

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

А. С. ГОРДЕЕВ, С. В. БЕЛЯКОВА, Г. Ш. ГАЛИЕВА, Л.Р. БИКТАШЕВА

**ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В АНАЛИЗЕ
БИОСУРФАКТАНТОВ ЛИПОПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ**

Учебно-методическое пособие к лабораторному практикуму

КАЗАНЬ

2025

УДК 543.42.061
ББК 24.23, 28.072

*Рекомендовано учебно-методической комиссией
Института экологии и природопользования
(Протокол № ЦЦ от ЪЪ июля ХХХ г.)*

Рецензенты:

Доктор биологических наук, профессор **Степанова Н.Ю.**

Гордеев А.С., Белякова С.В., Галиева Г.Ш., Бикташева Л.Р.

Инфракрасная спектроскопия в анализе биосурфактантов липопептидной природы: учебно-методическое пособие / А.С. Гордеев, С.В. Белякова, Г.Ш. Галиева, Л.Р. Бикташева. - Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2025. - 00 с.

ISBN

Учебно-методическое пособие содержит теоретические основы и практические указания по применению инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИК-Фурье спектроскопии) для идентификации биосурфактантов липопептидной природы. В пособии подробно описаны методы пробоподготовки, регистрации спектров и интерпретации характеристических полос поглощения, специфичных для функциональных групп липопептидов. Представлены алгоритмы анализа спектров и примеры спектральных характеристик известных липопептидных биосурфактантов. Предназначено для бакалавров и магистров, обучающихся по направлениям «Биотехнология», при выполнении лабораторных работ, курсовых и выпускных квалификационных работ. Может быть полезно аспирантам и исследователям, работающим в области биохимии микробных поверхностно-активных веществ.

УДК 543.42.061
ББК 24.23, 28.072

ISBN

© Гордеев А.С., 2025
© Белякова С.В., 2025
© Галиева Г.Ш., 2025
© Бикташева Л.Р., 2025
© Издательство Казанского
университета, 2025

Содержание

1. Очистка липопептидных биосурфактантов	4
2. Регистрация спектра биоПАВ, продуцируемого микроорганизмами рода <i>Bacillus</i>	6
3. Обработка ИК-спектра	7
4. Анализ ИК-спектров липопептидных биосурфактантов	8
5. Контрольные вопросы.....	14
Список литературы.....	15

1. Подготовка липопептидных биосурфактантов к измерениям

ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье анализирует взаимодействие молекул с электромагнитным излучением в диапазоне $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$. При поглощении фотонов возникают колебательные переходы, соответствующие изменению длин связей и углов между атомами. Каждая функциональная группа поглощает на строго определенных частотах, формируя уникальный "спектральный отпечаток". Например, гидроксильные группы (O–H) проявляются в области $3600\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ широкой интенсивной полосой (спирты, карбоновые кислоты, полисахариды). Амидные/аминные связи (N–H) дают сигналы при $3500\text{--}3300\text{ см}^{-1}$, часто с "раздвоением" для первичных аминов. Углеводородные фрагменты (C–H) демонстрируют резкие пики при $2960\text{--}2850\text{ см}^{-1}$ (асимметричные и симметричные колебания CH_2/CH_3). Карбонильные группы (C=O) — наиболее интенсивные полосы в диапазоне $1750\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ (для кетонов, альдегидов, амидов). Эфирные и гликозидные связи (C–O–C) образуют комплекс пиков в "отпечатковой области" $1200\text{--}1000\text{ см}^{-1}$.

