

Національна академія наук України
Відділення фізико-хімії горючих копалин
Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка

На правах рукопису

КАРПЕНКО ІЛОНА ВАСИЛІВНА

УДК 579.841.11:543.395:663

**БІОТЕХНОЛОГІЯ РАМНОЛІПІДНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ
ПРОДУКТІВ ШТАМУ *PSEUDOMONAS SP. PS-17* ТА ЇХ
ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ОЛІЙНИХ РОСЛИН**

03.00.20 – біотехнологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Науковий керівник
кандидат хімічних наук, ст. н. с.
Мідяна Галина Гргорівна,

Львів – 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	12
1.1 Біогенні ПАР та їх класифікація.....	12
1.1.1 Роль біоПАР у метаболізмі мікроорганізмів.....	12
1.1.2 Класифікація біоПАР.....	13
1.2 Розроблення технологій отримання мікробних ПАР.....	15
1.2.1 Підбір ефективних й економічно доцільних субстратів.....	15
1.2.2 Оптимізація технологій одержання цільових продуктів.....	18
1.3 Дослідження властивостей мікробних ПАР.....	19
1.3.1 Фізико-хімічні властивості біоПАР	19
1.3.2 Біологічні властивості мікробних ПАР.....	22
1.4 Галузі застосування.....	26
1.4.1 Біогенні ПАР у сучасному сільському господарстві.....	26
1.4.2 Використання препаратів на основі біоПАР як біопестицидів.	27
1.4.3 Використання біоПАР в агропрепаратах.....	30
Висновки до розділу 1.....	33
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ І МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	34
2.1 Культивування мікроорганізмів.....	35
2.2 Методи виділення, очищення, аналізу ПАР.....	36
2.3 Вивчення фізико-хімічних властивостей ПАР.....	40
2.4 Вивчення біологічної активності ПАР	41
2.5 Дослідження впливу біоПАР на рослини.....	43
2.6 Статистичний аналіз.....	44
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЙ РАМНОЛІДНИХ ПАР	
ШТАМУ <i>PSEUDOMONAS SP. PS-17</i>.....	45
3.1 Оптимізація синтезу рамноліпідних ПАР.....	45
3.2 Розроблення цільових продуктів штаму <i>Pseudomonas sp.</i>	

	PS-17.....	55
3.3	Фізико-хімічні властивості отриманих рамноліпідних ПАР.....	61
	Висновки до розділу 3.....	71
РОЗДІЛ 4	ЗАСТОСУВАННЯ РАМНОЛІПІДНИХ ПАР У	
	РОСЛИННИЦТВІ.....	72
4.1	Лабораторні дослідження по впливу рамноліпідних ПАР штаму <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17 на олійні рослини.....	73
4.2	Підвищення стійкості соняшнику до несприятливих умов за дії рамноліпідних ПАР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17.....	79
4.3	Дрібноділянкові та виробничі дослідження по впливу рамноліпідних ПАР штаму <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17 на олійні рослини.....	81
	Висновки до розділу 4.....	87
РОЗДІЛ 5	ТЕХНОЛОГІЯ РАМНОЛІПІДНИХ ПАР ШТАМУ	
	<i>PSEUDOMONAS</i> SP. PS-17.....	88
5.1	Технологічна та апаратурно-технологічна схеми одержання продуктів <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17.....	88
5.2	Розрахунок економічної ефективності технології отримання ПАР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17.....	99
	Висновки до розділу 5.....	104
РОЗДІЛ 6	АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	105
	ВИСНОВКИ.....	117
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	119

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АСБ	–	абсолютно суха біомаса
біоПАР	–	біогенні поверхнево-активні речовини
E ₂₄	–	індекс емульгування
ЕТС	–	Етилтіосульфонат
ЖК	–	жирні кислоти
ІОК	–	індолілоцтова кислота
ККМ	–	критична концентрація міцелоутворення
КП	–	комплексні препарати
КР	–	культуральна рідина
МБК	–	мінімальна біоцидна концентрація
МІК	–	мінімальна інгібувальна концентрація
МН	–	міжфазний натяг
МТС	–	Метилтіосульфонат
ПАР	–	поверхнево-активні речовини
ПМ	–	посівний матеріал
ПН	–	поверхневий натяг
РБК	–	рамноліпідний біокомплекс
РЛ	–	Рамноліпіди
СКР	–	супернатант культуральної рідини
ТП	–	технологічний процес
ТШХ	–	тонкошарова хроматографія
СМД	–	критичний фактор розведення (Critical Micelle Dilution)

ВСТУП

Актуальність теми. Розроблення екологічно безпечних агропрепаратів нового покоління з використанням біологічно активних речовин, нешкідливих для людей і довкілля, є актуальною проблемою сучасної біотехнології. Зважаючи на специфічні фізико-хімічні та біологічні властивості біогенних поверхнево-активних речовин (біоПАР), а саме: поверхнева, емульгувальна, змочувальна активність, вплив на проникність клітинних мембран, їх використання у препаратах для рослин є новим перспективним напрямком (Randhawa et al., 2014; Kiran et al., 2016). Важливими екологічними і технологічними перевагами біогенних ПАР перед синтетичними є біодеградабельність, низька токсичність, ефективність за низьких концентрацій, стабільність у широкому діапазоні значень температури, рН, вмісту солей у середовищі.

У попередніх дослідженнях було показано вплив біоПАР на ріст деяких злакових і бобових рослин (Карпенко і співавт., 2013). На нашу думку, актуальним завданням є створення ефективних, економічно вигідних препаратів на основі біоПАР для різних практично важливих культур, зокрема олійних. Іншою проблемою є розроблення стабільних композицій для рослин з підвищеною активністю, в яких біоПАР будуть виконувати функції солубілізаторів хімічних агрозасобів та регулювати їх транспорт у рослинні та мікробні клітини. Застосування біоПАР у таких композиціях дасть змогу зменшити робочі дози синтетичних регуляторів росту і засобів захисту рослин і відповідно знизити екологічне навантаження на довкілля. Це матиме велике значення для сучасного сільського господарства.

Успішне практичне впровадження біотехнологічних продуктів можливе тільки за наявності раціональних технологій їх виробництва. Проте, незважаючи на значний потенціал й переваги біогенних ПАР, їх застосування обмежено низкою технологічних й економічних чинників (низькі виходи,

висока собівартість) (Пирог і співавт., 2011). Тому актуальним завданням залишається удосконалення біотехнологій ПАР: підбір недорогої сировини, оптимізація процесів культивування та виділення продуктів (постферментаційні процеси), які, зазвичай, становлять 60-70 % собівартості (Rodrigues, 2006). У зв'язку з цим використання економічно вигідних субстратів та ефективних технологій виділення біоПАР, розроблення раціональних форм цільових продуктів є важливими складовими стратегії впровадження біоПАР у сучасні агротехнології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота є складовою частиною наукового напрямку Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М.Литвиненка НАН України – дослідження процесів мікробного синтезу біоПАР і пов'язана з виконанням таких бюджетних науково-дослідних тем: № 0110U005055 «Фізико-хімічні основи створення високоефективних поверхнево-активних систем на основі біогенних ліпідів, біополімерів та їх комплексів» (2011-2015 р.р.); договірної теми ДП/18-2009 «Розробка технології нового комплексного протигрибкового препарату на основі етилтіосульфанілату та біоПАР» (МОН України, НУ «Львівська політехніка» 2009-2010 р.р.), договірної теми ДЗ/1-2013 у рамках Державного замовлення «Розроблення препаратів на основі біоПАР для вирощування та захисту сільськогосподарської продукції» (МОН України, НУ «Львівська політехніка» 2013р.), проекту Українського науково-технологічного центру та НАН України № 5965 «Створення нових інгібіторів корозії металів для нафтогазової промисловості із застосуванням екологічно безпечних поверхнево-активних речовин: оптимізація біосинтезу ПАР та дослідження їх властивостей» (2014-2015 р.р.).

Мета і задачі досліджень. Метою роботи є розроблення раціональної біотехнології отримання препаратів на основі рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 та технологій їх застосування для вирощування олійних рослин.

Відповідно до поставленої мети визначено наступні задачі:

- удосконалити технологію синтезу рамноліпідних ПАР штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 з використанням економічно вигідних субстратів;
- удосконалити способи виділення рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 та розробити ефективні й економічно вигідні підходи до отримання цільових продуктів для практичного використання у рослинництві;
- вивчити фізико-хімічні й біологічні властивості одержаних продуктів для оцінки їх активності;
- дослідити вплив продуктів на основі ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на ростові показники олійних рослин, встановити можливі механізми їх дії на рослини;
- розробити комплексні препарати рамноліпідних ПАР з біоцидами та фітогормонами для підвищення їх активності;
- розробити технологічну та апаратурну схеми отримання продуктів на основі рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17;
- розробити технології застосування рамноліпідних ПАР у вирощуванні олійних рослин та рекомендації щодо їх практичного використання.

Об'єкт дослідження – мікробний синтез поверхнево-активних речовин та їх застосування.

Предмет дослідження – удосконалення біотехнології отримання продуктів на основі рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 та їх використання для олійних рослин.

Методи досліджень. У роботі використано мікробіологічні методи (культивування мікроорганізмів, антимікробна активність), біотехнологічні (мікробний синтез ПАР), хімічні (аналіз вмісту субстратів, рамноліпідів, полісахаридів, білку), фізико-хімічні (визначення поверхневої,

емульгуювальної активності, показників критичної концентрації міцелоутворення (ККМ), граничних кутів змочування), біохімічні (вміст пігментів фотосинтезу, проникність клітинних мембран), фізіологічні методи (біотести на фітогормони); математичні методи (підбір оптимальних екстрагентів, статистична обробка результатів). Польові (виробничі) дослідження проведено за стандартними методами на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України для практичного випробування ефективності розроблених ПАР у технологіях вирощування соняшнику.

Наукова новизна одержаних результатів. Науково обґрунтовано та експериментально підтверджено умови ефективного синтезу ПАР штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 з використанням економічно вигідних джерел вуглецю, а також їх комбінування й дробного внесення при культивуванні, що дозволило підвищити кількість отриманого продукту на 16-39,6 %, у порівнянні з використанням гліцерину як моносубстрату.

Вперше з використанням методу багатопараметрових рівнянь визначено ефективні розчинники для екстракції рамноліпідів (РЛ) з культуральної рідини *Pseudomonas* sp. PS-17. Встановлено, що застосування зміни температур у процесі осадження рамноліпідного біокомплексу (РБК) забезпечує зростання виходу цільового продукту на 32,7%.

Вперше як цільові продукти використано екзо- та ендометаболіти *Pseudomonas* sp. PS-17, зокрема й побічні продукти (біополімери з клітинної маси та фугат після відділення РБК).

Показано що отримані продукти на основі рамноліпідних ПАР мають високу поверхневу (28,3-29 мН/м), емульгуювальну активність (індекс E_{24} становить 60-80 %), здатність до змочування поверхонь, сприяють підвищенню проникності клітинних мембран мікроорганізмів і рослин.

Виявлено, що рамноліпідні ПАР є стимуляторами росту олійних рослин. Вперше визначено, що отримані продукти сприяють підвищенню

активності фітогормонів основних груп: – ауксинів (індоліл-3-оцтової кислоти) – на 28%, (індоліл-3-масляна кислота) – на 63%; гіберелінової кислоти – на 30%, цитокінінів (6-бензиламінопурину) – на 30% порівняно з варіантами без біоПАР. Також виявлено антимікробну активність ПАР та їх композицій з біоцидами-тіосульфонатами щодо фітопатогенів.

Показано, що стимулювальний вплив рамноліпідних ПАР на рослини зумовлений змінами їх фізіолого-біохімічних характеристик (інтенсивність росту, вміст пігментів фотосинтезу, проникність клітинних мембран, активність фітогормонів).

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено раціональну технологію рамноліпідних ПАР з використанням економічно вигідної сировини (відходів олійних і харчових виробництв), а також комбінованого й дробного способу подачі субстратів. Запропоновано способи виділення рамноліпідних ПАР та розроблено економічно обґрунтовані форми цільових продуктів, у тому числі й побічних продуктів біосинтезу *Pseudomonas* sp. PS-17.

Завдяки удосконаленню процесу отримання рамноліпідних ПАР вдалося знизити собівартість виробництва на 37 %. Розрахунок роздрібною вартості свідчить, що отриманий СКР є в 3-5 разів дешевшим, ніж представлені на ринку закордонні аналоги.

Доведено, що отримані продукти можуть застосовуватися як стимулятори росту олійних рослин – сировини для харчової промисловості та виробництва біопалива.

Ефективність використання розроблених рамноліпідних ПАР при вирощуванні соняшника підтверджено результатами виробничого дослідження на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України (акт впровадження від 15.03.2016 р.), випробування у фермерському господарстві Одеської обл. (ПП «Агро-Адмірал», акт впровадження від 12.10.2015 р.). Результати роботи застосовуються у науковій і навчальній

роботі кафедри фізіології та екології рослин Львівського національного університету ім. І.Франка (акт впровадження від 05.09.2016 р.) та кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка» у науковій роботі та у навчальному процесі – у спецкурсі «Основи біотехнологічного виробництва та загальна біотехнологія» (акт впровадження від 01.02.2016 р.).

Особистий внесок здобувача. Експериментальна робота виконана автором особисто: встановлено оптимальні умови та склад поживних середовищ (з використанням відходів олійної промисловості) для культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, розроблено раціональні методи отримання цільових продуктів, технологічну та апаратурно-технологічну схему отримання ПАР, визначено вплив СКР і РБК штаму *Pseudomonas* sp PS-17 на рослини. Планування експериментів, дослідження властивостей ПАР, аналіз та узагальнення експериментальних даних, підготовку публікацій за результатами досліджень проводилися спільно з науковим керівником к.х.н., с.н.с. Г.Г. Мідяною та зав. відділу д.т.н. Карпенко О.В. Вплив ПАР на рослини та на активність фітогормонів визначали спільно з к.б.н., доц. В.І. Барановим (ЛНУ ім. І.Франка), польові дослідження проводили спільно з пров.н.с. лабораторії захисту рослин, к.б.н. Яцух К.І. (Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААН України). Зазначені науковці є співавторами публікацій. Автор висловлює подяку всім, хто сприяв виконанню даної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи представлені на наукових конференціях: Міжнародному симпозіумі «Защита растений – Проблемы и перспективы», Кишинев, 30-31 октября 2012 года; X Міжнародній конференції «Молодь та поступ біології» Львів, 3-6 квітня 2014 р; VIII Міжнародній конференції daRostim «Мікробні біотехнології: актуальність і майбутнє», Київ, 19-22 листопада 2012; IX Міжнародній конференції daRostim «Фітогормони, гумінові речовини та інші

біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища», Львів, 7-10 жовтня 2013; X Міжнародній конференції daRostim «Гуминовые вещества и другие биологически активные соединения в сельском хозяйстве», Москва, 19-23 листопад 2014; XI Міжнародній конференції daRostim «Теорія, практика і перспективи застосування біологічно активних сполук в сільському господарстві», Сиктивкар, 17-19 червня 2015 та інших.

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 16 наукових праць: 6 статей у наукових фахових виданнях (у т.ч. 1 стаття у виданні іноземної країни, 2 статті у вітчизняному журналі, який представлено у міжнародних наукометричних базах даних), 5 статей у інших наукових виданнях, 5 тез доповідей на конференціях.

Структура дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, шести розділів, висновків, списку використаних літературних джерел, який містить 195 найменування, і 1 додаток. Робота викладена на 141 сторінках основного тексту, містить 21 рисунок і 26 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Біогенні поверхнево-активні речовини та їх класифікація

Актуальним завданням сучасної біотехнології є створення високоефективних біопрепаратів для живлення рослин на основі біогенних ПАР. Використання поверхнево-активних речовин мікробного походження (біоПАР) у складі комплексних агропрепаратів дасть змогу поєднати їхню високу ефективність з екологічною безпекою [6]. Через амфіфільний характер молекул біоПАР сприяють утворенню емульсій, солюбілізації малорозчинних речовин, піноутворенню, змочуванню поверхонь.. БіоПАР зазвичай є менш токсичними, ніж синтетичні, легше біодеградують, вони ефективні за різних рН і температурах [7]. Серед перспективних біоПАР заслуговують на увагу рамноліпіди – гліколіпіди, синтезовані в основному бактеріями роду *Pseudomonas*. Хоча біоПАР привертають багато уваги, застосування обмежується, оскільки виробничі процеси їх отримання часто не є економічно конкурентними порівняно з синтетичними ПАР [8]. Це пояснюється високою вартістю субстратів, відносно низькою продуктивністю і неоптимізованими постферментаційними процесами.

