami Y., Osman M., Nakahara H., Sano Y., Ishiguro R., Matsumoto M. // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 1995. V. 4. P. 341–348.
[https://doi.org/10.1016/0927-7765\(94\)01183-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(94)01183-6)
46. Соболева О.А., Царькова Л.А. // *Коллоид. журнал.* 2020. Т. 82. С. 476–487.
<https://doi.org/10.31857/S002329122004014X>
47. Dufour S., Deleu M., Nott K., Wathelet B., Thonart P., Paquot M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1726. P. 87–95.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.06.015>
48. Liu X.-Y., Yang S.-Z., Mu B.-Z. // *Process Biochem.* 2009. V. 44. P. 1144–1151.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.014>
49. Liu J.-F., Yang J., Yang S.-Z., Ye R.-Q., Mu B.-Z. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 166. P. 2091–2100.
<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9636-5>
50. Kracht M., Rokos H., Ozel M., Kowall M., Pauli G., Vater J. // *J. Antibiot.* 1999. V. 52. P. 613–619.
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.613>
51. Hu F., Cai W., Lin J., Wang W., Li S. // *Microb. Cell Fact.* 2021. V. 20. P. 96.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01585-4>
52. DeSanto K., Keer D.R. // *Patent Application US2012255918A1*, 2012.
53. Desanto K. // *Patent EP2046930A2*, 2012.
54. Lu J.-K., Wang H.-M., Xu X.-R. // *Patent US9364413B2*, 2016.
55. Park H.-S. // *Patent KR101501286B1*, 2015.
56. Bueno-Mancebo J., Barrena R., Artola A., Gea T., Altmajer-Vaz D. // *Int. J. Cosmet. Sci.* 2024. V. 46. P. 702–716.
<https://doi.org/10.1111/ics.12957>
57. Schloesser T., Jakupovic S., Katzer W., Kluge G., Siems K. // *Int. Patent Application WO2013037818A3*, 2014.
58. Lewińska A., Domżał-Kędzia M., Jaromin A., Łukaszewicz M. // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12. P. 953.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100953>
59. Leighton A. // *Patent US8592381B2*, 2013.
60. Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science / Ed. Altalhi T. Amsterdam: Elsevier, Chapter 5, 2023.
61. Ben Ayed H., Nasri R., Jemil N., Amor I.B., Gargouri J., Hmidet N., Nasri M. // *Chem. Biol. Interact.* 2015. V. 236. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.04.018>
62. Dehghan-Noude G., Housaindokht M., Bazzaz B.S.F. // *J. Microbiol.* 2005. V. 43. P. 272–276.
63. Fei D., Liu F.-F., Gang H.-Z., Liu J.-F., Yang S.-Z., Ye R.-Q., Mu B.-Z. // *Process Biochem.* 2020. V. 94. P. 164–171.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.022>