Для биосурфактантов метод особенно информативен, так для биоПАВ класса липопептидов (сурфактин, итурин) идентификация будет производиться по дуэту амидных полос: амид I ($1680\text{--}1630\text{ см}^{-1}$, C=O пептидной связи) указывает на вторичную структуру, где $1650\text{--}1660\text{ см}^{-1} \rightarrow \alpha$ -спираль, $1620\text{--}1640\text{ см}^{-1} \rightarrow \beta$ -лист, а также амид II ($1570\text{--}1520\text{ см}^{-1}$, деформация N–H + C–N). На спектрах гликолипидов (рамнолипиды, трегалозолипиды) проявляют: широкую полосу O–H сахаров ($3400\text{--}3200\text{ см}^{-1}$), интенсивный кластер C–O–C связей ($1150\text{--}1000\text{ см}^{-1}$), липидные "маркеры": C=O эфиров ($1740\text{--}1720\text{ см}^{-1}$) и C–H ($2920/2850\text{ см}^{-1}$), см. рис. 1 — пример спектра липопептида.

Бактериальные полисахариды (эмульсаны) отличаются преобладанием интенсивности OH-полосы ($3400\text{--}3200\text{ см}^{-1}$) и C–O–C колебаний ($1100\text{--}1000\text{ см}^{-1}$).

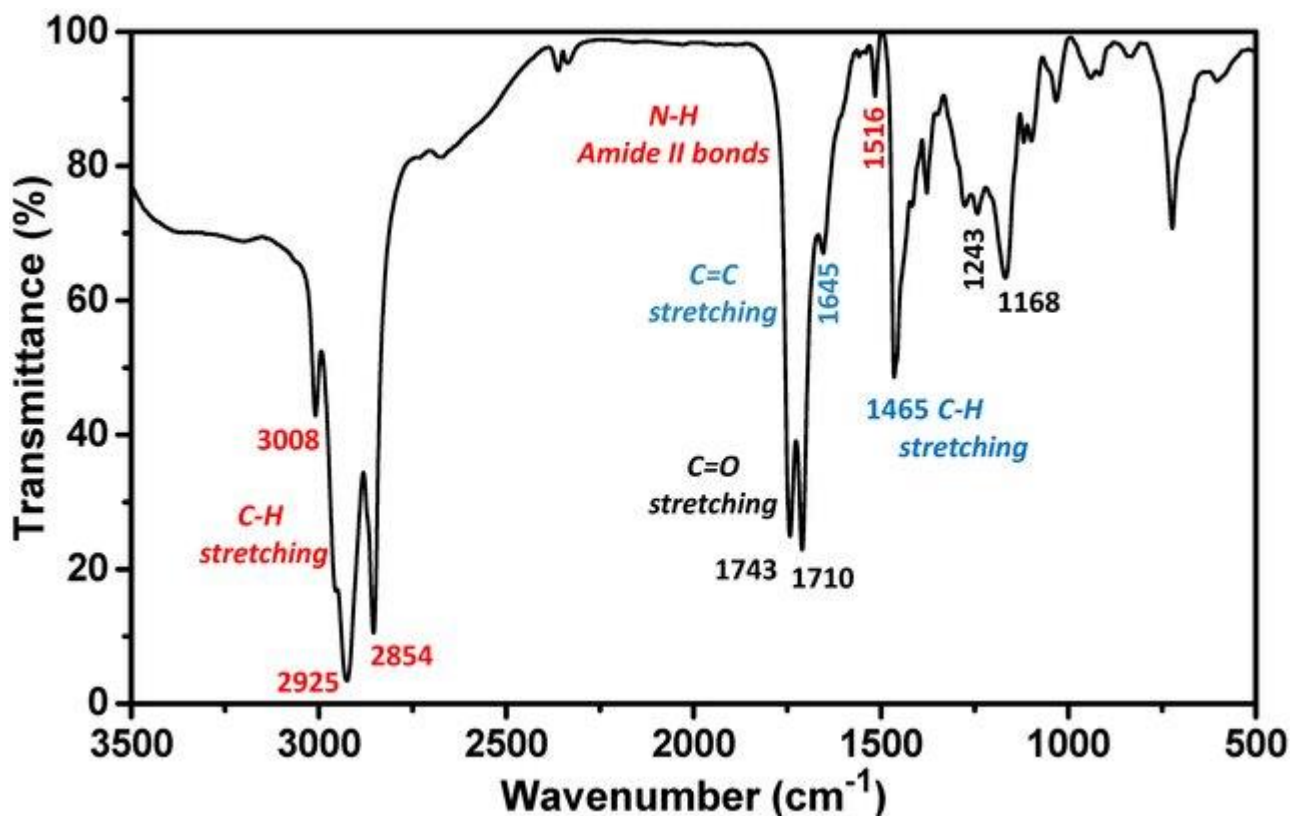


Рис. 1. ИК-спектр липопептида (DOI: 10.3390/nano7060139)