1.1.1 Роль біоПАР у метаболізмі мікроорганізмів

Мікробні поверхнево-активні метаболіти можуть виконувати різні фізіологічні функції, важливі для мікроорганізмів. Показано, що рамноліпіди виявляють антимікробну активність [9], впливають на утворення різних біоплівоч [10], а також регулюють рухливість мікроорганізмів [11]. БіоПАР сприяють підвищенню розчинності і поглинання малорозчинних органічних сполук, наприклад, вуглеводнів [12] за допомогою їх включення у гідрофобні

порожнини міцел, модифікації клітинної поверхні мікроорганізмів [13]. Рамноліпідні ПАР здатні до комплексоутворення з важкими металами [14]

Відповідно до фізіологічних функцій, мікроорганізми-продуценти ПАР можуть бути виділені з різних середовищ [15]. Встановлено, що забруднені ґрунти є найкращим джерелом для виділення мікроорганізмів [16]. Відомо, що здатність до росту на водонерозчинних субстратах є непрямим методом скринінгу, який вказує на можливий синтез біоПАР даним продуцентом [17].

1.1.2 Класифікація біоПАР

БіоПАР класифікують відповідно до їх хімічного складу, молекулярної маси, джерела їх мікробного походження. Отже, основні класи поверхнево-активних речовин включають гліколіпіди, ліпопептиди, ліпопротеїни, жирні кислоти, фосфоліпіди і нейтральні ліпіди, полімерні поверхнево-активні речовини [18]. Ліпофільний фрагмент біоПАР зазвичай є вуглеводневим ланцюгом або похідним жирних кислот або білком (пептидом) з бічними гідрофобними ланцюгами, гідрофільний – пептид, вуглевод тощо [19].

Гліколіпіди. Гліколіпіди містять моно- або олігосахариди, а також ліпідні фрагменти і є найбільш важливою групою низькомолекулярних біоПАР. Сахаридна частина – глюкоза, маноз, галактоз, галактозосульфат, глюкуронова кислота, рамноза тощо. Ліпідна частина – насичена або ненасичена жирна кислота, оксикислота, жирний спирт. До важливих груп гліколіпідів належать рамноліпіди, софорозоліпіди і трегалозоліпіди [20].

Рамноліпіди. Рамноліпіди є основними гліколіпідами бактерій роду *Pseudomonas*. Вперше були виділені з продуктів синтезу *P.aeruginosa* в 1949 [21]. Бактерії роду *Pseudomonas* синтезують низку гомологічних рамноліпідів, в яких рамноза приєднана з жирнокислотним хвостом глікозидним зв'язком. Рамноліпіди різняться за кількістю β -гідроксигирних кислот (1 або 2), кількістю одиниць рамнози (1 або 2), довжиною ланцюга і

насиченістю β -гідроксижирних кислот. Основні гомологи - монорамноліпід (L-рамнозо- β -гідроксидеканоїл- β -гідроксидеканоат) і дирамноліпід (L-рамнозу-L-рамнозу- β -гідроксидеканоїл- β -гідроксидеканоат) [22], всього понад двадцять гомологів синтезує *P.aeruginosa* у менших кількостях [23].

Трегалозолініди. Іншим важливим класом гліколіпідів є трегалозоліпіди, які синтезуються бактеріями родів *Mycobacterium* [24], *Arthrobacter* [25], і *Rhodococcus* [26], *Gordonia*. Вони містять дисахарид трегалозу, який зв'язаний з так званими міколовими кислотами.

Софорозолініди. Софорозоліпіди складаються з дисахариду софорози, з'язаного з довголанцюговими гідроксильованими жирними кислотами через глікозидний зв'язок. Синтезуються вони дріжджами: *Torulopsis bombicola*, *T. apicola*, *T.petrophilum*, *Candida lipolytica* і *Wickerhamiella domericqiae* [27,28].

Маннозилеритролініди (MEL). Це гліколіпідні ПАР, які синтезуються дріжджами *Candida antarctica* і *Candida* sp SY 16. MEL складаються з цукру (манозилеритринол) і жирних кислот, компоненти яких визначені як капронова, додеканова, тетрадеканова, тетрадеценова кислоти [29,30].

Ліпопептиди. Мікробні ліпопептиди - це циклічні пептиди, ацильовані жирними кислотами. Вони продукуються такими мікроорганізмами як *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* і *Serratia* [31]. Ліпопептиди здатні значно знижувати поверхневий натяг води [32], володіють антимікробною активністю [33]. Найбільш відомі сполуки: сурфактин, поліміксин і антибіотик даптоміцин *Streptomyces roseosporus* тощо [34,35].

Жирні кислоти. Деякі мікроорганізми які є деструкторами вуглеводнів, синтезують позаклітинні жирні кислоти при вирощуванні на н-алканах і проявляють поверхнево-активні властивості. До жирних кислот біоПАР належать насичені жирні кислоти з довжиною ланцюга від C_{12} до C_{14} та складні жирні кислоти, що містять гідроксильні групи і алкільні бічні ланцюги [36,37]. Показано, що *Arthobacter* strain АК-19 і *P. aeruginosa* 44Т1

синтезували 40-80% таких жирів, коли культивування проводили з використанням гексадекану і оливкової олії, як джерела субстрату [38,39].

Полімерні біоПАР. Різні види мікроорганізмів *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, і *Candida*, були зареєстровані для отримання полімерних біоПАР. Полімерні біоПАР використовують для створення стабільних емульсій. Найбільш вивченими полімерними біоПАР є емульсан і ліпозан. Раніше емульсан був відомий як один полімер, але Mercaldi et al. встановив що емульсан є комплексом, який приблизно на 80% (вага/вага) ліпополісахарид і 20% (м/м) екзополісахарид з високою молекулярною масою [40]. Ліпозан є ще одним ефективним емульгатором який синтезується *Candida lipolytica* і здатний утворювати стабільні емульсії типу масло в воді з різними комерційними рослинними оліями.

1.2 Розроблення технологій отримання мікробних ПАР

1.2.1 Підбір ефективних й економічно доцільних субстратів

В даний час виробництво біоПАР є обмеженим в промисловому масштабі, в основному через їх високу собівартість, яка є результатом відносно низької продуктивності і високих цін на поживне середовище, яке використовується. З метою підвищення їх конкурентоспроможності щодо хімічних поверхнево-активних речовин, були докладені значні зусилля для розвитку економічних і стійких виробничих процесів [41]. Відомо, що поживні середовища можуть становити до 50% від загальної собівартості біоПАР [42]. Таким чином, використання недорогих поновлюваних запасів і побічних продуктів агропромисловості може бути економічно вигідним для їх виробництва і в той же час, вирішить проблеми з утилізацією відходів.

Меляса є дешевим, побічним продуктом який генерується під час кристалізації цукру з рідких екстрактів цукрової тростини або цукрових

буряків. Вона містить високу концентрацію вуглеводів (зазвичай близько 50%), а також інші цінні речовини, такі як вітаміни. Кукурудзяний екстракт містить вітаміни, мінерали, амінокислоти, білки і є важливим джерелом азоту для багатьох процесів [42, 43]. Цінність субстратів разом з їх доступністю і низькою ціною сприяє їх використанню як додатків до поживного середовища в різних промислових процесах ферментації.

Costa et al. (2008) дослідили виробництво рамноліпідів з таким субстратами як соєвий соапсток, курячий жир, гідрогенізований рослинний жир, і пересмажена соєва олія [44] У експериментах соєвий соапсток показав найкращий результат, при використанні його вдалось отримати 9,69 г/л рамноліпідів. Встановлено, що рамноліпиди які були синтезовані, з додаванням пересмаженої олії в якості субстрату, представляли собою суміш 16 різних гомологів рамноліпідів, серед яких монорамноліпід (Rha-C₁₀-C₁₀) і дирамноліпід (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) складали основну частину їх складу.

George S. et al. (2013) зазначили, що найефективніший синтез рамноліпідів було отримано з використанням рослинних олій, таких як соєва, оливкова, кукурудзяна та масло каноли в якості джерела вуглецю [45]. З іншого боку, Wittgens et al. (2011) зазначили, що для синтезу рамноліпиду штамом *P. putida*, можуть бути використані різні джерела вуглецю, але при використанні гідрофобного субстрату, процес виділення і очищення буде набагато важчим, ніж при використанні глюкози [46] Їх експерименти показали, що найкращий результат був досягнутий при використанні сахарози або гліцерину в якості субстрату.

Встановлено можливість використання картопляного крохмалю для синтезу ліпопептидів штамом *Bacillus subtilis B6-1*. [47].

Також є інформація про використання відходів молочної промисловості(сироватки, пахти та їх похідних) для синтезу софорозоліпідів штаму *S. bombicola* ATCC 22214, зокрема сироватки, яка утворюється у великих кількостях при виробництві сиру[48,49].

Незважаючи на існуючий досвід дослідження нетрадиційних джерел вуглецю для синтезу біоПАР, вибір відповідного субстрату, як і раніше, є важливою проблемою. Перспективні відходи з правильним балансом вуглеводнів і жирів, щоб підтримати оптимальний ріст мікроорганізмів і максимальний синтез біоПАР.

Виробництво біоПАР з використанням змішаних субстратів рослинного походження. Ще одним можливим підходом для більш економічновигідного процесу синтезу біоПАР є застосування змішаних субстратів [50]. Одним з джерел вуглецю була легко глюкоза, що легко засвоюється для максимального накопичення біомаси, а другим – соняшникова олія. Показано ефективність олеїнової кислоти або рапсової олії як додаткового джерела вуглецю в дозованій подачі при культивуванні.

J. M. Luna та інші в 2013 описали синтез біоПАР штаму *Candida spheerica* в середовищі культивування з додаванням відходів олійної галузі (соапсток або фосфатидні концентрати соняшникової чи соєвої олії) [51]. Застосування відходів олійної промисловості дозволило збільшити концентрацію гліколіпідів в порівнянні з середовищем без додавання побічних продуктів рафінування олії.

Поєднання меляси цукрової тростини і трьох різних олій (соєвої, соняшникової або оливкової) використовували для виробництва софорозоліпідів з дріжджів *Candida bombicola* [52]

Daverey et al. повідомили про виробництво софорозоліпідів *Candida bombicola* на змішаних гідрофільних субстратах (депротеїнізована сироватка, глюкоза), дріжджекстракт, олеїнова кислота [53]

Отже, поєднання виробництва біоПАР з процесами утилізації відходів різних галузей промисловості дозволяє зменшити забруднення довкілля та збалансувати загальні витрати для виробництва біоПАР.

1.2.2 Оптимізація технологій одержання цільових продуктів

Ефективні методи виділення цільових продуктів відіграють не менше значення, ніж оптимізація мікробного синтезу ПАР, при розробленні технологій їх масштабного виробництва [54]

Вважається, що на постферментаційні процеси (виділення кінцевих продуктів) припадає 60-80% витрат від загальної вартості виробництва біоПАР [55]. Це обумовлено головним чином складністю сумішей культуральних рідин, що містять клітини, різні позаклітинні метаболіти, а також низькими концентраціями цільових продуктів.

Осадження. Одним з найчастіше описаних методів виділення та очищення є підкислення супернатанту культуральної рідини до рН 2-3 із наступним охолодженням. Низький рН нейтралізує негативні заряди на молекулах, зменшуючи їх розчинність у водному розчині [56,57]. У патенті США 5656747 описано спосіб ефективного виділення рамноліпідів (до 98%), підкисленням до рН ≤ 5 з подальшим нагріванням до 60-130°C, охолодженням до 50 °C і нижче, і центрифугуванням для відділення рамноліпідної фази. Було також відзначено, що цей процес не буде відбуватися без стадії нагріву після підкислення [58].

Ще одним варіантом осадження біоПАР є висолювання внаслідок додавання сульфату амонію, як це описано для ліпопептидів штамів *B. subtilis* BP-9, *B. subtilis* BP-13 and *Bacillus species* PRIS-1 [59].

Fleurackers et al. описують спосіб виділення домішок, за допомогою якого жирні кислоти можна осадити CaCl_2 . Жирні кислоти утворюють нерозчинні кальцієві солі, відділяють центрифугуванням [60].

Екстракція. Екстракція є найбільш поширеним методом, який використовується для кількісного виділення біоПАР. Селективність розчинника до біоПАР має вирішальне значення. Використовуючи полярні розчинники, такі як метил-трет-бутиловий ефір (МТБЕ) [61], етилацетат [62]

або спирти [63] можна екстрагувати біоПАР з водних та інших гідрофільних середовищ. Для первинного очищення рамноліпідів (для видалення залишкового субстрату) у першій екстракції використовують н-гексан [64].

Оскільки органічні розчинники, як правило, токсичні, їх залишки не можуть бути присутніми в продукті і потребують додаткового видалення вакуумним випаровуванням. Загалом, токсичність розчинників слід враховувати при розробці процесу; етилацетат і МТБЕ як полярні розчинники є кращою альтернативою хлороформу, а н-гептан як неполярний може бути безпечнішим, ніж н-гексан.

Хроматографія. Препаративна хроматографія застосовується для очищення продукту з метою використання в медичних або косметичних галузях з вимогами високої чистоти. В основі їх розділення лежить різна взаємодія продукту і домішок із рухомою і стаціонарною фазами на основі гідрофобності, розміру, заряду, або спорідненості.

1.3 Дослідження властивостей мікробних ПАР

1.3.1 Фізико-хімічні властивості біоПАР

Низка цінних властивостей рамноліпідних ПАР обумовлює їх перспективність застосування в різних галузях. Мийна, зволожуюча, емульгувальна, солубілізувальна здатність, термостабільність, а також їх екологічна сприятливість свідчать про їх переваги перед біогенними і синтетичними ПАР. Ці властивості роблять рамноліпідні незамінними для використання в різних галузях, таких як косметична, фармацевтична, сільськогосподарська і харчова промисловості [65-68]

Повернево-активні властивості рамноліпідів. Відомо, що ефективні ПАР зменшують поверхневий натяг (ПН) води з 72 до 35 мН/м, а міжфазний з 40 до 1 мН/м (гексадекан з водою) [69]. Рамноліпідні біоПАР мають досить

низькі значення критичної концентрації міцелоутворення (ККМ) і здатні знижувати поверхневий натяг води до 28 мН/м. ПАР *P. aeruginosa* можуть знизити ПН до 26-30 мН/м і міжфазний – менш ніж 1 мН/м [70]. Costa et. al. (2010) вважають, що рамноліпіди штаму *P. aeruginosa* L2-1 при вирощуванні на середовищі з відходами кулінарного жиру, в якості субстрату, знижували поверхневий натяг до 30 мН/м, мали ККМ 30 мг/л, а також емульгували соєву олію та вуглеводні. Значення ККМ рамноліпідних ПАР може бути різним від 5,5 мг/л до 230 мг/л, що залежить від продуценту, умов біосинтезу, поживного середовища. Біогенні ПАР мають менші показники ККМ, ніж синтетичні. Так, для ПАР JBR 425 ККМ - близько 70 мг/л, а для роканолу – 130 мг/л [71]. ККМ нейоногенних ПАР Тритон AG6210 - 1 г/л, це вище навіть за найбільші показники ККМ рамноліпідних ПАР – 230 мг/л. Рамноліпіди штаму *P.aeruginosa* SP4 знижують ПН води до 29,1 мН/м, а синтетичний натрій лаурилсульфат – до 29 мН/м, алкіл сульфонат –31 мН/м [72]. Крім того, біоПАР є біодеградабельними, мало токсичними, і проявляють свою активність при екстремальних значеннях рН, вмісті солей і температурах[73].

Рамноліпіди є амфифільними молекулами, що містять одночасно гідрофільну і гідрофобну частинки, тому вони розташовані на межі рідина-рідина з різним ступенем полярності. Це може бути міжфазний натяг між двома рідинами (нафта і вода), або на поверхні розділу фаз рідина-газ.

Важливою властивістю біоПАР є їх здатність до емульгування, тобто стабілізації гетерогенних систем двох рідин, які не змішуються, що є основою створення різноманітних емульсій для харчової, косметичної, фармацевтичної промисловостей. Xia et al. (2011) вважають, що рамноліпіди, які отримані з штаму *P. aeruginosa* виділеного з нафтового колектора, не тільки знижують поверхневий натяг води з 71,2 до 22-30 мН/м, а й ефективно емульгують нафту – на 80% [74]. При цьому вони здатні зберегти свої поверхнево-активні властивості при екстремальних умовах, а саме при

високих температурах (до 120 °C), високій солоності (вище, ніж 20 г/л), а також в присутності йонів металів.