64. Johnson P., Trybala A., Starov V., Pinfield V.J. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2021. V. 288. P. 102340.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102340>
65. Surfactants market.
<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactants-market-493.html>
66. Lima T.M.S., Procópio L.C., Brandão F.D., Carvalho A.M.X., Tótolá M.R., Borges A.C. // *Biodegradation.* 2011. V. 22. P. 585–592.
<https://doi.org/10.1007/s10532-010-9431-3>
67. Hoefler B.C., Gorzelnik K.V., Yang J.Y., Hendricks N., Dorrestein P.C., Straight P.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 13082–13087.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1205586109>
68. Shao C., Liu L., Gang H., Yang S., Mu B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. P. 1855–1872.
<https://doi.org/10.3390/ijms16011855>
69. Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1488. P. 211–218.
[https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00124-4](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00124-4)
70. Pagadoy M., Peypoux F., Wallach J. // *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2005. V. 11. P. 195–202.
<https://doi.org/10.1007/s10989-005-6790-4>
71. Francius G., Dufour S., Deleu M., Paquot M., Mingeot-Leclercq M.-P., Dufrêne Y.F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1778. P. 2058–2068.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.03.023>
72. Bozhüyük K.A.J., Linck A., Tietze A., Kranz J., Wesche F., Nowak S., Fleischhacker F., Shi Y.-N., Grün P., Bode H.B. // *Nat. Chem.* 2019. V. 11. P. 653–661.
<https://doi.org/10.1038/s41557-019-0276-z>
73. Peypoux F., Bonmatin J.M., Wallach J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 51. P. 553–563.
<https://doi.org/10.1007/s002530051432>
74. Hsieh F.-C., Li M.-C., Lin T.-C., Kao S.-S. // *Curr. Microbiol.* 2004. V. 49. P. 186–191.
<https://doi.org/10.1007/s00284-004-4314-7>
75. Chen W.-C., Juang R.-S., Wei Y.-H. // *Biochem. Engineer. J.* 2015. V. 103. P. 158–169.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>
76. Liu Q., Lin J., Wang W., Huang H., Li S. // *Biochem. Engineer. J.* 2015. V. 93. P. 31–37.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.08.023>
77. Zhu L., Xu Q., Jiang L., Huang H., Li S. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e88207.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088207>
78. Yang H., Yu H., Shen Z. // *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 42. P. 1139–1147.
<https://doi.org/10.1007/s10295-015-1635-4>
79. Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю., Яковлева О.В., Курченко В.П. // Патент RU2270858C2, 2006.
80. De Andrade C.J., Barros F.F.C., de Andrade L.M., Rocco S.A., Sforça M.L., Pastore G.M., Jauregi P. // *J. Chem. Tech. Biotech.* 2016. V. 91. P. 3018–3027.
<https://doi.org/10.1002/jctb.4928>
81. Abdelraof M., Nooman M.U., Hashem A.H., Al-kashef A.S. // *BMC Microbiol.* 2024. V. 24. P. 193.
<https://doi.org/10.1186/s12866-024-03338-w>
82. Janek T., Gudiña E.J., Połomska X., Biniarz P., Jama D., Rodrigues L.R., Rymowicz W., Lazar Z. // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 3488.
<https://doi.org/10.3390/molecules26123488>
83. Willenbacher J., Yeremchuk W., Mohr T., Sylđatk C., Hausmann R. // *AMB Expr.* 2015. V. 5. P. 57.
<https://doi.org/10.1186/s13568-015-0145-0>
84. Abdel-Mawgoud A.M., Aboulwafa M.M., Hassouna N.A.-H. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008. V. 150. P. 305–325.
<https://doi.org/10.1007/s12010-008-8155-x>
85. Koim-Puchowska B., Kłosowski G., Drózdź-Afelt J.M., Mikulski D., Zielińska A. // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 2985.
<https://doi.org/10.3390/molecules26102985>
86. De Oliveira Schmidt V.K., de Souza Carvalho J., de Oliveira D., de Andrade C.J. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021. V. 37. P. 21.
<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02970-8>
87. De Oliveira Schmidt V.K., Durant Moraes P.A., Cesca K., Soares Pereira L.P., de Andrade L.M., Mendes M.A., de Oliveira D., de Andrade C.J. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2023. V. 39. P. 82.
<https://doi.org/10.1007/s11274-023-03529-z>
88. Geissler M., Kühle I., Heravi K.M., Altenbuchner J., Henkel M., Hausmann R. // *AMB Expr.* 2019. V. 9. P. 84.
89. Wu Q., Zhi Y., Xu Y. // *Metab. Eng.* 2019. V. 52. P. 87–97.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.11.004>
90. Guo Z., Sun J., Ma Q., Li M., Dou Y., Yang S., Gao X. // *Microorganisms.* 2024. V. 12. P. 998.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12050998>
91. Nakano M.M., Corbell N., Besson J., Zuber P. // *Mol. Gen. Genet.* 1992. V. 232. P. 313–321.
<https://doi.org/10.1007/BF00280011>
92. Nakano M.M., Magnuson R., Myers A., Curry J., Grossman A.D., Zuber P. // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 1770–1778.
<https://doi.org/10.1128/jb.173.5.1770-1778.1991>