Средства измерений, реактивы и материалы

- центрифужные пробирки (стекло/пластик)
- мерные колбы, пипетки
- микролопатки
- безворсовые салфетки
- центрифуга (500 обор/мин)
- сушильный шкаф
- роторный испаритель

Порядок выполнения

1. Проводят кислотное осаждение: подкисление супернатанта раствором HCl до pH 2.0 вызывает агрегацию липопептидов.
2. Проводят экстракцию органическим растворителем: осадок обрабатывают смесью хлороформ:метанол (2:1) для извлечения гидрофобных компонентов (Banat, 2018).
3. Из образца удаляют воду: лиофилизация экстракта устраняет полосу 3400 cm^{-1} (деформация H_2O), мешающей анализу OH-групп.

Необходимо учитывать, что остатки растворителей (CHCl_3 : $750\text{--}800\text{ см}^{-1}$) дают ложные пики. Как правило, необходима дополнительная сушка в вакууме. Минимальная концентрация при изготовлении KBr таблеток: 1–2% (1–2 мг на 100 мг KBr). Гигроскопичность KBr требует строгого контроля влажности:

- 1) Сушат KBr при 110°C в течение 4 ч;
- 2) Прессование таблеток проводят при относительной влажности до 20%;
- 3) Хранят в эксикаторе над P_2O_5 .

2. Регистрация спектра биоПАВ, продуцируемого микроорганизмами рода *Bacillus*

Идентификация липопептидных биоПАВ, продуцируемых бактериями рода *Bacillus*, с помощью FTIR-спектроскопии представляет собой стандартизированный процесс, включающий последовательные этапы от подготовки образца до интерпретации спектра. Основная цель – подтверждение липопептидной природы вещества и предварительная идентификация его класса (сурфактин, итурин, фенгицин и др.) на основе характерных спектральных паттернов.

Средства измерений, реактивы и материалы

- микролопатки
- безворсовые салфетки
- Компьютер
- Программное обеспечение ИК-спектрометра
- ИК-спектрометр
- Кюветы ИК-спектрометра

Порядок выполнения

После включения и прогрева FTIR-спектрометра (согласно инструкции производителя, обычно 15–30 мин) устанавливают стандартные параметры сканирования: спектральный диапазон $4000 - 600\text{ см}^{-1}$ (или $4000 - 400\text{ см}^{-1}$), разрешение 4 см^{-1} (обеспечивает хороший баланс между качеством спектра и временем регистрации), число сканов 32 (достаточно для большинства образцов при хорошем контакте в ATR; для слабых сигналов или KBr можно увеличить до 64–128). Перед регистрацией спектра образца регистрируют фоновый спектр либо

на чистом кристалле НПВО (для АTR-метода), либо в пустом держателе (для пропускания). Фоновый спектр необходимо регулярно обновлять (каждые 30-60 мин или после очистки кристалла). После установки подготовленного образца запускают регистрацию его спектра.

Перед регистрацией спектра образца необходимо записать фоновый спектр (Background). Для АTR-метода фоновый спектр регистрируется с чистым, сухим кристаллом (или с прижимным устройством в том же положении, но без образца), для пропускательных методов - с пустой кюветой или держателем в измерительном канале. Запустите регистрацию спектра образца. После завершения сканирования визуально оцените качество спектра: интенсивность наиболее сильных пиков не должна быть запределной (не зашкаливать), уровень шума должен быть низким, форма пиков четкой. При необходимости повторите измерения, установив другие параметры (например, увеличьте число сканов до 64 при низкой концентрации) или проверьте качество подготовки образца/контакта.