Ozdemir і Malayoglu (2004), вивчали кути змочування водних розчинів суміші рамноліпідів, що складалась з RL1 і RL2 в співвідношенні 1:1, на твердих поверхнях, таких як скло, гідрофільний полімер, гідрофобний поліетилентерефталат [75]. Експеримент показав, що при низьких концентраціях, спостерігалась зміна кута змочування, який залежить від відношення ПАР до твердої поверхні, яка була використана. Використання більших концентрацій знижує кут змочування.

Cirstea та ін. в 2014 досліджували змочувальні властивості рамноліпідних ПАР, синтезованих штамом *P. aeruginosa* LBI, на відпрацьованій олії в якості субстрату [76]. Дослідження проводили на твердих поверхнях, таких як скло, полівінілхлорид. Вони відзначили, що зволожуючі показники рамноліпідних ПАР були вищими в порівнянні з синтетичними поверхнево-активними речовинами.

Важливою характеристикою усіх поверхнево-активних речовин, у тому числі для біогенних, є міцелоутворення, яке впливає на цілу низку функціональних властивостей.

Показано, що при збільшенні концентрації, біоПАР формують структури, так звані міцели, везикули, ламелії [77]. У воді гідрофільні частини створюють зовнішній шар, а гідрофобні (хвіст) розташовані всередині; у гідрофобному середовищі може бути сформована "зворотна міцела": хвости – на поверхні сфери, а голови розміщені всередині. Розмір і форма міцел залежать від розміру і йонної сили гідрофільної і гідрофобної груп. Відомо [77], що морфологія цих агрегатів залежить від рН, завдяки чому можна контролювати, наприклад, вивільнення металів або різних препаратів. Отже вони можуть бути з успіхом використані для доставки ліків або інших біологічно-активних речовин (БАР), з метою їх контрольованого вивільнення. З іншого боку, вплив рН на міцели може бути також важливим

параметром для ефективності використання біоПАР в процесі біоремедіації. Рамноліпіди, як і інші біоПАР, здатні утворювати міцели при концентрації вище ККМ. Так, збільшення рН впливає на будову міцел рамноліпідів [73]. Дослідження Raza et al. (2010) показали, що при зміні рН середовища, форма везикул змінюється і очевидно, поведінка і ефективність рамноліпідного розчину [78]. Згідно Khoshdast et al. (2012), рамноліпіди мають тенденцію до утворення міцел при більш високих рН; тому вони при одній концентрації, але різних рН будуть діяти по різному [79]. Однією з базових властивостей біоПАР є піноутворення. При розташуванні молекул ПАР на границі повітря – рідина формуються бульбашки у рідині, тобто створюється піна [80]. У рамноліпідних сумішах, співвідношення монорамноліпідів до дирамноліпідів істотно впливає на їх властивості. Відомо, що їх співвідношення впливають на товщину плівок у пінах, їх поверхневих електричних властивостей, а отже, й на стабільність піни. Lotfabad et al. вказують, що відношення дирамноліпиду та монорамноліпиду в рамноліпідній суміші залежить від штаму та субстрату, який використовується при культивуванні [81]. Тому, вибравши оптимальний субстрат і відповідний штам, можна отримати рамноліпідні біоПАР з спрогнозованими властивостями і відношенням компонентів.

1.3.2 Біологічні властивості мікробних ПАР

Проникність. Завдяки своїй унікальній структурі біоПАР можуть специфічно діяти на клітини мікроорганізмів. Відомо що при використанні біоПАР за низьких концентрацій вони можуть змінювати проникність клітинних мембран бактерій або дріжджів, при цьому не руйнуючи їх.

Sotirova та спів. дослідили вплив рамноліпідних ПАР на проникність мембран бактеріальних клітин *Pseudomonas*, і *Bacillus*. Встановлено, що рамноліпідні ПАР за низьких концентрацій можуть стимулювати метаболізм

бактерій та активність ферментів [82]. Встановлено здатність рамноліпідних ПАР змінювати цілісність і проникність моношару клітин Caco-2 в залежності від концентрації і часу, що свідчить про їх потенціал, як нетоксичних засобів, для регулювання проникності клітинних мембран [83].

Devendra H Dusane et al. досліджували вплив на проникність клітинних мембран рамноліпідних і синтетичних (цетилтриметиламоній броміду ЦТАБ, натрій додецилсульфату) ПАР [84]. Встановлено підвищення проникності клітинних мембран грибів після оброблення рамноліпідними ПАР, а синтетичний ЦТАБ мав найменшу активність.

Здатність біоПАР до зміни проникності клітинних мембран є одним з можливих механізмів антимікробної дії біоПАР, що включає: 1) адгезивні властивості біоПАР, що викликають погіршення цілісності клітинних мембран [85]; 2) введення компонентів жирної кислоти біоПАР в клітинну мембрану, що призводить до збільшення розміру мембрани і значних ультраструктурних змін в клітинах [86]; 3) введення більш коротких ацильних ланцюгів біоПАР в клітинну мембрану, що викликає перебої в цитоскелеті і плазматичній мембрані [87]; 4) розрив у клітинній плазматичній мембрані шляхом накопичення інترمембранних частинок в клітинах, збільшуючи її електричну провідність [88]; 5) підвищення проникності мембран через взаємодію або порушення структури пептидів клітинної мембрани [89]

Антимікробна та антиадгезивна активність. Naba et al. (2003) встановили антимікробні властивості рамноліпідних ПАР [90]. Визначено мінімальні інгібувальні концентрації (МІК) рамноліпідів для різних штамів бактерій. Вони знаходяться в межах від 5 мг/л для *Klebsiella pneumonia*, до 75 мг/л для *Fusarium solani*, для таких бактерій, як *Bacillus subtilis* значення МІК становило 16 мг/л, а для *Staphylococcus aureus* і *S. epidermidis*, - 32 мг/л. Антимікробні властивості рамноліпідних ПАР в поєднанні з емульгуючими властивостями важливі для використання в косметичній промисловості.

Встановлено, що рамноліпіди володіють відмінними протигрибковими властивостями проти таких штамів [91-93]: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* і *Fusarium sacchari*.

Takemoto et al. (2010) провели експерименти з вивчення ефективності рамноліпіду як фунгіциду проти поширених грибкових інфекцій винограду (*Aspergillus japonicus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia brachyspora*, *Greeneria uvicola*, *Nigrospora sphaerica*, *Trichoderma* sp., *Penicillium sclerotiorum* і *P. thomii*) [94]. Показано, що використання суміші рамноліпіду і сирінгоміцину Е (RLS + SRE) мають інгібуючу активність проти цих грибів у різних стадіях їх проростання. Рамноліпіди мають не тільки фунгіцидними властивостями, але також здатні пригнічувати спороутворення і ріст міцелію.

На думку Vockmuehl (2012), більшість антимікробних властивостей біоПАР є результатом їх здатності впливати на клітинні мембрани і запобігати адгезії мікроорганізмів до поверхні клітин [95]. Ці властивості мають перевагу в харчовій промисловості. Одна з проблем в цій галузі, запобігти і усунути біоплівку і адгезію мікроорганізмів, які викликають псування [96]. Встановлено, що попереднє оброблення поверхонь з використанням рамноліпідів призводить до зниження адгезії і руйнування біоплівки мікроорганізмів. Показано, що застосування рамноліпідів (1,0%) викликає зниження адгезії *L. monocytogenes* - на 57,8% і *S. aureus* - на 67,8%. Kaczorek et al (2012) вивчали вплив додавання рамноліпідів на поверхню клітин *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Achromobacter* і *Flavimonas*. Дослідження показали зміни у властивостях поверхні клітин, збільшуючи їх гідрофобність [97]. Крім того, показано, що рамноліпіди здатні впливати на клітинні стінки грампозитивних та грамнегативних бактеріальних штамів.

Біодеградабельність мікробних ПАР. Chrzanowski et al (2012) показали, що присутні в ґрунті мікроорганізми, відповідають за біодеградації вуглеводнів і сприяють біодеградації рамноліпідів [98]. Ця біодеградабельність може відбуватися в аеробних і анаеробних умовах.

Показано, що присутність рамноліпідних ПАР в ґрунті і їх біодеструкція не сприяє зростанню конкретного виду, очевидно, вони не змінюють природну мікробну рівновагу в ґрунті. Встановлено, що біодеградація рамноліпідів у ґрунтах складала 92 % на 7 день. Це доводить, що рамноліпіди є екологічно чистими речовини.

Р.К. Моһан *et al.* встановили, що рамноліпідні ПАР за 10 днів деградують на 74 % в аеробних умовах, і на 47 % - за 6 днів в анаеробних умовах, тоді як деградація синтетичного ПАР Тритону Х-100 відбувалась незначною мірою і тільки в аеробних умовах [99].

БіоПАР на 10-й день 28-денного тестового циклу біодеградував на 68,4%, що свідчить про швидку біодеградабельність біогенних ПАР.

Токсичність біоПАР. Основною екологічною проблемою щодо поверхнево-активних речовин є екотоксичність, тобто вплив речовини на навколишнє середовище, перш ніж вона деградує. При випробуванні відповідно до OECD Guideline 202, з використанням *Daphnia magna*, було показано, що поверхнево-активні речовини на порядок менш токсичні, ніж їх хімічно синтезовані аналоги [100].

Відомо, що за показниками гемолітичної активності (на еритроцитах людини) рамноліпідні ПАР є менш токсичні в порівнянні з синтетичними ПАР (катіонними - ЦТАБ, ТТАБ, БК та аніонним ДДС). Гальмування люмінесценції бактерій *Vibrio fischeri* (на 50%) у біоПАР відбувалося при вищих концентраціях, ніж синтетичних поверхнево-активних речовин [101].

Відомо, що біоПАР впливали на культуру клітин фібробластів мишей в концентрації, яка в 500 разів вища, ніж аніонного ПАР ЛАС (лінійний алкілсульфонат). Крім того, гостра і хронічна токсичність цих біоПАР була значно нижча, ніж у нейногенної ПАР Triton X-100.

1.4 Галузі застосування біоПАР

В останні роки спостерігається збільшення інтересу до використання екологічно чистих ПАР здатних до біодеградації. Продаж цих "зелених" поверхнево-активних речовин які є альтернативою синтетичних, склала 344 000 т в 2013 році, і очікується, що вона досягне 462 000 т і 2308 мільйонів доларів США до 2020 року. Серед них є поверхнево-активні молекули, які синтезовані різними групами мікроорганізмів (бактерій, дріжджів і filamentous грибів) і привертають значну увагу в якості альтернативи синтетичним ПАР, завдяки своїм унікальним властивостям, які включають низьку токсичність, високу здатність до біологічного розкладання, високу селективність, низькі концентрації критичного міцелоутворення (ККП) і ефективність при екстремальних температурах, рН і солоності. Завдяки цим властивостям, біоПАР можуть охоплювати різні сфери застосування в сільському господарстві, біоремедіації, нафтохімічній, фармацевтичній, косметичній, миючій і харчовій промисловостях.

1.4.1 Біогенні ПАР у сучасному сільському господарстві

Завдяки своїм унікальним властивостям біоПАР можуть замінити деякі найбільш універсальні хімічні поверхнево-активні речовини, які використовуються в сільському господарстві. Застосування біоПАР в сільському господарстві обумовлене такими фізіологічними функціями: (1) збільшення площі поверхні і біодоступність гідрофобних нерозчинних у воді субстратів [102], (2) бактеріальний патогенез, кворум і формування біоплівки [103], (3) антимікробна активність [104] і (4) клітинна проліферація у виробництві бактерій [105].

1.4.2 Використання препаратів на основі біоПАР як біопестицидів

Сільськогосподарське виробництво використовує хімічні пестициди для знищення збудників хвороб рослин, хімічні добрива для підвищення родючості ґрунту і хімічні поверхнево-активні речовини в агрохімічних композиціях. Незважаючи на їх важливу роль, використання цих препаратів створює значні проблеми. Основним недоліком використання хімічних пестицидів є вплив на людину, домашніх тварин і природу. Їх залишки тривалий час можуть залишатися на посівах і накопичуватись в ґрунті і воді. З цих причин, розробка безпечних природного походження альтернатив хімічним пестицидів є важливим завданням для наукового дослідження і комерційного розвитку.

Відомо, що два біопестициди на основі біоПАР успішно випущені на ринок. Перший, SERENADE компанії AgraQuest Inc, США є фунгіцидом, продуктом синтезу штаму *Bacillus subtilis* (штам QST 713), що виробляє більше 30 різних ліпопептидів, які працюють синергічно для захисту рослин від фітопатогенів. Список цільових рослин включають овочі, фрукти, горіхи, і виноград. Препарат може використовуватися проти таких захворювань як сіра гниль, іржа, склеротинія, борошниста роса та ін. Інший біопрепарат який є на ринку на основі рамноліпиду - Zonix, фунгіцид компанії Jeneil Biotech Inc, США. Цільові рослини включають коріння, цибулинки плодів овочів, листових овочів, фруктових і горіхових дерев, цитрусові, тропічні культури (наприклад, бананові) ягідні, олійні, виноградні культури. Список патогенів, на які діє Zonix: *Achlya*, *Albugo*, *Aphanomyces*, *Basidiophora*, *Olpidium*, *Pachymetra*, *Peronophthora*, *Peronosclerospora*, *Physoderma*, *Phytophthora*, *Plasmodiophora*, *Plasmopara*, *Polymyxa*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Rhizophydium*, *Sclerophthora*, *Sclerospora*, *Spongospora*, *Synchytrium* і *Trachysphaera*. [106,107]

Серед різних антимікробних сполук і біопестицидів, поверхнево-активні речовини відомі своєю антимікробною активністю проти патогенів та фітопатогенів.

Антибактеріальні властивості біоПАР викликають інтерес для боротьби з хворобами рослин. Застосування супернатанта культуральних рідин синтезованих бактеріями, *Pseudomonas fluorescences* (6519E01), *P. fluorescences biovar* (6133D02), і *Serratia plymuthica* (6109D01), показало зменшення впливу фітопатогенів [108]. Такий підхід запропонований, для зменшення втрати посівів і запобігання подальшого поширення хвороби при проростанні рослин. Використання біоПАР для біологічної боротьби з грибковими захворюваннями рослин також було підтверджено Stanghellini і Miller (1997), який показав, що рамноліпіди (RL) можуть руйнувати мембрани зооспор і викликати лізис зооспор багатьох ооміцетів фітопатогенів грибів [109].

Крім своїх антимікробних властивостей, біоПАР можуть виступати в якості індукторів системної стійкості рослин до хвороб, що викликається рецепторами розпізнавання патернів молекулярних підписів, які ідентифікують цілі класи мікроорганізмів, але відсутні у рослини хазяїна. [110]. Після розпізнавання, ці молекулярні підписи, що умовно називаються мікробно-асоційовані молекулярні патерни (ММПП) [111]., запускають складні сигнальні шляхи, що ведуть до транскрипційної активації пов'язаних з захистом генів і накопичення антимікробних метаболітів в клітинах рослин [112]. Виявлено захисну реакцію рослин на основі індукованої системної стійкості щодо широкого спектру збудників, що виникла внаслідок кореневої колонізації непатогенними ризобактеріями [113]. Varnier із співавт. показали, що рамноліпіди посилюють захисні реакції інших елісіторів [114].

Застосування біоПАР в боротьбі з шкідниками рослин, комахами є новим напрямком який розвивається. Є дуже мало інформації про використання біоПАР в боротьбі з комахами. Два патенти США були подані

SciTech (США 2005/0266036 А1 і US 2012/0058895 А1) [115,116] про інсектицидну активність рамноліпідних ПАР і мікробів продуцентів біоПАР.

Ці патенти вказують на два можливих напрямки використання біоПАР:

- 1) застосування мікроорганізмів продуцентів біоПАР разом з очищеним або неочищеним біоПАР проти шкідників рослин
- 2) застосування очищеного або неочищеного біоПАР проти шкідників рослин.

У першому методі передбачається, що мікроорганізми-продуценти будуть синтезувати біоПАР на поверхні, на яку вони будуть наноситися і біоПАР сприятимуть мікробній дії щодо шкідників на початковому етапі.

У другому методі біоПАР можуть бути застосовані безпосередньо проти шкідників. Шкідники, оброблені біоПАР включали мурах, попелиці, трипси, білокрилки, воші, таргани, терміти, комарі, мухи, кліщі, павуки, нематоди, молюски, амеби, паразити, і водорості. Експериментальні результати показали, що контролююча активність біоПАР в боротьбі з шкідниками спостерігалася стосовно всіх протестованих шкідників а ефективні концентрації рамноліпідів становили від 0,0075% до 5%.