93. Трефилов В.С., Лабанов В.А., Хренова М.Г., Панова Т.В., Родин В.А., Савицкая В.Ю., Кубарева Е.А., Зверева М.Э. // Биотехнология. 2023. Т. 39. С. 61–69.
<https://doi.org/10.56304/S0234275823050125>
94. Zhi Y., Wu Q., Xu Y. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 40976.
<https://doi.org/10.1038/srep40976>
95. Zhao J., Li Y., Zhang C., Yao Z., Zhang L., Bie X., Lu F., Lu Z. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 39. P. 889–896.
<https://doi.org/10.1007/s10295-012-1098-9>
96. Liu X., Ren B., Chen M., Wang H., Kokare C.R., Zhou X., Wang J., Dai H., Song F., Liu M., Wang J., Wang S., Zhang L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. P. 1881–1893.
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2653-9>
97. Lin S.-C., Lin K.-G., Lo C.-C., Lin Y.-M. // Enzyme Microb. Technol. 1998. V. 23. P. 267–273.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00049-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00049-0)
98. Pekin G., Vardar-Sukan F., Kosaric N. // Eng. Life Sci. 2005. V. 5. P. 357–362.
<https://doi.org/10.1002/elsc.200520086>
99. Klausmann P., Hennemann K., Hoffmann M., Treinen C., Aschern M., Lilge L., Heravi K.M., Henkel M., Hausmann R. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2021. V. 105. P. 4141–4151.
<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11330-x>
100. Ali N., Pang Z., Wang F., Xu B., El-Seedi H.R. // J. Food Quality. 2022. V. 2022. P. 1–19.
<https://doi.org/10.1155/2022/3930112>
101. Nanjundan J., Ramasamy R., Uthandi S., Ponanusamy M. // Microb. Pathog. 2019. V. 128. P. 374–380.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.037>
102. Barale S.S., Ghane S.G., Sonawane K.D. // AMB Expr. 2022. V. 12. P. 7.
<https://doi.org/10.1186/s13568-022-01348-3>
103. Yu F., Du Y., Deng S., Jin M., Zhang D., Zhao M., Yin J., Long X. // Separ. Purif. Technol. 2023. V. 304. P. 122278.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.122278>
104. Hiraoka H., Asaka O., Ano T., Shoda M. // J. Gen. Appl. Microbiol. 1992. V. 38. P. 635–640.
<https://doi.org/10.2323/jgam.38.635>
105. Mubarak M.Q.E., Hassan A.R., Hamid A.A., Khalil S., Isa M.H.M. // JSM. 2015. V. 44. P. 115–120.
106. Al-Ajlani M.M., Sheikh M.A., Ahmad Z., Hasnain S. // Microb. Cell Fact. 2007. V. 6. P. 17.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-17>
107. Santa Cruz Biotechnology.
https://www.scbt.com/p/surfactin-24730-31-2?srsId=AfmBOop_AbaPbhmC3HSUOLueKLiqB3jr_7vF5yqnKaErYNC57Ncdc8d
108. Sigma-Aldrich.
<https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/sigma/s3523>
109. Focus Biomolecules.
<https://focusbiomolecules.com/surfactin-lipopeptide-biosurfactant/>
110. De Faria A.F., Teodoro-Martinez D.S., de Oliveira Barbosa G.N., Vaz B.G., Silva I.S., Garcia J.S., Tótola M.R., Eberlin M.N., Grossman M., Alves O.L., Durrant L.R. // Process Biochem. 2011. V. 46. P. 1951–1957.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.001>
111. Dlamini B., Rangarajan V., Clarke K.G. // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2020. V. 25. P. 101587.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101587>
112. United Nations Office on Drugs and Crime // Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. United Nations, New York, 2009.
113. Ghorbani S., Sonboli A., Ebrahimi S.N., Mirjalili M.H. // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2020. V. 25. P. 101585.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101585>
114. Jamshidi-Aidji M., Dimkić I., Ristivojević P., Staneković S., Morlock G.E. // J. Chromatogr. A. 2019. V. 1605. P. 460366.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460366>
115. Merck HPTLC.
<https://www.merckmillipore.com/RU/ru/analytics-sample-preparation/learning-center-thin-layer-chromatography/hptlc/NGub.qB.fCoAAAFVPMJDx07N.nav>
116. Pharmatutor.
<https://www.pharmatutor.org/articles/high-performance-thin-layer-chromatography-hptlc-nstrumentation-overview>
117. Geissler M., Oellig C., Moss K., Schwack W., Henkel M., Hausmann R. // J. Chromatogr. B. 2017. V. 1044–1045. P. 214–224.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.013>
118. Yang H., Li X., Li X., Yu H., Shen Z. // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. P. 2529–2542.
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-8486-8>
119. Grangemard I., Peypoux F., Wallach J., Das B.C., Labbé H., Caille A., Genest M., Maget-Dana R., Ptak M., Bonmatin J.-M. // J. Peptide Sci. 1997. V. 3. P. 145–154.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1387\(199703\)3:2<145::AID-PSC96>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1387(199703)3:2<145::AID-PSC96>3.0.CO;2-Y)