3. Обработка ИК-спектра

Полученные данные обрабатывают с использованием программного обеспечения спектрометра. Первым шагом является автоматическое вычитание фона (записанного перед измерением образца). Далее выполняется коррекция базовой линии для устранения ее наклона или нелинейности; для этого обычно применяют полиномиальную (линейную или квадратичную) или мульти-точечную коррекцию, стараясь не исказить форму анализируемых полос поглощения. Для спектров, полученных методом АTR, следует применить встроенную АTR-коррекцию (функция ATR-correction в ПО), которая компенсирует зависимость глубины проникновения от длины волны и разницу в коэффициентах преломления, делая спектр визуально сопоставимым со спектром пропускания. Для удобства визуального сравнения спектров часто проводят их нормирование (обычно по наиболее интенсивной полосе, например, амиду I $\sim 1650 \text{ см}^{-1}$ или валентным C-H $\sim 2920 \text{ см}^{-1}$).

Средства измерений, реактивы и материалы

- Компьютер
- Программное обеспечения ИК-спектрометра
- ИК-спектрометр

Порядок выполнения

Полученный спектр подвергают ряду математических преобразований для улучшения интерпретируемости с использованием функций программного обеспечения спектрометра:

1. Автоматическое вычитание фона: применяется к спектру образца с использованием записанного фонового спектра.
2. Коррекция базовой линии (Baseline Correction): выполняется для устранения наклона или нелинейного смещения базовой линии, не связанного с реальным поглощением образца. Наиболее часто используется полиномиальная коррекция (линейная - Polynomial Order 1, или квадратичная - Order 2). Точки коррекции выбирают в областях, где нет полос поглощения образца (например, $\sim 2400\text{ см}^{-1}$, $\sim 1900\text{ см}^{-1}$). Коррекцию проводят осторожно, чтобы не исказить форму анализируемых пиков.
3. АТР-коррекция (если применимо): для спектров, полученных методом АТР, применяют встроенную коррекцию (ATR-correction), которая учитывает зависимость глубины проникновения от длины волны и разницу коэффициентов преломления образца и кристалла. Это преобразует спектр к виду, сопоставимому со спектром пропускания.
4. Нормирование (Normalization): для удобства визуального сравнения нескольких спектров их часто нормируют по интенсивности самой сильной полосы поглощения. Для липопептидов обычно нормируют по пику Амид I ($\sim 1650\text{ см}^{-1}$) или по валентным колебаниям С-Н ($\sim 2920\text{ см}^{-1}$). *Примечание: Нормирование изменяет относительные интенсивности и не применяется при количественном анализе.*
5. Вычитание спектра растворителя/воды (при необходимости): если в спектре присутствуют интенсивные полосы от остаточного растворителя (особенно воды, О-Н изгиб $\sim 1640\text{ см}^{-1}$) или матрицы (вазелиновое масло), можно использовать функцию спектрального вычитания, чтобы минимизировать их вклад. Требуется наличия записанного спектра чистого интерферента.

4. Анализ ИК-спектров липопептидных биосурфактантов

Основная задача этого этапа — идентификация ключевых полос поглощения, характерных для липопептидов, и их интерпретация для подтверждения природы образца и предварительной классификации.

Ключ к идентификации липопептидов лежит в анализе положения, формы, интенсивности и соотношения характерных полос поглощения:

- 1) Область 3300-3500 см^{-1} : Широкая полоса, обусловленная валентными колебаниями N-H амидных групп (Амид А) и O-H групп (при наличии остаточной воды, карбоновых кислот или спиртов). Остаточная вода дает интенсивную широкую полосу, маскирующую эту область.
- 2) Область 2800-3000 см^{-1} : Интенсивные дублеты при $\sim 2920 \text{ см}^{-1}$ (асимметричные валентные C-H) и $\sim 2850 \text{ см}^{-1}$ (симметричные валентные C-H) групп CH_2 и CH_3 липидного хвоста липопептидов. Это ключевой маркер липофильной части молекулы.
- 3) Область 1700-1750 см^{-1} : Появление отчетливого пика в области ~ 1735 - 1740 см^{-1} указывает на наличие сложноэфирной карбонильной группы (C=O), характерной, например, для лактонового кольца сурфактинов и фенгицинов. Отсутствие или слабая интенсивность этого пика типичны для итуринов.
- 4) Область 1500-1700 см^{-1} (Амидные полосы):