Роль взаємодії в системі мікроорганізм-рослина. Синтез біоПАР асоційованими з рослинами мікроорганізмами має для них важливе значення, особливо для створення симбіотичних / патогенних відносин з рослинами, таких як рухливість, передача сигналів і формування біоплівки [117]. Відомо, що циклічні ліпопептиди і рамноліпіди є найбільш вивченими біоПАР в ролі рослинно-мікробних взаємодій, які включають наступне:

- 1) полегшення мікробної рухливості на поверхні кореневої системи рослини [118];
- 2) адгезія і дисперсія біоплівки, для створення мікроколонії на поверхні рослин [119];

поліпшення біодоступності поживних речовин або гідрофобних молекул рослинам, наприклад, біоПАР, які синтезовані ґрунтовими

мікроорганізмами підвищують змочуваність ґрунту і підтримують кращий розподіл хімічних добрив в ґрунті, таким чином, допомагаючи поглинанню поживних речовин рослиною[120];

3) захист від токсичних сполук, а саме вуглеводнів і важких металів [121].

1.4.3 Використання біоПАР в агропрепаратах

Завдяки своїм властивостям біоПАР можуть бути використані для створення агропрепаратів.

Відомо, що гліколіпідні ПАР синтезовані штамом *Burkholderia senoserasia* BSP3 виділені з нафтозабрудненого ґрунту, мають високий індекс емульгування $90 \pm 2\%$, і їх використовують для підвищення розчинення трьох гідрофобних пестицидів, а саме метилпаратіону, етилпаратіону і трифлураміну [122]

Також мікробні біоПАР можуть використовуватись в якості пенетрантів і носіїв для активних агентів в пестицидних, інсектицидних, і гербіцидних препаратах [123]. У цьому дослідженні, додавання рамноліпідів до водорозчинного інсектициду ацефату дозволяло контролювати його розчинність і тим самим забезпечувати його задану дозу. Змішуючи рамноліпід з водонерозчинним інсектицидом імідаклопридом підвищується розчинність, а також транслокація інсектициду в обробленій рослині або дереві. Також є дані про використання софорозоліпідів і їх похідних в якості ад'ювантів для пестицидів та гербіцидів при використанні біоПАР в агро-композиціях [124].

БіоПАР можуть застосовуватися в сільському господарстві в якості поживних речовин розчинених в добривах, які допоможуть рослинам більш ефективно засвоювати поживні речовини. Встановлено, що застосування біоПАР в ґрунтах сільськогосподарського призначення, може сприяти деградації вуглеводнів, важких металів, пестицидів, тим самим покращуючи

якість ґрунтів [125-127]. Особливий інтерес в цій галузі був до азотфіксатора штаму *Azotobacter beijreinskii*, який є продуцентом біоПАР і деструктором нафтових забруднень [128]. Такі штами здатні не тільки до деструкції вуглеводнів, але й до фіксування азоту, що сприяє родючості ґрунтів.

Фітогормони в культуральній рідині бактерій роду Pseudomonas.

Оскільки як засоби для рослин можуть використовуватися препарати на основі культуральної рідини мікроорганізмів-продуцентів ПАР, зокрема роду *Pseudomonas*, представляє інтерес вплив інших біологічно активних компонентів. У першу чергу це стосується можливості біосинтезу фітогормонів цими продуцентами. Фітогормони відіграють важливу роль як регулятори росту і розвитку рослин. Використання природних фітогормонів мікробного походження в рослинництві є досить перспективним зважаючи на простоту їх отримання, порівняну дешевизну, високу здатність їх до детоксикації в рослинному організмі, а також здатності легко зв'язуватися в клітині і катаболізувати. Крім того, за допомогою мікроорганізмів можна отримати фітогормональні препарати, які володіють більш високою біологічною активністю. Важливе значення для рослинництва набуває застосування не стільки очищених мікробних гормональних препаратів, скільки всього природнього комплексу, що утворюється в результаті метаболізму мікробної клітини: фітогормони, вітаміни, амінокислоти, органічні кислоти та інші необхідні для рослини сполуки. Традиційно прийнято виділяти такі основні групи фітогормонів – це ауксини, гібереліни і цитокініни.

Фітогормони, беручи участь в координації різних фізіологічних процесів в рослинах, регулюють стан спокою і проростання насіння, впливають на укорінення, цвітіння, розгалуження і дозрівання плодів. Вони підвищують резистентність рослин до факторів зовнішнього середовища, індують або навпаки, пригнічують експресії генів і синтез деяких ферментів, пігментів і метаболітів [129,130]

Синтез фітогормонів є одним з головних механізмів, за допомогою якого ризосферні бактерії стимулюють і поліпшують ріст рослин [131].

Цитокиніни представляють собою природні сполуки, які беруть участь в гормональній регуляції процесів онтогенезу рослин, в тому числі індукції ділення рослинних клітин [132], в механізмі адаптації рослин до стресових впливів навколишнього середовища, одним з яких є водний дефіцит. Їх захисний вплив на засухостійкість рису шляхом координованої регуляції поглинання джерел вуглецю та азоту в умовах водного дефіциту досліджено в роботі [133].

Здатність до синтезу *Pseudomonas montelii* гіббереллінової кислоти показана в роботі [134], а також її вплив на ріст пшениці та турецького гороху. У ризосферних псевдомонад найбільш добре вивчена здатність до синтезу індолілоцтової кислоти, що стимулює розвиток кореневої системи рослин. Так, в роботі [135] описано оптимізацію синтезу ІОК штамом *Pseudomonas putida* UB1 і її стимулювальний вплив на рослини гірчиці *Brassica nigra*.

Поряд з ауксинами, цитокиніни також утворюються PGPR-штамами, наприклад, бактеріями роду *Pseudomonas* [136].

Ризосферні мікроорганізми є перспективними продуцентами мікробних цитокинінів і можуть бути використані в практичних цілях в різних областях рослинництва.

Висновки до розділу 1

Аналіз сучасних літературних джерел підтвердив актуальність обраної теми – розроблення технології синтезу рамноліпідних ПАР на економічно вигідних субстратах та їх застосування у рослинництві. Натепер є значний обсяг інформації про біоПАР, зокрема рамноліпідні, про їх застосування. Проте, впровадження біоПАР у промисловість лімітується низкою чинників – як технічних, так й економічних. важливим завданням є удосконалення біотехнологій ПАР: підбір недорогої сировини, оптимізація процесів

культивування та виділення продуктів. Використання економічно вигідних субстратів та ефективних технологій виділення ПАР, створення раціональних форм цільових продуктів спрямовано на впровадження біоПАР у сучасні технології рослинництва, які потребують ефективних екологічно безпечних препаратів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ І МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Робота проводилась у відділі хімії та біотехнології ГК Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України. Частина експериментів із впливу рамноліпідних ПАР на олійні рослини (дрібноділянкові досліді), а також їх дію на активність фітогормонів досліджували у Львівському Національному університеті ім. І. Франка. Польові досліді проводили на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України. Створення і дослідження антимікробних композицій за участю рамноліпідних ПАР і тіосульфонатів – у НУ «Львівська політехніка». Здатність рамноліпідних ПАР до інгібування корозії металів – у Фізико-механічному інституті ім. Г.В. Карпенко НАНУ.

Основні напрямки досліджень, послідовність їх виконання представлено на схемі (рис. 2.1).

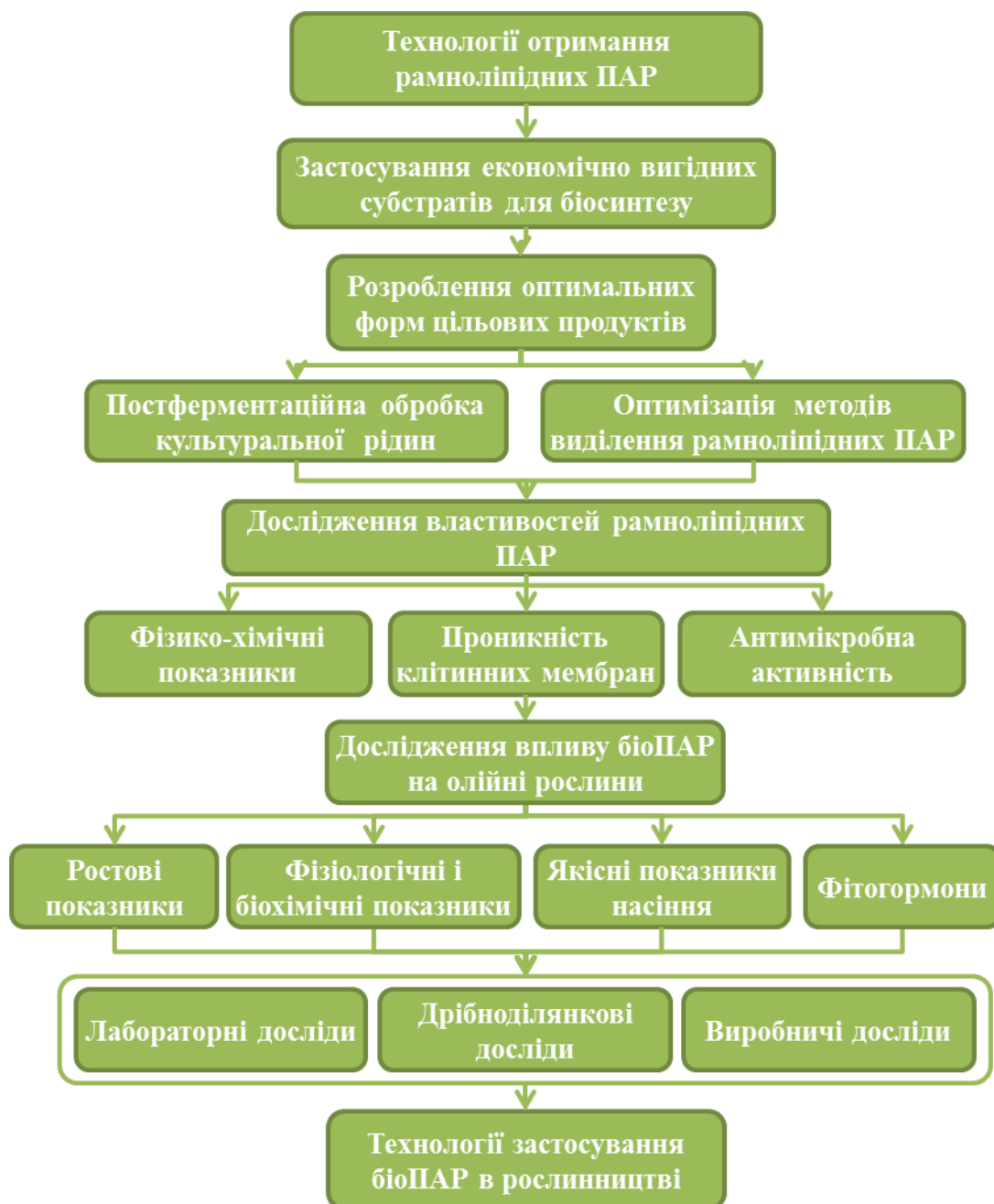


Рис. 2.1. – Загальна схема проведення досліджень

2.1 Культивування мікроорганізмів

У роботі використано бактеріальний штам *Pseudomonas* sp. PS-17 з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України, який реєстровано у Депозитарії ІМВ ім. Д.К.Заболотного як *Pseudomonas* sp. ІМВ В-7434. Для експериментів були використані олійні рослини (соняшник, ріпак, редька олійна, тифон);

культури тестових мікроорганізмів-фітопатогенів *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia corotovora*; препарати фітогормонів різних груп: ауксини – індоліл-3-оцтова кислота, індоліл-3-масляна кислота, гібереліни – гіберелінова кислота, цитокініни – 6-бензиламінопурин; а також синтетичний препарат з біоцидними властивостями – етилтіосульфат, синтезований на кафедрі ТБСФБ НУ «Львівська політехніка».

Культивування бактерій у лабораторних умовах проводили в колбах Ерленмейера на ротаційній качалці (WL-2000, JV Electronic, Poland) за температури 30°C на мінеральному середовищі наступного складу (г/дм³): NaNO₃ – 4,0; K₂HPO₄×3H₂O – 2,0; KH₂PO₄ – 1,2; MgSO₄×7H₂O – 0,5; натрію цитрат – 5,0; дистильована вода – до 1 дм³. Як джерела вуглецю застосовано гліцерин, соняшниковий, фосфатидний концентрат (фуз олійний), пересмажену олію (30-50 г/дм³). Як інокулянт використовували 36-годинну культуру в експоненційній фазі росту (титр клітин 2×10⁸ КУО/см³) у кількості 10 % від об'єму поживного середовища. Культивування проводили за швидкості обертів мішалки 220 об/хв.

Визначення біомаси бактерій проводили за оптичною густиною [137] (спектрофотометрі UVmini – 1240 (“Shimadzu”, Japan), 540 нм за калібрувальним графіком. Також біомасу визначали й гравіметричним методом після висушування центрифугованого осаду клітин (6000 об/хв, 20 хв) за 102°C до постійної маси.

2.2 Методи виділення, очищення, аналізу ПАР

Екстракція ліпідів із супернатанту КР. Виділення ліпідів із супернатанту КР здійснювали шляхом екстракції сумішшю розчинників хлороформ/ізопропанол (2:1) з подальшим відділенням органічної фази. Розчинник випаровували під вакуумом [138].

Оптимізацію екстракції рамноліпідів з СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 проводили із застосуванням методу лінійних багатопараметрових рівнянь. Для підбору оптимальних екстрагентів використовували наступні розчинники: пентан, гексан, н-декан, бензол, тетрахлорметан, хлороформ, хлорбензол, ізобутанол, н-бутанол, пентанол, н-октанол, н-амілацетат, діетиловий ефір, етилацетат, толуол, циклогексанон. Після екстракції розчинники випаровували у вакуумі. Експериментальні результати з екстракції різними розчинниками обробляли за методом [139].

Метод ґрунтується на встановленні зв'язку між константою розподілу речовин між двома фазами (при екстракції) та фізико-хімічними властивостями екстрагентів з використанням принципу лінійності вільних енергій. Узагальнюючи значення логарифмів констант розподілу екстрагованої речовини для 6-10 і більше різних розчинників одержували багатопараметрове рівняння, що дозволяє спрогнозувати величини цих логарифмів для інших, недосліджених екстрагентів, а також отримати вказівки відносно самого хімізму екстракції. Найбільш ефективним є шестипараметрове рівняння:

$$\lg P = a_0 + a_1(n^2 - 1)/(n^2 + 2) + a_2(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1) + a_3V + a_4ET + a_5\delta^2 + a_6VM, \quad (2.1)$$

де P - маса ліпідів, що переходять із біомаси в 1 моль екстрагенту;

n - показник заломлення,

ε - діелектрична проникність органічного розчинника, які визначають його поляризованість, полярність, відповідальні за неспецифічну сольватацію розподілюваної речовини;

V - основність за Пальмом [140];

ET - електрофільність за Райхардтом;

δ - параметр Гільдебранда;

VM - мольний об'єм екстрагенту.

Значення окремих членів рівняння перевіряли згідно з рекомендаціями групи по кореляційному аналізу в хімії при IUPAC [139] шляхом почергового вилучення членів з визначенням величини R одержуваних рівнянь з меншим числом членів. Для встановлення кореляційного зв'язку між результатами експериментів (функції відгуку від сукупності факторів) використовували регресійний аналіз.

Визначення карбоксильної кислотності дирамноліпиду.

Дослідження кількості карбоксильних груп проводилось за методом Боема, з кондуктометричною фіксацією кінцевої точки титрування на лабораторному аналізаторі "МП 513 Lab Conductivity Meter" за температури 20 ± 10 С. Методика основана на взаємодії карбоксильних груп з гідроксидом натрію.

Досліджувану суміш (30 мл) титрували 0,01 М розчином НСІ кислоти, визначали її кількість, що витратили на титрування. Контрольне титрування: 30 мл 0,01 М розчину гідроксиду натрію 0,01 М розчином НСІ і визначали кількість НСІ, що витратили на титрування контрольної проби.

Вміст карбоксильних груп Кг розраховували за формулою:

$$K_g = (a - b) \times 0,01 \times K \div m \quad [\text{ммоль/г}], \text{ де}$$

a – кількість 0,01 М розчину НСІ, витраченого на титрування контрольної проби, мл;

b - кількість 0,01 М розчину НСІ, витраченого на титрування аналізованої проби, мл;

K – поправочний коефіцієнт для розчину НСІ

m – наважка дирамноліпиду, г

$$K_g = (28,5 - 24,2) \times 0,01 \times 0,98 \div 0,03 = 1,405 \text{ ммоль/г}$$

За теоретичними розрахунками на одну молекулу дирамноліпиду натрію (ДРNa), $M_r = 695$, витрачається один моль кислоти хлористоводневої, а на 1,00 грам ДРNa, витратиться 0,001439 моля НСІ, або 1,439 ммоль.