120. Kowall M., Vater J., Kluge B., Stein T., Franke P., Ziessow D. // *J. Colloid Interface Sci.* 1998. V. 204. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5558>
121. Ahimou F., Jacques P., Deleu M. // *Enzyme Microb. Technol.* 2000. V. 27. P. 749–754.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00295-7)
122. Das P., Mukherjee S., Sen R. // *J. Appl. Microbiol.* 2008. V. 104. P. 1675–1684.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x>
123. Nakayama S., Takahashi S., Hirai M., Shoda M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997. V. 48. P. 80–82.
<https://doi.org/10.1007/s002530051018>
124. Sarwar A., Hassan M.N., Imran M., Iqbal M., Majeed S., Brader G., Sessitsch A., Hafeez Y.F. // *Microbiol. Res.* 2018. V. 209. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.006>
125. Li Y., Yang S., Mu B. // *Anal. Lett.* 2010. V. 43. P. 929–940.
<https://doi.org/10.1080/00032710903491047>
126. Kinsella K., Schulthess C.P., Morris T.F., Stuart J.D. // *Soil Biol. Biochem.* 2009. V. 41. P. 374–379.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.11.019>
127. Loiseau C., Schlusshuber M., Bigot R., Bertaux J., Berjeaud J.-M., Verdon J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 5083–5093.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6317-z>
128. Isa M.H.M., Shamsudin N.H., Al-Shorgani N.K.N., Alsharjabi F.A., Kalil M.S. // *Food Biotechnol.* 2020. V. 34. P. 1–24.
<https://doi.org/10.1080/08905436.2019.1710843>
129. Zhou Y., Yang X., Li Q., Peng Z., Li J., Zhang J. // *BMC Microbiol.* 2023. V. 23. P. 117.
<https://doi.org/10.1186/s12866-023-02838-5>
130. Rangarajan V., Clarke K.G. // *Process Biochem.* 2016. V. 51. P. 2176–2185.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.08.026>
131. Jun Y., Waseem R., Qiwei H., Qirong S. // *J. Chromatogr. B.* 2011. V. 879. P. 2746–2750.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.041>
132. Deng Q., Wang W., Sun L., Wang Y., Liao J., Xu D., Liu Y., Ye R., Gooneratne R. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2017. V. 409. P. 179–191.
<https://doi.org/10.1007/s00216-016-9984-z>
133. Томашевич Н.С., Сидорова Т.М., Аллахвердян В.В., Асатурица А.М. // *Юг России: экология, развитие.* 2023. Т. 67. С. 70–81.
<https://doi.org/10.18470/1992-1098-2023-2-70-81>
134. Vater J., Kablitz B., Wilde C., Franke P., Mehta N., Cameotra S.S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 6210–6219.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6210-6219.2002>
135. Doherty J.R., Roberts J.A. // *Plant Dis.* 2023. V. 107. P. 2346–2351.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-07-22-1629-RE>
136. Thompson D.N., Fox S.L., Bala G.A. // *ABAB.* 2000. V. 84–86. P. 917–930.
https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1392-5_71
137. Jha S.S., Joshi S.J., Geetha S.J. // *Braz. J. Microbiol.* 2016. V. 47. P. 955–964.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.006>
138. Kumar A., Saini P., Shrivastava J.N. // *Indian J. Exp. Biol.* 2009. V. 47. P. 57–62.
139. Zongwang M., Songya Z., Shihu Z., Guoyang W., Yue S., Quanfeng M., Junyu L., Kun S., Jiangchun H. // *J. Antibiot.* 2020. V. 73. P. 863–867.
<https://doi.org/10.1038/s41429-020-0347-9>
140. Vass E., Besson F., Majer Z., Volpon L., Hollósi M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 282. P. 361–367.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4469>
141. Ferré G., Besson F., Buchet R. // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 1997. V. 53. P. 623–635.
[https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(96\)01787-8](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(96)01787-8)
142. Zhang J., Li Y. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 118. P. 244–251.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.051>
143. Augustyn A.R., Pott R.W.M., Tadie M. // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects.* 2021. V. 627. P. 127122.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127122>
144. Carrillo C., Teruel J.A., Aranda F.J., Ortiz A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1611. P. 91–97.
[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00029-4)
145. Park G., Nam J., Kim J., Song J., Kim P.I., Jung Min H., Won Lee C. // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2019. V. 40. P. 704–709.
<https://doi.org/10.1002/bkcs.11757>
146. Zhou G.F., Yang L., Zhang S.H., Wang Y., Yang Y., Xu R., Zhao X., Nie D., Shan J., Cui C.B., Li C.W. // *Nat. Prod. Res.* 2022. V. 36. P. 5222–5227.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1926457>
147. Tsan P., Volpon L., Besson F., Lancelin J.-M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 1968–1977.
<https://doi.org/10.1021/ja066117q>
148. Stein T. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008. V. 22. P. 1146–1152.
<https://doi.org/10.1002/rcm.3481>
149. Moro G.V., Almeida R.T.R., Napp A.P., Porto C., Pilau E.J., Lüdtke D.S., Moro A.V., Vainstein M.H. // *Microb. Biotechnol.* 2018. V. 11. P. 759–769.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13276>
150. Luzzatto-Knaan T., Melnik A.V., Dorrestein P.C. // *ACS Chem. Biol.* 2019. V. 14. P. 459–467.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b01120>