Амид I (~ 1640 - 1680 см^{-1}): Важнейшая полоса, обусловленная в основном валентными колебаниями C=O пептидной связи. Ее точное положение является индикатором вторичной структуры пептидного остова: ~ 1650 - 1660 см^{-1} – α -спираль (наиболее типична для липопептидов *Bacillus*), ~ 1630 - 1640 см^{-1} – β -лист, ~ 1660 - 1680 см^{-1} – повороты, ~ 1640 - 1650 см^{-1} – неупорядоченная структура. Это видно на рис. 2, демонстрирующем ИК-спектр сурфактина

Амид II (~ 1540 - 1560 см^{-1}): Обусловлена деформационными колебаниями N-H и валентными C-N. Дополняет информацию Амида I о структуре.

- 5) "Fingerprint" область (1000 - 1500 см^{-1}): содержит сложные колебания (C-O, C-N, деформационные C-H), формирующие уникальный "отпечаток пальца" молекулы. Ключевая область для дифференциации различных классов липопептидов (сурфактин vs итурин vs фенгицин) на основе характерных паттернов пиков.
- 6) Пик $\sim 720 \text{ см}^{-1}$: Характерное "качание" (rocking) CH_2 -групп, указывающее на наличие длинных алифатических цепей.

Сравнение полученного спектра с опубликованными спектрами известных липопептидов *Bacillus* (записанными в аналогичных условиях, ATR vs ATR, KBr vs KBr) и анализ характерных паттернов позволяет сделать предварительный вывод о классе вещества. Например, сочетание сильного пика сложного эфира ($\sim 1735\text{ см}^{-1}$), выраженных C–H пиков и Амида I $\sim 1655\text{ см}^{-1}$ характерно для сурфактинов. Итурины обычно не имеют сильного пика сложного эфира, а их Амид I может указывать на наличие β -листовой структуры ($\sim 1630\text{--}1640\text{ см}^{-1}$). Следует помнить, что FTIR дает информацию о функциональных группах и классе соединений. Для точной идентификации конкретного липопептида и определения его структуры необходимы дополнительные методы, такие как масс-спектрометрия (МС) и ядерно-магнитный резонанс (ЯМР).

Липопептиды, такие как сурфактин или итурин А, демонстрируют спектральные паттерны, сочетающие признаки пептидного ядра и липидного хвоста.

1. Пептидное ядро (диагностические маркеры):

Амид I ($1640\text{--}1680\text{ см}^{-1}$) — наиболее информативная полоса:

$1655\text{--}1660\text{ см}^{-1} \rightarrow \alpha$ -спиральная конформация (характерна для сурфактина *B. subtilis*), $1620\text{--}1635\text{ см}^{-1} \rightarrow \beta$ -листовая структура (доминирует в итурине А), сдвиг на $10\text{--}15\text{ см}^{-1}$ в кислой среде указывает на протонирование карбоксильных групп.

Амид II ($1540\text{--}1520\text{ см}^{-1}$) — уменьшение интенсивности при агрегации молекул.

2. Липидный компонент характеризуется резкими пиками C–H при 2920 см^{-1} (асимметричное νCH_2) и 2850 см^{-1} (симметричное νCH_2), а отсутствие сигналов эфиров ($1735\text{--}1740\text{ см}^{-1}$) отличает липопептиды от гликолипидов.

3. Критические артефакты: полоса $3400\text{ см}^{-1} \rightarrow$ требует контроля влажности образца; «плечо» $1710\text{ см}^{-1} \rightarrow$ окисление липидных цепей. Сравнительные характеристики спектров представлены в таблице 3.