Отже похибка вимірювання становить $(1,439 - 1,405) \times 100 = 3,4 \%$

Ідентифікація ліпідів. Якісний аналіз ліпідів проводили за методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-А (ЗАО “Сорбполимер”, Росія) та DC-Alufolien Kieselgel 60 (Merck, Germany), як рухомі фази використано: 1) хлороформ-метанол-вода 65:25:4, 2) хлороформ-метанол-оцтова кислота 65:15:2 [141].

Для ідентифікації ліпідів проводили візуалізацію пластинок за допомогою специфічних реагентів:

- а) 5%-ого спиртової фосфорномолібденової кислоти (загальні ліпіди),
- б) орцинового реагенту (рамноліпіди). Орциновий реагент готували розчиненням 0,2 г орцину в 5 см³ сірчаної кислоти, після чого додавали 5 см³ етанолу при охолодженні.

Після нанесення відповідного реагенту пластинки проявляли за 110 °С.

Визначення концентрації рамноліпідів. Для визначення кількості рамноліпідів у культуральній рідині використовували орциновий метод із застосуванням спектрофотометра UVmini – 1240 (“Shimadzu”, Japan) [142]. Рамноліпіди з 5 см³ супернатанту КР екстрагували двічі з використанням 5 см³ суміші Фолча (хлороформ : метанол – 2:1). Після випарювання органічної фази під вакуумом екстракт ліпідів розчиняли в дистильованій воді. 1 см³ розчину швидко перемішували з 5 см³ орцинового реактиву (0,2 г орцину у 100 см³ концентрованої сірчаної кислоти) при охолодженні, витримували 15 хв на водяній бані за температури 90 °С і вимірювали оптичну густину на довжині хвилі 420 нм. Калібрувальний графік будували за рамнозою як стандартом.

Ферментоліз. Із метою максимальної дезінтеграції біомаси та отримання препарату СКР ферментоліз здійснюється протеазою за рН 8-11 при температурі 50±1°С у кінетиці від 0,5 до 6 годин при різних концентраціях. Кожну годину відбирали проби для визначення оптичної густини [143].

Визначення концентрації білка. Вміст білка в складі осаду ліпідів визначали за методом Бредфорд [144]. Для цього 0,1 г барвника Кумасі брильянтового голубого G-250 розчиняли в 50 см³ 95 %-ного етанолу. До утвореного розчину додавали 100 мл 85 %-ної ортофосфорної кислоти. Розчин доводили бідистилятом до об'єму 1 дм³ і фільтрували через фільтрувальний папір. Зразки, що містили білок, розчиняли у фосфатному буфері (рН 7,4) до концентрації 0,1-1 г/дм³. У пробірки, що містили 0,1 мл досліджуваного розчину білка, додавали 5 см³ реагенту. Як контроль використовували відповідний буфер. Через 5-7 хв вимірювали оптичну густину зразків на довжині хвилі 595 нм на спектрометрі UVmini – 1240 (“Shimadzu”, Japan). Вміст білка обчислювали за калібрувальним графіком (г/дм³). Стандарт для калібрувальної кривої – альбумін сироватковий ВРХ.

Визначення вмісту рамноліпідного біокомплексу. Поверхнево-активний рамноліпідний біокомплекс (РБК) виділяли з супернатанту культуральної рідини шляхом осадження 10%-ним розчином HCl при рН 3 та нагріванням до 60, 70, 80, 90, 105°C упродовж 5-20 хв, після чого виділяли продукт центрифугуванням (8000 об/хв., 20 хв.) [145].

2.3 Вивчення фізико-хімічних властивостей ПАР

Емульгувальна здатність біоПАР та їх комплексів визначали за індексом емульгування [146] у нашій модифікації: 10 см³ водного розчину ПАР або СКР та 10 см³ рідких парафінів (C₁₂-C₁₄) або гасу (НПЗ “Галичина”) або рослинних олій (Львівський жиркомбінат) перемішували впродовж 2 хв (гомогенізатор “Ми-2”), індекс емульгування E₂₄ визначали через 24 год як відношення висоти емульгованого шару до загальної висоти рідини.

Визначення поверхневого натягу. Поверхневий натяг супернатантів КР і розчинів ПАР визначали методом Дю-Нуї з використанням платинового кільця [147] на тензіометрі KRÜSS K6 (“KRÜSS” GmbH, Germany). Метод

базується на визначені сили втягування платиного кільця, яка обумовлена поверхневим натягом рідини.

Значення ККМ і СМД біоПАР та їх комплексів обчислювали із залежності поверхневого натягу від концентрації. Графічним методом по точці перетину прямих у координатах $\sigma - \ln C$ визначали значення ККМ. Граничну адсорбцію біоПАР визначали як тангенс кута нахилу прямої до графіку залежності $\ln C_{\text{ККМ}} - \ln C$ (C моль/дм³) [148]. Відносну концентрацію ПАР у культуральній рідині визначали за показником СМД (Critical micelle dilution) – розведення КР до величини ККМ. Вимірювали поверхневий натяг послідовних розведень КР, будували графік його залежності від логарифму розведення. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає значенню СМД.

Визначення краєвих кутів змочування рамноліпідного біокомплексу за різних концентрацій, а також для СКР на межі твердої, рідкої фаз і повітря для різних матеріалів проводили на катетометрі КМ-8 [149].

2.4 Визначення біологічної активності ПАР

Вплив ПАР на проникність клітинних мембран.

Зміну проникності клітинних мембран тестових мікроорганізмів вивчали за виходом позаклітинного білка [150.], концентрацію якого визначали за методом Бредфорда [144]. Чисельність життєздатних клітин мікроорганізмів визначали методом серійних розведень [151]. Для дослідження використовували тестові мікроорганізми: *Agrobacterium tumefaciens* та *Pseudomonas syringae*.

Мікроорганізми вирощували на м'ясо-пептонному агарі. Готували суспензію клітин у фосфатному буфері рН 7,5 з оптичною густиною 0,3 (довжина хвилі 540 нм) та додавали розчини досліджуваних ПАР за різних концентрацій. Суспензії витримували за кімнатної температури 1 годину та

визначали вміст білку на спектрометрі UVmini – 1240 (Shimadzu, Japan). Паралельно визначали чисельність життєздатність клітин мікроорганізмів методом серійних розведень [151].

Вплив рамноліпідних ПАР на поглинання мінеральних елементів проростками рослин. Вплив рамноліпідних ПАР (СКР, РБК) на поглинання поживних елементів рослинними клітинами (соняшник) досліджували із у водній культурі (модельний розчин) та оцінювали за зміною вмісту К, Са, Na у розчині, які визначали на полум'яному фотометрі ПФМ-3ОМЗ [152].

Токсичність ПАР та їх комплексів. Токсичність супернатанту культуральної рідини та рамноліпідного біокомплексу *Pseudomonas* sp. PS-17 досліджували із застосуванням люмінесцентних бактерій *Vibrio fischeri*

Тестування токсичності препаратів з *Vibrio fischeri* проводили за стандартною методикою з ліофілізованими бактеріями на люмінесцентному аналізаторі М500. Токсичність оцінювали за параметром EC_{50} – кількістю рамноліпідних ПАР, за якої спостерігається гальмування люмінесценції на 50 %. Результати обробляли за програмою MicrotoxOmni 38 [153].

Визначення впливу СКР і РБК на тестові мікроорганізми та їх впливу на активність етилтіосульфонату (ЕТС) проводили на 24-лункових пластикових планшетах (Sarstedt, США) з об'ємом лунок 200,0 мкл. Вплив рамноліпідних ПАР та їх композицій з ЕТС на культури мікроорганізмів-фітопатогенів *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia corotovora* оцінювали за мінімальними значеннями інгібувальної (МІК) і бактерицидної (МБК) концентрацій препарату [155]. Мінімальна концентрація препарату, яка давала повну видиму затримку росту культури (прозорий бульйон) відповідала МІК даного препарату щодо тестових культур. Для визначення бактерицидної дії препарату із останніх прозорих пробірок проводили висів на агаризоване середовище, за МБК приймали

найменшу концентрацію препаратів у пробірці, висів із якої після інкубації не давав росту на агарі.

2.5 Дослідження впливу біоПАР на рослини

Передпосівне оброблення насіння розчинами ПАР. Насіння олійних рослин – соняшника, редьки олійної, тифону поверхнево стерилізували сумішшю перексиду водню з етанолом (1:1), 5 хв, промивали водою та замочували у розчинах РБК (0,01 г/дм³) або СКР (1:200) за концентрацій, витримували 3 год і розкладали у лотки на вологий фільтрувальний папір (у контрольному варіанті насіння обробляли дистильованою водою). Повторність дослідів 4-х кратна (по 100 шт. насінин). Проростання та схожість насіння визначали згідно ДСТУ 4138-2002 [156]. Розкладали у чашки Петрі або лотки. Підраховували кількість пророслих насінин на 3 добу (схожість) та 5-7 добу (енергія проростання).

Вплив біоПАР на активність ауксинів визначали у 2-х біотестах: на активність індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) – у біотесті на відрізках колеоптилів пшениці (5 мм), за величиною їх приросту за 24 год [157], а також – на ризогенез 10-ти добових живців квасолі, які замочували впродовж 3-х год у розчинах СКР і РБК, індолмасляної кислоти (ІМК) та у їх сумішах. Живці пророщували у склянках з водою та визначали кількість, довжину та масу утворених корінців [158].

Дію біоПАР на активність гіберелінів визначали у біотестах на гіпокотиліях крес-салату (*Lactuca sativa*). Насіння, яке проростало протягом 28 год при кімнатній температурі у темряві, поміщали у чашки Петрі з досліджуваними розчинами, довжини гіпокотиля вимірювали після інкубації протягом 3 днів [159].

Для оцінки дії біоПАР на цитокініни визначали концентрацію хлорофілів *a*, *b* та каротиноїдів у листі пшениці спектрофотометричним

методом на приладі Shimadzu UVmini-1240 (Shimadzu Corporation, Японія). Маса наважки листя – 0,1 г, екстрагент – ацетон, розрахунок проводили за рівнянням Венштейна, у мг/г [160].

Дрібноділянкові і польові дослід проводили на ділянках 10 м², рослини вирощували впродовж 3-х місяців. Насіння соняшнику, тифону, редьки олійної та ріпаку попередньо замочували на 3 год в розчинах ПАР (0,01-0,05 г/дм³) і вирощували у ґрунті після чого визначали морфометричні показники рослин. Виробничі дослід по впливу біоПАР на рослини проводили: з соняшником (Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України) площа дослідних ділянок – 1 га. Дію рамноліпідних ПАР на якісні показники рослин визначали: масу 1000 насінин - за ДСТУ ГОСТ 10842–89 [161], вміст протеїну – за методом Кьельдаля ГОСТ 13496.4–93 [162], вміст жиру – за ГОСТ 10857–64 [163]

2.6 Статистичний аналіз

Повторність всіх мікробіологічних досліджень 3-х разова; у вегетаційних дослід з рослинами – 4-50- разова. Статистичний аналіз достовірності експериментальних даних проводили методами варіаційної статистики за Лакінім [164] та обробки даних за програмою Excel.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЙ РАМНОЛІПІДНИХ ПАР

3.1 Оптимізація синтезу рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17

Серед важливих чинників, що впливають на ефективність мікробного синтезу і собівартість цільових продуктів, велике значення має вибір оптимальних джерел вуглецю та їх кількості у складі поживного середовища. З практичної точки зору, значна увага приділяється використанню економічно вигідної сировини. У зв'язку з цим досліджено можливість та ефективність вирощування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищах з економічно вигідними субстратами (відходами виробництв). Встановлено доцільність отримання рамноліпідних ПАР на середовищах з дешевими і доступними джерелами вуглецю – фосфатидним концентратом (фузом олійним), пересмаженою олією, а також їх комбінацій з гліцерином (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Показники синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на поживних середовищах з різними джерелами вуглецю

Джерело вуглецю, г/дм ³	Рамноліпіди, г/дм ³	РБК, г/дм ³	Поверхневий натяг СКР, мН/м
Гліцерин, 30	7,8±0,3	9,5±0,4	28,3±0,3
Гліцерин, 40	9,0±0,4	11,8±0,5	28,5±0,3
Гліцерин, 50	12,0±0,5	14,0±0,6	28,3±0,3
Соняшникова олія, 30	8,9±0,4	10,0±0,4	29,3±0,3
Соняшникова олія, 40	9,3±0,4	10,2±0,5	29,3±0,4
Соняшникова олія, 50	7,3±0,3	9,1±0,4	29,5±0,2
Фуз олійний, 30	10,9±0,5	13,9±0,6	29,2±0,5
Фуз олійний, 40	10,5±0,5	13,0±0,6	29,2±0,4
Фуз олійний, 50	9,6±0,4	12,2±0,5	29,4±0,4

Примітки: джерело азоту - натрію нітрат, 4 г/дм³, результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Показано, що найбільший вихід рамноліпідних ПАР спостерігався на поживних середовищах з гліцирином у концентрації 50 г/дм³. Встановлено, що при культивуванні штаму на середовищі з фузом олійним за 30-40 г/дм³ кількість отриманих рамноліпідів була на 16,0-39,6 % більшою, ніж з гліцирином. При використанні пересмаженої соняшникової олії вміст одержаних ПАР був дещо нижчим.

Досліджено також ефективність дозованого додавання різних джерел вуглецю для біосинтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17. Як додаткові субстрати при вирощуванні штаму на середовищі з гліцирином (30 г/дм³) вносили пересмажену олію або фуз олійний за концентрації 15 г/л через 72 год процесу (табл.3.2).

Таблиця 3.2

Показники синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на поживних середовищах з дозованим додаванням різних джерел вуглецю

Джерело вуглецю, г/дм ³	Рамноліпіди, г/дм ³	РБК, г/дм ³	Поверхневий натяг СКР, мН/м
1	2	3	4
Гліцерин 30	7,8±0,3	9,8±0,4	28,3±0,3
Гліцерин 40	9,2±0,4	11,8±0,5	28,5±0,3
Гліцерин 50	12,8±0,6	13,8±0,6	28,3±0,3
Соняшникова олія 30	10,3±0,5	11,8±0,4	29,3±0,3
Соняшникова олія 40	9,4±0,4	10,2±0,5	29,3±0,4
Соняшникова олія 50	8,8±0,4	10,5±0,4	29,5±0,2
Фуз олійний 30	11,9±0,5	13,7±0,6	29,2±0,5
Фуз олійний 40	11,5±0,5	14,0±0,6	29,2±0,4
Фуз олійний 50	11,3±0,5	14,2±0,5	29,4±0,4
Гліцерин/соняшникова олія 30/15	15,0±0,7	16,1±0,7	29,5±0,3
Гліцерин/соняшникова олія 40/10	12,7±0,6	14,4±0,6	29,8±0,4

Показники синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на поживних середовищах з дозованим додаванням різних джерел вуглецю

1		2	3	4
Гліцерин/фуз 30/15	олійний	15,7±0,7	17,9±0,8	29,8±0,4
Гліцерин/фуз 40/10	олійний	12,4±0,5	14,0±0,6	29,8±0,4

Примітки: дозоване додавання джерел вуглецю, результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Встановлено, що при синтезі ПАР за режимом дозованого додавання субстратів показники синтезу РЛ суттєво підвищувалися: на гліцерині з фузом – на 23,43 %, а на гліцерині з олією – на 17,96 % (порівняно з ПС із самим гліцерином).

Здійснено якісний аналіз ліпідних екстрактів СКР, що містять ПАР, у культуральних рідинах, отриманих при вирощуванні продуценту на різних субстратах. Тонкошарові хроматограми ліпідних екстрактів приведено на рис.3.1.