Instrumental Approaches to the Detection and Quantification of Surfactin

V. S. Trefilov*, E. Y. Lindin*, M. V. Monakhova**, O. V. Kisil***, M. B. Viryasov**,
T. S. Oretskaya**,[#] and E. A. Kubareva**

[#] Phone: +7 (916) 206-41-02; e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru

* Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1, Moscow, 119991 Russia

** A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1, Moscow, 119991 Russia

*** FSBI Gause Institute of New Antibiotics, ul. Bolshaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119021 Russia

Microorganisms are able to produce a wide variety of biological surfactants, also known as biosurfactants. The potential for using biosurfactants in different areas of human life requires the development and improvement of methods to find producer strains, determine the content of biosurfactants in different natural samples, as well as to upgrade the approaches to isolation and purification of these substances. This review focuses on the data concerning the structure, properties, and methods of surfactin synthesis, which is one of the most interesting members of the lipopeptides that are related to biosurfactants. Information regarding the structure, properties, and applications of surfactin, methods for producing surfactin and its derivatives; instrumental techniques for detecting surfactin, including various types of chromatography (TLC, HPLC, and HPLC-MS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), and mass spectrometry (MS) was summarized, and analyzed. The review provides an analysis of instrumental approaches used to detect and measure surfactin in bacterial cultures, discussing their accessibility, sensitivity, selectivity, and overall effectiveness.

Keywords: biological surfactants, surfactin, *Bacillus* spp.