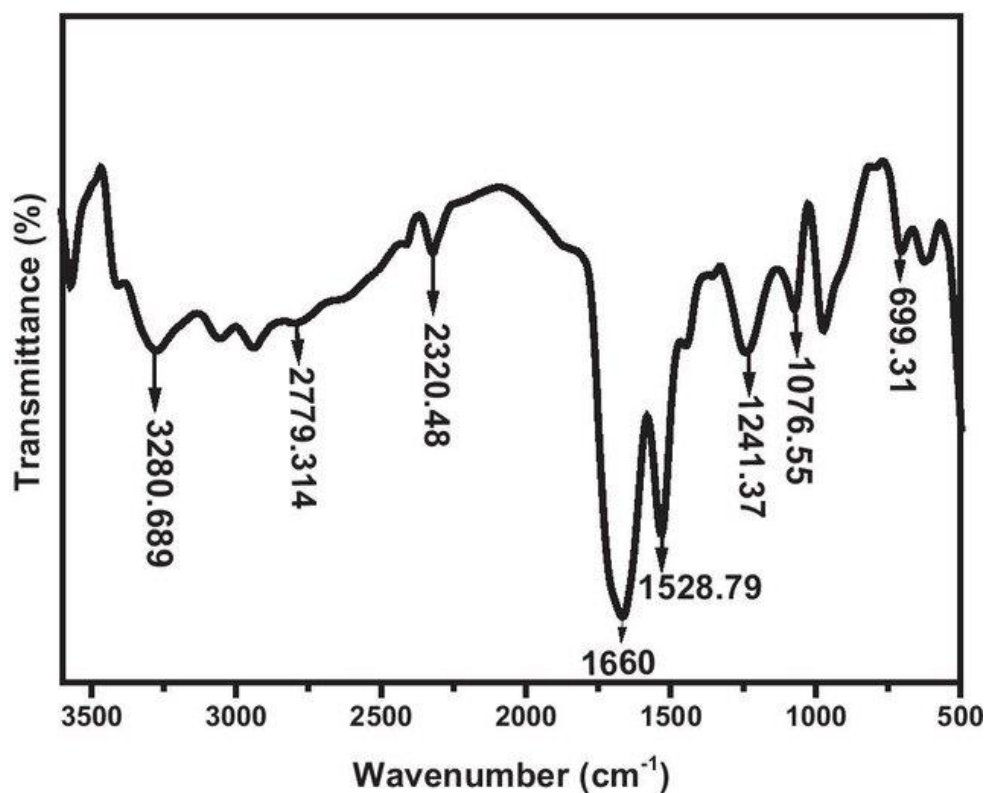


Рис. 2. ИК-спектр сурфактина
(DOI: 10.1007/s12010-021-03717-3)

Так, для сурфактина характерно положение сигнала амида I при 1660 см^{-1} (α -спираль) и симметричные C–H пики. При этом, для итурина пик амида I проявляется при 1630 см^{-1} (β -лист), отмечается сдвиг амида II к 1520 см^{-1} .

Таблица 3. Дифференциальная диагностика биосурфактантов

Признак	Липопептиды	Гликолипиды
Амид I/II	$1680\text{--}1520\text{ см}^{-1}$	Амид I/II: Отсутствуют или слабо выражены
C=O эфира	Нет	$1740\text{--}1720\text{ см}^{-1}$
C–O–C	Слабо выражены	$1150\text{--}1000\text{ см}^{-1}$
O–H	Узкая полоса	Широкая полоса

Средства измерений, реактивы и материалы

- Компьютер
- Программное обеспечения ИК-спектрометра
- ИК-спектрометр

Порядок выполнения

1. Идентификация ключевых полос:

Найдите интенсивные дублеты в области 2800-3000 см^{-1} ($\sim 2920 \text{ см}^{-1}$ и $\sim 2850 \text{ см}^{-1}$) — это валентные колебания С-Н групп алифатической цепи, маркер липофильной части.