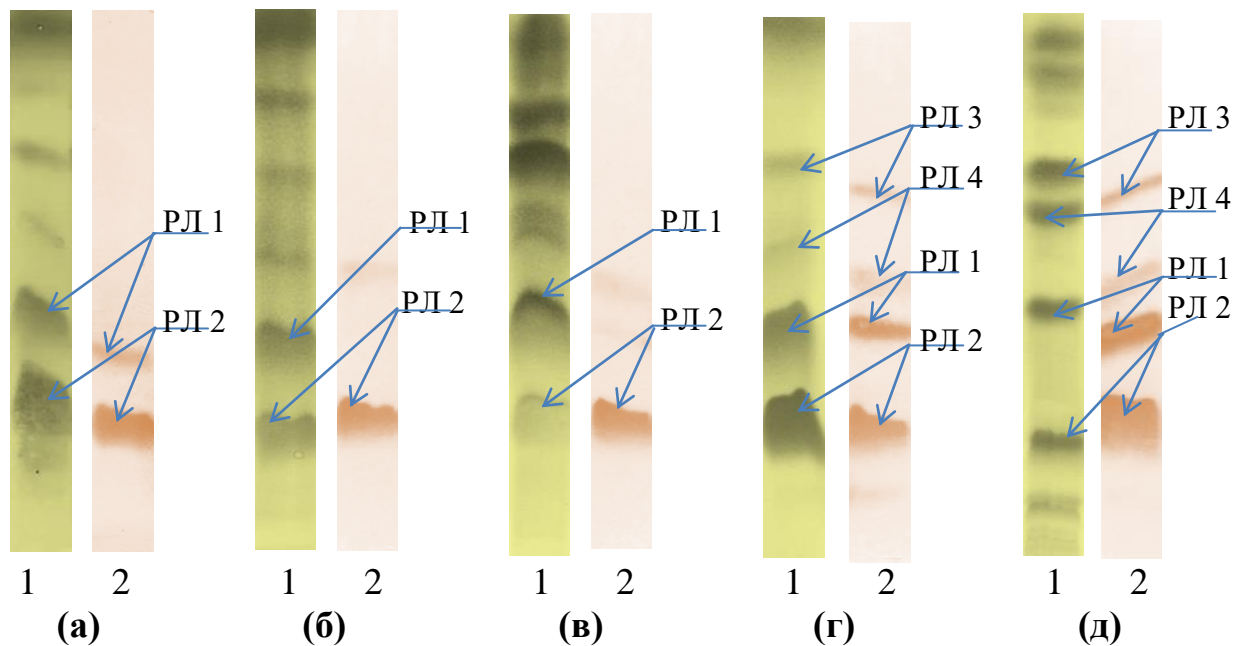


Рис. 3.1. Тонкошарові хроматограми ліпідних екстрактів з СКР *Pseudomonas* sp. PS-17, отриманого на середовищах з різними джерелами вуглецю: а) гліцерин, б) олія, в) фуз, г) гліцерин/олія, д) гліцерин/фуз;

візуалізація 5%-ним спиртовим розчином фосфорномолібденової кислоти (1) та орциновим реагентом (2).

Аналіз хроматограм свідчить, що при використанні відходів виробництв, а також їх композицій з гліцерином у складі синтезованих ліпідів переважають РЛ 1 і РЛ 2, що є ефективними ПАР.

Для підвищення кількості рамноліпідів досліджено вплив антранілової кислоти (при додаванні у поживне середовище при культивуванні), як можливого стимулятора синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

**Вплив антранілової кислоти на синтез ПАР штамом
Pseudomonas sp. PS-17**

Вміст антранілової кислоти у ПС, мМ	Рамноліпіди, г/дм ³	РБК, г/дм ³
0	11,8±0,6	13,7±0,6
50	12,1±0,5	13,8±0,5
100	14,3±0,6	16,3±0,7
200	13,0±0,6	15,0±0,6

Примітка: джерело вуглецю – гліцерин, 50 г/дм³, джерело азоту – натрій нітрат, 4 г/дм³.

Показано, що додавання антранілової кислоти за 100 мМ до ПС дозволило збільшити кількість РЛ на 21%, також збільшився вихід РБК на 19%, отже, може бути стимулювальним додатком для синтезу рамноліпідів.

З літератури відомо, що при розробленні технологій біоПАР важливими чинниками є тривалість вирощування та кількість посівного матеріалу (ПМ). У зв'язку з цим вивчено вплив цих факторів на синтез рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Вплив кількості посівного матеріалу на синтез рамноліпідних ПАР

Pseudomonas sp. PS-17

Кількість посівного матеріалу, % об.	АСБ, г/дм ³	Рамноліпіди, г/дм ³	РБК, г/дм ³
5	5,9±0,1	14,2±0,4	16,0±0,4
7,5	6,1±0,2	14,3±0,4	16,0±0,4
10	6,2±0,1	14,6±0,4	16,8±0,5
12,5	6,1±0,2	14,5±0,4	17,1±0,5
15	6,3±0,1	14,7±0,4	17,1±0,5

Примітки: ПМ вирощували на гліцерині, 36 год, титр – 2×10^8 КУО/мл.

Встановлено, що оптимальна кількість посівного матеріалу для біосинтезу рамноліпідних ПАР – 5 % від об'єму поживного середовища. Використання більших кількостей ПМ є економічно не вигідним, оскільки при його збільшенні на 50% біомаса та інші показники були в межах статистичної похибки. Досліджено також і вплив способу приготування ПМ на синтез рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вплив способу приготування посівного матеріалу на синтез рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17

Тривалість вирощування посівного матеріалу, год	Показники синтезу ПАР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17 на 5-ту добу культивування		
	АСБ, г/дм ³	Рамноліпіди, г/дм ³	РБК, г/дм ³
24	4,0±0,1	8,8±0,2	10,7±0,3
36	5,9±0,1	14,4±0,4	16,0±0,4
48	6,0±0,1	14,6±0,4	16,3±0,4

Примітки: кількість посівного матеріалу – 5 %, субстрат – гліцерин 30 г/л.

Встановлено, що оптимальним терміном вирощування посівного матеріалу для синтезу рамноліпідних ПАР є 36 год (табл. 3.5.).

Апробація технології рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на ферментаційному обладнанні. Для підтвердження ефективності розроблених оптимальних середовищ для отримання ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 проведено апробацію процесу на ферментері з вихровою системою аерації, який попередньо обраний для синтезу рамноліпідів.

Основними перевагами ферментера даної конструкції є запобігання надмірному піноутворенню, що відіграє особливу роль при культивуванні продуцентів ПАР. Здійснено апробацію пілотного виробництва ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищі з гліцерином і фузом олійним на ДП «Ензим» (Віницька обл.) на модифікованому біореакторі «Біор1» - об'єм 100 дм³, робочий об'єм – 60 дм³, швидкість перемішування – 400 об/хв.

Таблиця 3.6

Показники синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері і у колбах

Показники біосинтезу	Процес у колбах	Процес у ферментері
АСБ, г/ дм ³	5,8±0,2	6,78±0,2
Кількість продукту (за РЛ), г/ дм ³	13,4±0,4	19,9±0,4

Примітки: джерело вуглецю – гліцерин 30 г/дм³, фуз олійний 15 г/дм³, джерело азоту – натрій нітрат 4 г/дм³, результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Отже, показано ефективність і перспективність застосування вихрового ферментеру для виробництва рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 – досягнуто підвищення виходу продукту та скорочення тривалості біосинтезу. Концентрація продукту (за РЛ) збільшилася на 48,5 % порівняно з культивуванням у колбах, а тривалість процесу зменшилася на 20 % - 96 год у ферментері і 120 год у колбах. Отже, апробація синтезу рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 з використанням комбінованих субстратів у

вихровому ферментері показала практичну перспективність розробленої технології для отримання екологічно безпечних продуктів, зокрема препаратів для сучасного рослинництва.

Для ефективного виділення поверхнево-активних метаболітів *Pseudomonas* sp. PS-17 (рамноліпідів), які визначають функціональну активність цільових продуктів здійснено підбір оптимальних екстрагентів для оброблення пост ферментаційного супернатанту культуральної рідини. Досліджено процеси екстракції із супернатанту культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 поверхнево-активних рамноліпідів.

Найбільш ефективним методом виділення РЛ із СКР є їх переведення у фазу органічного розчинника з подальшим його видаленням. Враховуючи складну структуру цих речовин, необхідно провести експериментальний пошук оптимального екстрагента.

Відомо, що в процесах екстракції (розподіл речовин між двома фазами) можливе встановлення зв'язку між константою розподілу і фізико-хімічними властивостями екстрагентів за принципом лінійності вільних енергій.

Так як сольватаційні процеси, які проходять при екстракції, являються молекулярними, то експериментальні дані кількості екстракту, поглиненого однаковими кількостями розчинника із однакової кількості СКР в грамах перерахували в кількість речовини, екстрагованої теоретично 1 молям розчинника. Дані приведені в табл. 3.7.

Таблиця 3.7

**Експериментальні і теоретично розраховані дані екстракції
рамноліпідів із СКР *Pseudomonas* sp. PS-17**

Екстрагент	G_m г/л	G_m г/моль	$\lg G_m$		
			експер.	розрах.	Δ
1	2	3	4	5	6
Пентан	9.320	1.4441	0.1596	0.0943	-0.0653

**Експериментальні і теоретично розраховані дані екстракції
рамноліпідів із СКР *Pseudomonas* sp. PS-17**

1	2	3	4	5	6
Гексан	6.697	1.0957	0.0397	0.1083	0.0686
<i>n</i> -Декан	9.075	1.7688	0.2477	0.2224	-0.0253
Бензол	8.385	0.7476	-0.1263	-0.1958	-0.0695
Тетрахлорметан	8.324	0.5149	-0.0943	-0.1097	-0.0154
Хлороформ	10.795	0.8048	-0.0603	-0.0136	0.0467
Хлорбензол	6.485	0.8703	-0.1820	-0.1358	0.0462
Ізобутанол	12.115	0.6576	0.0491	0.0481	-0.0010
<i>n</i> -Бутанол	13.324	1.1196	0.0903	0.0638	-0.0265
Пентанол-2	9.675	1.2310	0.0219	0.0368	0.0149
<i>n</i> -Октанол	9.695	1.0516	0.1853	0.1552	-0.0301
<i>n</i> -Амілацетат	6.547	1.5322	-0.0123	0.0414	0.0537
Диетиловий ефір	6.855	0.5991	-0.1474	-0.1447	0.0027
Етилацетат ^а	6.121	0.9720	-0.2225	-0.0182	0.2043
Толуол ^а	4.845	0.7122	-0.2883	-0.1639	0.1244
Циклогексанон ^а	18.985	1.9660	0.2936	-0.1810	-0.4746

Примітки: *G* – маса ПАР (г), екстрагованих 1 молям розчинника

Узагальнення та оброблення табличних даних дозволило отримати шестипараметрове рівняння.

$$\lg G_m = -0,2646 - (2,5006 \pm 0,5607)f(n^2) - (1,0102 \pm 0,3069)f(\varepsilon) - (0,0006 \pm 0,0002)V + (0,0257 \pm 0,0081)E_T + (0,0001 \pm 0,0004)\delta^2 + (0,0025 \pm 0,0003)V_M \quad (3.1.)$$

Достатньо висока величина коефіцієнту кореляції $R=0,973$ вказує на адекватність одержаного рівняння; середнє квадратичне відхилення $s \pm 0,030$.

При розгляді знаків при окремих членах рівняння особливо варто звернути увагу на додатній знак при E_T , що і не дивно, так як він

характеризує можливу електрофільну сольватацію карбонільного кисню рамноліпиду. Також екстракція спиртами характеризується відповідно високими значеннями G_m .

Безпосередньо оцінити внесок кожного члена рівняння в сумарний ефект неможливо – величини парних коефіцієнтів кореляції між $\lg G_m$ і окремими членами рівняння $< 0,5$ а при деяких членах стандартні відхилення більші від їх абсолютних значень. А тому для оцінки значимості окремих членів рівняння використовували методику ЮПАК, яка полягає в почерговому виключенні окремих членів рівняння з їх почерговим визначенням R .

На основі вищесказаного, одержано чотирипараметрове рівняння (3.2), R якого тільки несуттєво нижчі рекомендованого значення ($R \geq 0,95$)

$$\lg G_m = - 0,0808 - (3,1075 \pm 0,5686) f(n^2) - (0,0010 \pm 0,0002) B + (0,0175 \pm 0,0030) E_T + (0,0027 \pm 0,0004) V_M \quad (3.2)$$

$$R = 0,9432; S \pm 0,0445$$

В таблиці 3.6. приведені відповідні розраховані і експериментальні значення $\lg G_m$, а також їх відхилення.

Встановлено, що основною характеристикою екстрагентів є їх електрофільність, а дані по екстракції рамноліпідів можуть бути адекватно узгоджені з властивостями розчинників за допомогою шестипараметрового рівняння лінійності вільних енергій. Кращими екстрагентами є вищі спирти, що пов'язано з електрофільною сольватацією складноєфірної групи (за допомогою водневого зв'язку), а також, можливо, паралельним розташуванням алкільних ланцюгів спирту і β - оксидеканової кислоти молекули рамноліпіда.

За результатами вказаних математичних розрахунків підібрано оптимальні екстрагенти для максимального виходу рамноліпідів з СКР.

Для визначення найбільш енергетично вигідної структури молекул рамноліпідів здійснено квантово-хімічні розрахунки структурних елементів РЛ-2 з використанням методів NWChem 6.1.1 та ORCA 2.8 (метод функціоналу густини, функціоналу B3LYP, Perdew91), розраховано електронну структуру РЛ2 – повні електронні енергії, на базі яких визначено потенціал іонізації, енергію найвищої зайнятої молекулярної орбіталі (НОМО), найнижчої вільної молекулярної орбіталі (LUMO), дипольні моменти, розподіл парціальних зарядів на атомах (за Маллікеном). Визначено зміщення електронної густини у бік –СО груп, що свідчить про можливість зв'язування (адсорбції) молекул РЛ цими групами із різними поверхнями (рис 3.2).

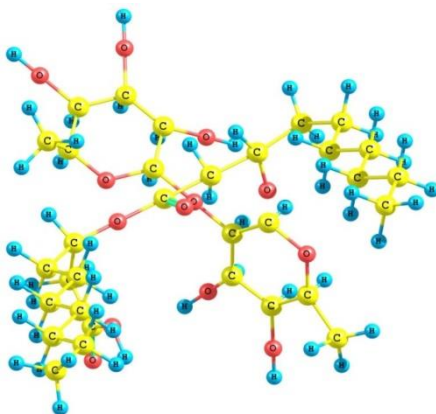


Рис. 3.2 Оптимізована структура дирамноліпиду

Для підтвердження структури рамноліпідів визначено також карбоксильну кислотність за методом Боема, з кондуктометричною фіксацією кінцевої точки титрування. Проведені розрахунки показали, що на одну молекулу дирамноліпиду натрію (ДРNa), $M_r = 695$, витрачається один моль хлористоводневої кислоти, а на 1,00 грам ДРNa, витратиться 0,001439 моля HCl, або 1,439 ммоль. Отже, з високою точністю визначено наявність карбоксильної групи у молекулі РЛ2: похибка вимірювання становить $(1,439 - 1,405) \times 100 = 3,4 \%$.

3.2 Розроблення цільових продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17

Оскільки відомо, що виробництво біогенних ПАР найбільше лімітується високою вартістю процесів їх виділення та очищення, актуальним завданням є оптимізація методів отримання ефективних форм цільових продуктів. Кінцевим продуктом штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 є постферментаційна культуральна рідина – природний розчин ПАР, яка може бути цільовим препаратом, зокрема для рослинництва (продукт №1). Собівартість цього продукту є достатньо низькою, оскільки процес його отримання включає культивування штаму з наступним обробленням культуральної рідини ензимом протеазою С – ферментолізом або термічним обробленням. Наступним цільовим продуктом *Pseudomonas* sp. PS-17 є супернатант культуральної рідини, який можна отримати шляхом сепарування клітин (продукт №2). Оскільки обидва продукти – культуральна рідина і СКР є біодеградабельними, постає проблема збільшення терміну їх придатності. Для цього здійснено підбір раціональних консервантів за наступними вимогами: 1) ефективність дії за низьких концентрацій; 2) відсутність впливу на функціональні властивості продуктів; 3) економічна вигідність; 4) низька токсичність. Досліджено вплив низки консервантів, які використовуються у сучасній промисловості: Dovicil 75, Salimix (MCI), Germall, Bronopol, Тимол, парабени, на термін зберігання продуктів, на їх склад та поверхневу активність (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Чисельність мікроорганізмів у СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 під впливом консервантів

Консерванти	Концентрація консервантів, г/дм ³	Кількість життєздатних клітин після додавання консервантів, КУО			
		0	336	744	1080
1	2	3	4	5	6
Germall (Plus)	0	-	8×10^{11}	5×10^{12}	6×10^{12}

Таблиця 3.8 (продовження)

Чисельність мікроорганізмів у СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 під впливом консервантів

1	2	3	4	5	6
Germall (Plus)	0,1	-	2×10^5	6×10^{11}	8×10^{12}
	0,3	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Тимол	0	-	8×10^{11}	5×10^{12}	6×10^{12}
	0,1	-	3×10^{10}	6×10^{11}	6×10^{12}
	0,3	-	5×10^9	2×10^{12}	8×10^{12}
	0,5	-	2×10^4	6×10^4	3×10^{11}
	1	-	-	-	-
Вронорол	0	-	8×10^{11}	5×10^{12}	6×10^{12}
	0,1	-	2×10^4	5×10^6	3×10^8
	0,3	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Salimix (MCI)	0	-	8×10^{11}	5×10^{12}	6×10^{12}
	0,1	-	3×10^3	6×10^7	6×10^9
	0,3	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Dowicil 75	0	-	8×10^{11}	5×10^{12}	6×10^{12}
	0,1	-	4×10^4	6×10^8	6×10^{10}
	0,3	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-

Таблиця 3.8 (продовження)

Чисельність мікроорганізмів у СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 під впливом консервантів

1	2	3	4	5	6
Метил-парабен	0	-	8×10^{11}	5×10^{12}	6×10^{12}
	0,1	-	7×10^{10}	11×10^{11}	8×10^{12}
	0,3	-	8×10^9	5×10^{12}	9×10^{12}
	0,5	-	2×10^6	6×10^{11}	3×10^{12}
	1	-	-	-	-

Результати свідчать, що найкращими консервантами (за вищезазначеними критеріями) є Salimix (MCI), Bronopol та Dowicil 75 за концентрації 0,3 г/л. Отже, додавання визначених консервантів можна рекомендувати для збільшення терміну використання препаратів КР та СКР *Pseudomonas* sp. PS-17.