Определите положение и интенсивность пика в области 1700-1750 см^{-1} — это может быть полоса С=О сложноэфирной группы ($\sim 1735 \text{ см}^{-1}$, характерна для сурфактинов) или карбоновой кислоты ($\sim 1710 \text{ см}^{-1}$).

Найдите самую интенсивную полосу в области 1500-1700 см^{-1} — это Амид I ($\sim 1640\text{-}1680 \text{ см}^{-1}$, С=О пептидной связи + С-N).

Найдите полосу Амид II ($\sim 1540\text{-}1560 \text{ см}^{-1}$, N-H деф. + С-N).

Осмотрите область 3200-3500 см^{-1} на наличие широкой полосы N-H/O-H.

Проанализируйте "fingerprint" область (1000-1500 см^{-1}) на предмет характерных паттернов.

2. Интерпретация:

Амид I: Точное положение пика Амид I дает информацию о вторичной структуре пептидного остова:

$\sim 1650\text{-}1660 \text{ см}^{-1}$: характерно для α -спиральной конформации (часто встречается у липопептидов *Bacillus*).

$\sim 1620\text{-}1640 \text{ см}^{-1}$: характерно для β -листовой структуры (может присутствовать у итуринов).

$\sim 1660\text{-}1680 \text{ см}^{-1}$: Повороты.

$\sim 1640\text{-}1650 \text{ см}^{-1}$: Неупорядоченная структура.

Соотношение интенсивностей: оцените соотношение интенсивностей пиков С-Н ($\sim 2920 \text{ см}^{-1}$) и Амида I ($\sim 1650 \text{ см}^{-1}$). Высокое соотношение может указывать на длинные или разветвленные липидные цепи.

Присутствие С=О сложного эфира ($\sim 1735 \text{ см}^{-1}$): Сильный пик характерен для сурфактинов и фенгицинов. Отсутствие или слабая интенсивность — для итуринов.

Поиск примесей: Проверьте наличие интенсивных полос, не характерных для липопептидов:

Широкая полоса воды при $\sim 3400 \text{ см}^{-1}$ (О-Н раст.) и $\sim 1640 \text{ см}^{-1}$ (О-Н изгиб).

Полосы остаточных растворителей (например, метанол: C-O $\sim 1030\text{ см}^{-1}$; хлороформ: C-H $\sim 3000\text{-}2900\text{ см}^{-1}$, C-Cl $\sim 750\text{-}800\text{ см}^{-1}$).

Интенсивные полосы вазелинового масла (C-H $\sim 2920, 2850, 1460, 1380\text{ см}^{-1}$) при его использовании.

Полосы неорганических солей (например, сульфатов $\sim 1100\text{ см}^{-1}$, нитратов $\sim 1380\text{ см}^{-1}$, карбонатов $\sim 1450, 880\text{ см}^{-1}$).

3. Графическое представление:

Приведите график обработанного ИК-спектра (после вычитания фона, коррекции базовой линии, ATR-коррекции, нормирования - если применялось) в диапазоне $4000\text{-}600\text{ см}^{-1}$.

Следует подписать оси: Волновое число (см^{-1}) по оси X, Пропускание, Transmittance (%) или Поглощение, Absorbance (%) по оси Y. Подпишите ключевые полосы поглощения стрелками или аннотациями непосредственно на графике (напр., " $\nu(\text{C-H}) \sim 2920, 2850\text{ см}^{-1}$ ", "Amide I $\sim 1655\text{ см}^{-1}$ ", " $\nu(\text{C=O})$ ester $\sim 1735\text{ см}^{-1}$ ").

4. Табличное представление:

Предоставьте таблицу, содержащую:

Волновое число (см^{-1}) основных наблюдаемых полос.

Интенсивность полосы (сильная - s, средняя - m, слабая - w, широкая - br).

Отнесение полосы к колебаниям функциональных групп (например: 2918 см^{-1} (s), $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$; 2850 см^{-1} (s), $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$; 1736 см^{-1} (m), $\nu(\text{C=O})$ ester; 1654 см^{-1} (vs), Amide I (α -helix); 1548 см^{-1} (m), Amide II).