Також досліджено вплив обраних консервантів на склад препарату СКР та його поверхневу активність через 45 діб зберігання (табл.3.9).

Таблиця 3.9

Вплив консервантів на поверхневий натяг СКР *Pseudomonas* sp. PS-17

Консерванти	Поверхневий натяг, (σ) _s , мН/м			
	0 год	24 год	744 год	1080 год
Контроль	28,0±0,8	28,1±0,7	42,2±1,2	55,0±1,6
Germall (Plus)	28,5±0,8	28,6±0,8	28,9±0,8	28,8±0,8
Bronopol	28,3±0,8	28,4±0,8	29,0±0,8	28,9±0,8
Salimix (MCI)	28,8±0,8	28,6±0,8	28,8±0,8	28,8±0,8
Dowicil 75	28,5±0,8	28,4±0,8	29,0±0,9	29,2±0,9

Примітка. Вміст консервантів – 0,3 г/дм³

Як свідчать результати, найважливіша фізико-хімічна характеристика СКР – поверхневий натяг у суміші з консервантами практично не

змінювався, тобто при використанні обраних консервантів не будуть змінюватися функціональні властивості препаратів КР та СКР *Pseudomonas* sp. PS-17.

Також досліджено вплив консервантів на якісні характеристики цільових продуктів – вміст активних компонентів (рамноліпідів та РБК) у препараті СКР через 45 днів (табл.3.10).

Таблиця 3.10

Вплив консервантів на вміст рамноліпідних ПАР у супернатанті культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. PS-17

Консерванти	РБК, г/дм ³		Рамноліпіди, г/дм ³	
	0 год	1080 год	0 год	1080 год
Контроль	14,1±0,7	-	12,6±0,61	-
Germall (Plus)	14,0±0,6	14,1±0,7	12,1±0,5	12,0±0,5
Bronopol	14,0±0,6	13,9±0,6	12,7±0,6	12,7±0,5
Salimix (MCI)	14,1±0,7	14,1±0,6	12,4±0,6	12,3±0,6
Dowicil 75	14,1±0,7	14,0±0,6	12,5±0,6	12,7±0,6

Примітки: результати достовірні за $p \leq 0,05$

Встановлено, що супернатант культуральної рідини під дією консервантів (0,3 г/дм³) не втрачає своїх властивостей і може використовуватися як для екстракції РЛ, так і для осадження РБК.

Як показано раніше, перспективним продуктом штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 також є рамноліпідний біокомплекс (продукт №3), до складу якого входять рамноліпіди і полісахарид. Для розроблення більш раціонального та економічного методу отримання важливого цільового продукту проведено оптимізацію методів виділення РБК із СКР *Pseudomonas* sp. PS-17. Запропоновано спосіб отримання РБК шляхом регулювання температурного режиму процесу, а саме додавання до супернатанту культуральної рідини розчину HCl з подальшим нагріванням та охолодженням системи. Визначено

оптимальні температурні параметри осадження РБК та тривалість (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Вміст рамноліпідного біокомплексу у супернатанті культуральної ріднини *Pseudomonas* sp. PS-17 після термічного оброблення

t°	Тривалість, хв	Маса РБК, г/л	Вміст рамноліпідів в РБК, %
4 $^{\circ}$	600	12,3 \pm 0,6	80
60	20	15,9 \pm 0,7	89
70	20	16,4 \pm 0,8	90
80 $^{\circ}$	20	16,1 \pm 0,9	88
90 $^{\circ}$	15	15,5 \pm 0,7	89
105 $^{\circ}$	5	14,4 \pm 0,8	89

Примітки: результати достовірні за $p \leq 0,05$

Визначено, що оптимальним способом виділення РБК із супернатанту КР є нагрівання системи до +70 $^{\circ}$ C впродовж 20 хв з подальшим охолодженням до +20 $^{\circ}$ C – одержаний у результаті осад містить 88-90 % рамноліпідів. Розроблений підхід дає змогу збільшити кількість продукту на 32,7 % (до 16,39 г/дм 3).

Для підтвердження ефективності виділення рамноліпідного біокомплексу методом кислотного осадження з регулюванням температури, проведено порівняльний аналіз залишкових концентрацій поверхнево-активних речовин та фізико-хімічних показників КР після виділення РБК (Рис.3.3, Табл.3.12).

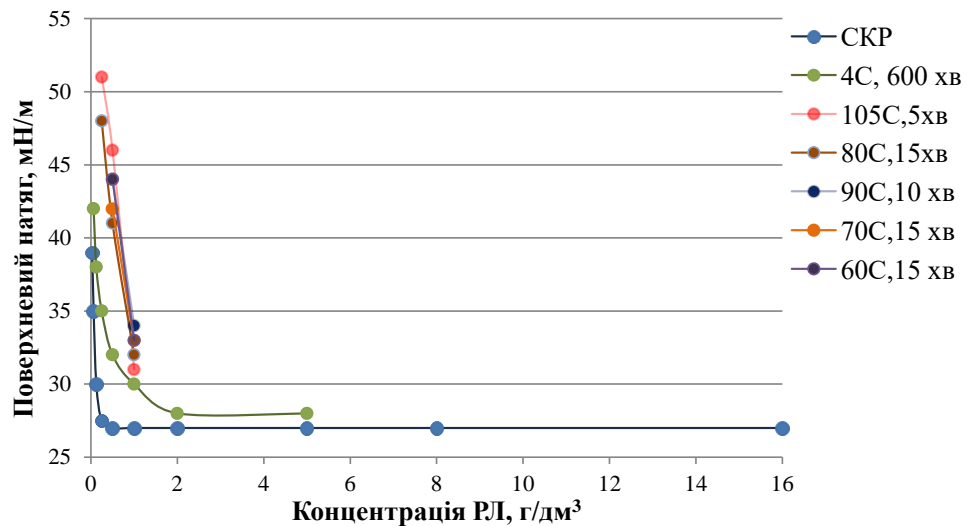


Рис. 3.3. Залежність поверхневого натягу СКР *Pseudomonas* sp. PS-17 (після осадження РБК) від вмісту залишкових рамноліпідів.

Таблиця 3.12

**Вміст рамноліпідів у супернатанті культуральної рідини
Pseudomonas sp. PS-17 після виділення РБК**

t ^o	Тривалість, хв	Вміст ліпідів в надосадовій рідині, г/дм ³
4	600	5,0±0,21
60	15	0,7±0,03
70	15	0,7±0,02
80	15	0,7±0,03
90	10	0,8±0,04
105	5	0,6±0,03
Контроль (СКР)		16,2±0,79

Показано, що оптимізація процесу виділення дозволяє знизити залишкові концентрації поверхнево-активних речовин в 10 раз. Згідно з одержаними результатами СКР після осадження все ж мість рамноліпідні ПАР, які можна використовувати для зрошування полів, родючості ґрунтів.

3.3 Фізико-хімічні і біологічні властивості отриманих ПАР

Кути змочування. Змочування – це взаємодія рідин з поверхнею твердих тіл, відіграє значну роль у багатьох біологічних і технологічних процесах. Для вивчення змочувальних властивостей рамноліпідних ПАР, визначали контактні кути змочування водних розчинів РБК і СКР залежно від концентрації. Визначали змочувальні характеристики ПАР на різних поверхнях (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

Зміни змочування поверхонь різних матеріалів розчинами СКР та РБК

Pseudomonas sp. PS-17

Препарат	Скло	Листова поверхня	Політетрафлуоретен	Поліметил-метакрилат
Контроль	40,0±2,1	75,0±2,3	90,0±4,2	65,0±3,3
СКР 1:100	23,5±1,4	37,0±1,3	35,2±2,1	37,3±1,3
СКР 1:200	28,4±1,0	41,2±2,1	40,0±2,2	41,3±1,9
СКР 1:300	23,5±1,2	43,0±1,3	43,1±2,1	44,1±2,1
РБК 0,01	34,0±1,6	51,3±2,1	50,0±2,3	47,0±2,1
РБК 0,05	34,0±1,6	45,6±1,7	50,0±2,3	47,0±1,1
РБК 0,1	30,0±1,3	39,0±2,1	42,0±2,1	40,0±0,2
РБК 0,2	27,0±1,3	35,0±1,2	37,5±1,6	38,0±1,7

Примітки: СКР в розведеннях, РБК – в г/дм³.

Одержані результати мають практичне значення для трактування і регулювання ряду природних явищ та розробки технологічних процесів.

Емульгуювальні властивості рамноліпідних ПАР *Pseudomonas sp. PS-17*.

Дослідження здатності рамноліпідних ПАР до емульгування водонерозчинних речовин має велике значення для практичного застосування, зокрема у сільському господарстві. Визначено показники емульгування різних матеріалів

за допомогою препаратів СКР *Pseudomonas* sp. PS-17, які одержано при вирощуванні продуценту на ПС з різними джерелами вуглецю (рис. 3.4, 3.5).

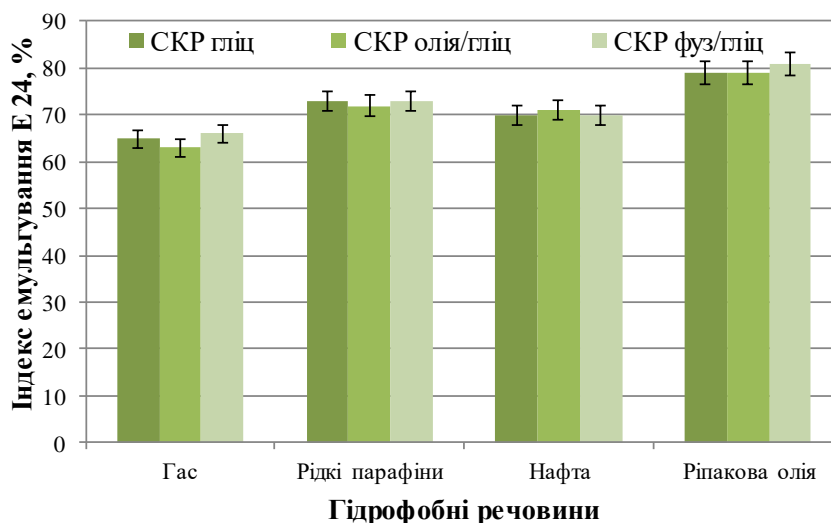


Рис. 3.4. Емульгувальні властивості препаратів СКР *Pseudomonas* sp. PS-17, отриманих на різних вуглецевих субстратах.

Показано, що розчини СКР *Pseudomonas* sp. PS-17 ефективно емульгують різні рослинні олії, вуглеводні тощо – індекс E_{24} становить 60-80 %.

Особливість рамноліпідних ПАР – здатність емульгувати вуглеводні при різних значеннях рН. Залежність показника емульгування E_{24} гасу розчином РБК (0,50 г/дм³) від рН середовища представлена на рис.3.5.

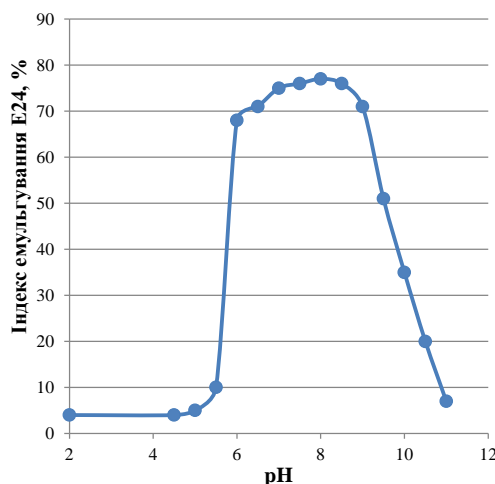


Рис. 3.5. Утворення емульсій препаратів СКР (розведення 1:100) з соняшниковою олією за різних рН

Як свідчать дані, препарат СКР *Pseudomonas* sp. PS-17 утворює емульсії за різних значень рН середовища, що має практичне значення для їх застосування у різних галузях промисловості і сільського господарства.

Біологічні властивості отриманих ПАР. Вплив на проникність клітинних мембран. Для застосування біоПАР у сільському господарстві необхідні дані про їх вплив на клітини рослин й мікроорганізмів. Показано, що рамноліпідні ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 сприяють зміні проникності клітинних мембран мікроорганізмів-фітопатогенів (рис. 3.6).

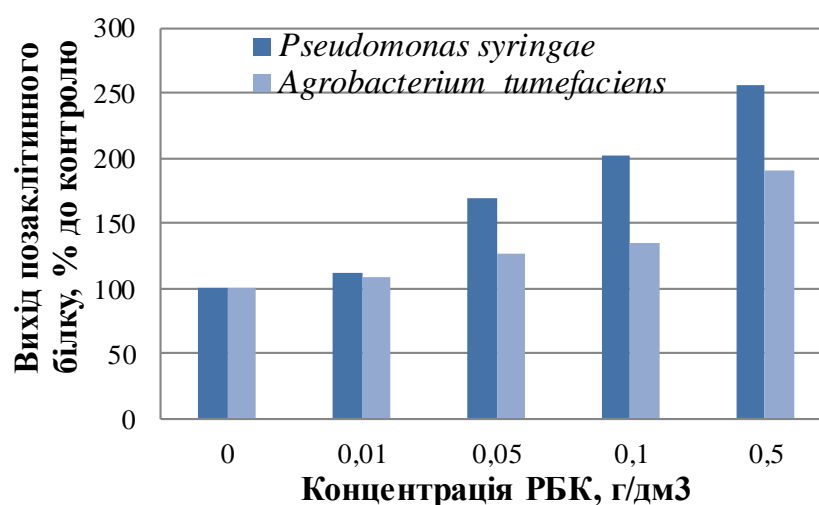


Рис.3.6. Вплив рамноліпідного біокомплексу на вихід білка з клітин *Agrobacterium tumefaciens* та *Pseudomonas syringae*

Встановлено, що РБК за концентрації 0,05-0,5 г/дм³ сприяє підвищенню проникності клітинних мембран фітопатогенів, практично не впливаючи на життєздатність клітин. Здатність рамноліпідних ПАР регулювати проникність мембран мікроорганізмів є важливою для їх використання при створенні ефективних композицій для фармації, сільського господарства, для підсилення дії регуляторів росту рослин, добрив тощо.

Важливим результатом для застосування у рослинництві є також встановлення їх впливу ПАР на проникність клітинних мембран рослин. Це досліджено розробленим нами методом, що ґрунтується на визначенні вмісту

мінеральних (поживних) елементів у модельному розчині після вирощування проростків (на водній культурі) та порівняння його з початковим їх вмістом (рис.3.7).