5. Выводы: на основании проведенного анализа сформулируйте краткие выводы:

Подтверждение липопептидной природы: указать, что спектр содержит характерные полосы, однозначно свидетельствующие о наличии липопептида (сильные C-H валентные колебания, амидные полосы I и II).

Предварительная идентификация класса: сделать предположение о возможном классе липопептида (сурфактин, итурин, фенгицин) на основе характерных признаков (наличие/отсутствие пика сложного эфира, положение Амида I, паттерн в fingerprint области). Указать на необходимость подтверждения другими методами.

Оценка чистоты: отметить наличие или отсутствие выраженных полос примесей (вода, растворитель, неорганические соли).

Замечания по структуре: при возможности, отметить особенности вторичной структуры пептидной части (доминирование α -спирали, β -листов) на основе положения Амид I.

5. Контрольные вопросы

1. Почему для липопептидов критичен анализ амидных полос?
2. Объясните сдвиг амидной I полосы при изменении вторичной структуры.
3. Как отличить спектр липопептида от гликолипида?
4. Как подготовить к съемке образец, полученный при культивировании бактерий рода *Bacillus* и содержащий воду?
5. Почему для количественного ИК-анализа липопептидов в растворе *неприемлем* обычный хлороформ (CHCl_3), а *требуется* дейтерированный хлороформ (CDCl_3)? Какая конкретная помеха устраняется этим выбором?
6. Перечислите не менее трех обязательных требований к процедуре приготовления KBr-пеллеты для получения архивного спектра липопептида высокой четкости. Почему пренебрежение каждым из них может исказить результат?
7. Какая информация о молекулярной структуре липопептида может быть получена из точного положения полосы поглощения "Амид I" ($\sim 1650 \text{ см}^{-1}$) в ИК-спектре? Приведите примеры соответствия положения и структуры
8. Почему запись фонового спектра (background) является *обязательным* этапом *перед* каждым измерением образца методом ATR-FTIR, даже если кристалл кажется чистым? Что может произойти при использовании устаревшего фона?
9. После нанесения водного раствора липопептида на кристалл ATR в спектре доминирует широкая полоса поглощения воды, мешающая анализу амидных полос. Какое действие (кроме вычитания спектра воды) можно предпринять *перед* регистрацией спектра для минимизации этого вклада, и какие меры предосторожности при этом необходимы?

Список литературы

1. Тарасевич Б.Н. Основы ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье. – М.: МГУ, 2012. – 122 с.
2. Васильев А.В., Бугаенко Л.Т., Абрамов А.А. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений. – СПб: СПбГЛТА, 2007. – 148 с.
3. Banat I.M., Thavasi R. Microbial Biosurfactants and Their Environmental and Industrial Applications. – 1st ed. – Boca Raton: CRC Press, 2018. – 380 p.
4. Sachdev D.P., Cameotra S.S. Biosurfactants in agriculture // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2013. – Vol. 97, No. 3. – P. 1005–1016.
5. Kiefer J., Radzuan M.N., Winterburn J. Infrared spectroscopy for studying structure and aging effects in rhamnolipid biosurfactants // Applied Sciences. – 2017. – Vol. 7, No. 5. – P. 533.
6. Singh V., Saini P., Yadav A., Chauhan N., Parmar R., Pandey A. Assessment of rheological behaviour of water-in-oil emulsions mediated by glycolipid biosurfactant produced by *Bacillus megaterium* SPSW1001 // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2022. – Vol. 194, No. 3. – P. 1310–1326.
7. Gómez-Graña S., Pérez-Ameneiro M., Rivas J., López-Quintela M.A., Leis J.R., Bals S., van Tendeloo G. Biogenic synthesis of metal nanoparticles using a biosurfactant extracted from corn and their antimicrobial properties // Nanomaterials. – 2017. – Vol. 7, No. 6. – P. 139.