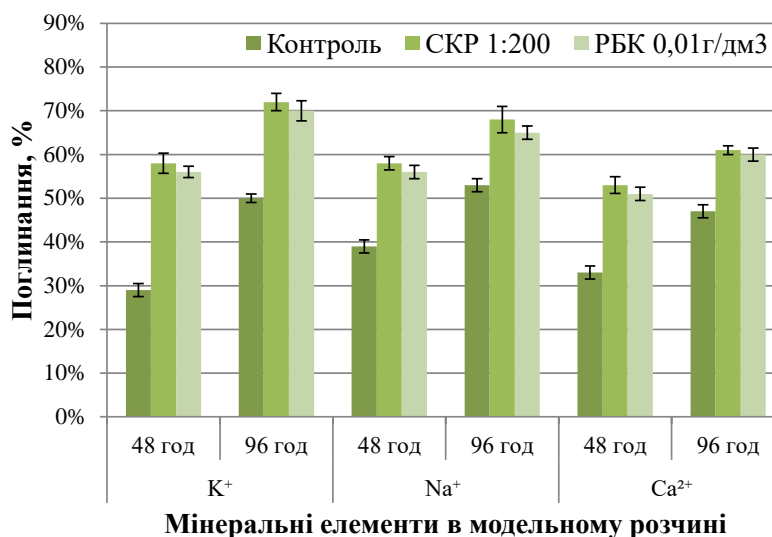


Рис. 3.7. Дія рамноліпідних ПАР (СКР 1:200, РБК 0,01 г/дм³) на поглинання мінеральних елементів проростками соняшника (48, 96 год)

Встановлено, що передпосівне оброблення насіння соняшника розчинами РБК і СКР сприяло збільшенню поглинання іонів: K⁺, Na⁺, Ca²⁺ на 30-61% проростками рослин із модельного поживного розчину. Одержані результати вказують на перспективність використання рамноліпідних ПАР при створенні ефективних композицій для сільського господарства на основі регуляторів росту рослин, добрив тощо.

Вплив біоПАР на активність фітогормонів. Для екологічно безпечного сільського господарства актуальним є створення ефективних стимуляторів росту рослин, підвищення активності існуючих. Встановлено, що ПАР *Pseudomonas sp.* PS-17 у композиціях з фітогормонами (ауксини, цитокініни, гіберелінова кислота) сприяють підвищенню їх активності

У біотесті на приріст відрізків колеоптилів пшениці, який використовують для оцінки активності ауксинів, встановлено здатність СКР та РБК *Pseudomonas sp.* PS-17 впливати на дію індолілоцтової кислоти (ІОК).

Вплив ІОК (1,75 мг/дм³) на колеоптилі пшениці в комбінації з ПАР істотно посилювався: приріст відрізків був на 28 % більшим, ніж у варіанті без ПАР, і наближувався до дії ІОК за концентрації, у 10 разів більшої - 17,5 мг/дм³ (рис 3.8).

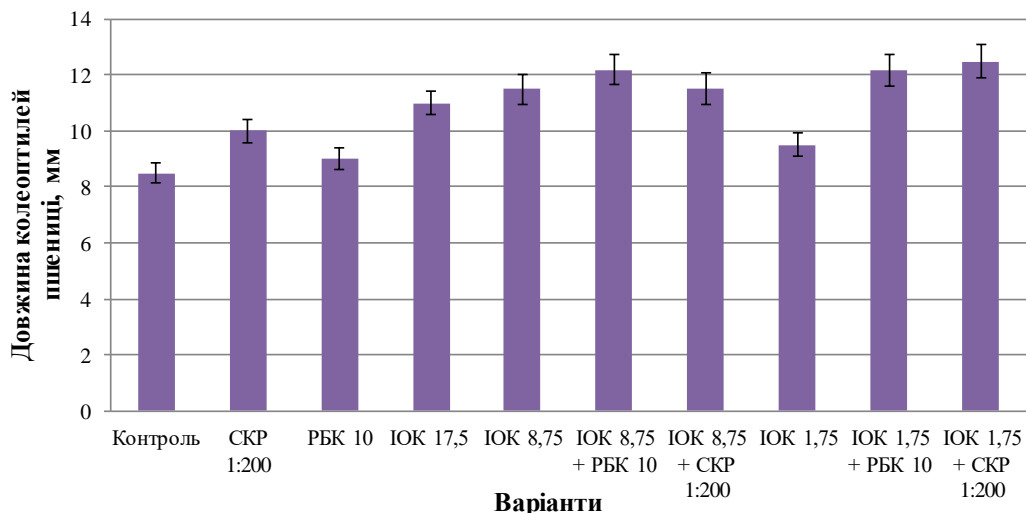


Рис. 3.8. Вплив рамноліпідних ПАР на приріст відрізків колеоптилів пшениці за дії ІОК (РБК та ІОК, мг/дм³, СКР –розведення)

Це опосередковано вказує на збільшення проникності мембран рослинних клітин пшениці для надходження ІОК. Подібний до ІОК вплив на рослини мають деякі синтетичні сполуки, які належать до її аналогів. Так, відома здатність індоліл-3-масляної кислоти (ІМК) – аналога ауксину – впливати на процеси ризогенезу, причому вона значно активніша, ніж природний фітогормон ІОК. Перевагою ІМК є більш висока стійкість у тканинах рослин, тому вона застосовується для прискорення коренеутворення. В зв'язку з цим досліджено вплив рамноліпідних ПАР на ІМК у біотесті на ризогенез живців квасолі. Встановлено, що при замочуванні живців у розчині СКР (розведення 1:200) спостерігалось збільшення загальної кількості корінців на 43,7 %, їх маси – на 58,7 % порівняно з контролем, проте у варіанті з РБК (10 мг/дм³) впливу на ризогенез не спостерігалось. Не виключено, що ефективність СКР пов'язана також з наявністю ауксинів, які, за літературними даними, можуть синтезувати бактерії роду *Pseudomonas*. При сумісній дії ІМК з РБК або СКР загальна

кількість коренів зросла в середньому на 62,5 %, їх маса – на 63,1 % порівняно з варіантом обробки розчином ІМК без ПАР (табл.3.14.).

Таблиця 3.14

Вплив рамноліпідних ПАР на ризогенез живців квасолі

Варіант, мг/дм ³	Кількість коренів, шт./рослину	Маса коренів, г/10 рослин	Довжина кореня, мм
Контроль	16±0,8	0,18±0,008	7,3±0,4
ІМК 5	87±4,3	0,58±0,02	11,84±0,7
ІМК 2,5	56±2,8	0,37±0,02	9,41±0,4
ІМК 2,5 + РБК 10	91±4,5	0,60±0,03	18,63±0,9
ІМК 2,5 + СКР 1:200	85±4,2	0,60±0,03	19,01±1,1
СКР 1:200	23±1,3	0,28±0,02	15,33±0,9
РБК 10	18±1,0	0,21±0,01	14,81±0,8

Отримані результати вказують на можливість зменшення ефективної концентрації ІМК (зі збереженням її активності) за допомогою СКР і РБК. Це свідчить про перспективність використання рамноліпідних ПАР при створенні комплексних препаратів з фітогормонами ауксинової природи.



Контроль ІМК 5 мг/дм³ РБК 10 мг/дм³ ІМК 5 мг/дм³+ РБК 10 мг/дм³

Рис. 3.9. Ризогенез живців квасолі під впливом ІМК та суміші ІМК з РБК

штаму *Pseudomonas* sp. PS-17

Виявлено також стимулювальну дію рамноліпідних ПАР і на фітогормони інших груп. Так, встановлено вплив РБК і СКР на активність гіберелінової кислоти (ГК) у біотесті на проростання насіння салату (рис. 3). Показано, що за обробки гіпокотилів салату розчином РБК (10 мг/дм³) їх довжина не змінювалася, тоді як препарат СКР (розведення 1:200) сприяв збільшенню їх довжини у 2 рази відносно контролю. На нашу думку, це можна пояснити наявністю гіберелінової кислоти у складі СКР, що узгоджується з літературними даними про синтез цих фітогормонів мікроорганізмами роду *Pseudomonas*. За сумісної дії ГК (25 мг/дм³) з ПАР довжина гіпокотилів збільшилась у середньому в 1,3 разів порівняно з обробкою розчином ГК без ПАР.

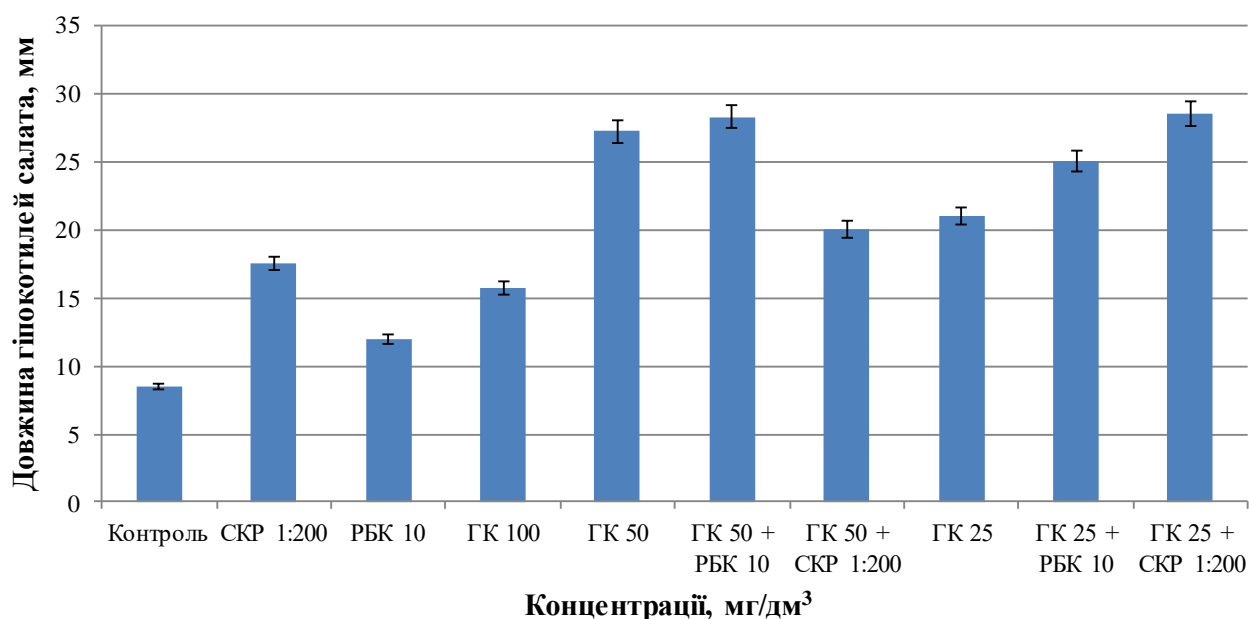


Рис. 3.10. Вплив рамноліпідних біоПАР на проростання насіння салату (РБК та ГК – у мг/дм³, СКР – у розведеннях)

Дію рамноліпідних ПАР на фітогормони іншої групи – цитокініни оцінювали за зміною вмісту хлорофілів *a*, *b* та каротиноїдів у тканини верхнього листка пшениці озимої під впливом 6-бензиламінопурину (БАП, 5 мг/дм³), а також біоПАР та їх сумішей з фітогормонами (табл. 3.15).

Вплив 6-бензиламінопурину, рамноліпідних ПАР та їх сумішей на вміст хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів у листках пшениці озимої

Вміст пігментів, мг/г сирі маси				
Варіант, мг/дм ³	Хлорофіл <i>a</i>	Хлорофіл <i>b</i>	Сума каротиноїдів	Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i>
1	2	3	4	5
Контроль	1,7±0,08	0,7±0,03	0,7 ±0,03	2,5±0,12
РБК 10	1,8±0,08	0,6±0,03	0,8±0,04	2,8±0,14
СКР 1:200	1,8±0,09	0,7±0,04	0,7±0,04	2,6±0,12
6-БАП 10	1,9±0,09	0,8±0,05	0,8±0,04	2,4±0,12
6-БАП 5	1,5±0,08	0,7±0,05	0,6±0,03	2,2±0,11
6-БАП 5 + РБК 10	2,1±0,1	0,7±0,04	1,2±0,06	2,8±0,14
6-БАП 5 + СКР 1:200	2,2±0,1	0,7±0,04	1,2±0,07	3,2±0,16

Одержані дані свідчать, що під дією рамноліпідних ПАР вміст хлорофілу *a* незначно збільшувався відносно контролю, а при їх застосуванні сумісно з БАП (5 мг/дм³) зростав на 24–30 % (див. табл. 2). Обидві рамноліпідні ПАР у сумішах з БАП істотно впливали на вміст каротиноїдів, який зростав на 63–67 % відносно контролю, вміст хлорофілу *b* змінювався неістотно.

Отримані результати мають велике значення, оскільки відомо, що вміст основних пігментів фотосинтезу визначає фізіологічний стан рослин, їх здатність до формування врожаю, а також впливає на їх стійкість до несприятливих умов.

Отримані результати вказують на можливість зменшення діючої концентрації фітогормонів (зі збереженням її активності) за допомогою СКР і РБК, що свідчить про перспективи використання рамноліпідних ПАР при створенні комплексних препаратів з фітогормонами.

Антимікробна активність рамноліпідних ПАР та їх композицій з біоцидами. Розроблення ефективних і безпечних біоцидних препаратів для

захисту сільськогосподарських рослин від фітопатогенів є актуальним завданням сучасної біотехнології. Доцільність використання рамноліпідних ПАР у комплексних засобах для рослинництва пов'язані з їх фізико-хімічними властивостями та низькою токсичністю. Встановлено, що отримані ПАР можуть сприяти підвищенню активності антимікробних речовин, зокрема в сумішах з синтетичним аналогом фітонцидів часнику – етилтіосульфонатом (ЕТС) Ця сполука характеризується низькою розчинністю у воді, що ускладнює її використання. Досліджено активність розроблених композицій щодо низки мікроорганізмів-фітопатогенів: *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* і *Erwinia corotovora* (табл.3.16).

Таблиця 3.16

**Антимікробна активність композицій етилтіосульфонату з
рамноліпідними біоПАР**

Мікроорганізми	ЕТС, г/дм ³		ЕТС + РБК 0,01 г/дм ³		ЕТС + СКР 0,01 г/дм ³	
	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК
<i>Clavibacter michiganensis</i>	0,02	0,07	0,02	0,05	0,01	0,04
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0,02	0,05	0,01	0,03	0,005	0,03
<i>Xanthomonas campestris</i>	0,05	0,09	0,01	0,03	0,01	0,02
<i>Pseudomonas syringae</i>	0,02	0,04	0,01	0,02	0,01	0,02
<i>Erwinia corotovora</i>	0,02	0,04	0,01	0,02	0,01	0,02

Примітки: 1. – МІК – мінімальна інгібувальна, МБК – мінімальна біоцидна концентрації препаратів. 2. РБК і СКР у композиціях – 0,01г/дм³

Отримані результати свідчать, що композиції СКР з етилтіосульфонатом є активнішими щодо фітопатогенів, ніж сам ЕТС, про що свідчать нижчі значення мінімальних інгібувальних концентрацій (на 50-80 %) та мінімальних біоцидних концентрацій – на 40-42,8%. Встановлено, що у композиціях з РБК також можна

суттєво зменшити МІК етилтіосульфонату – на 50 % та його МБК – на 28,6-66,8 %. Такий ефект можна пояснити впливом рамноліпідних ПАР на проникність клітинних мембран мікроорганізмів-фітопатогенів.

Отже, властивості біоПАР вказують на значний їх потенціал при створенні агропрепаратів для регуляції росту і захисту рослин. Застосування синтезованих рамноліпідних ПАР для підвищення ефективності засобів для рослинництва також є перспективним й актуальним напрямком сучасного екологічно безпечного сільського господарства.

Визначення фітотоксичності СКР штаму *Pseudomonas sp. PS-17*. Для визначення фітотоксичності СКР (1:200) і її сумішей з консервантами (0,3 г/дм³) використовували стандартний метод біотестування за допомогою редису посівного (*Raphanus sativus* var. *radicula* Pers.).

Таблиця 3.17

Визначення фітотоксичності супернатанту культуральної рідини та її сумішей з консервантами

Тест-рослина	Варіант дослідження	Енергія проростання, %	Довжина пагона, см	Фітотоксичний ефект, %
Редис	Контроль	91,0	4,2 ± 0,1	-
	СКР	97,0	5,2 ± 0,2	Відсутній
	СКР + Bronopol 0,3	96,0	5,1 ± 0,2	Відсутній
	СКР + Salimix 0,3	96,0	5,4 ± 0,2	Відсутній
	СКР + Germall 0,3	92,0	4,9 ± 0,2	Відсутній
	СКР + Dovicil 75 0,3	98,0	4,9 ± 0,2	Відсутній

Показано, що препарати СКР покращують морфометричні показники проростків на 16-27 %. Фітотоксичний ефект (ФЕ) препарату СКР в сумішах з консервантами був відсутній. У всіх варіантах спостерігався приріст надземної частини редиски в порівнянні з контролем.

Висновки до розділу 3

Встановлено доцільність використання доступних і дешевих джерел вуглецю: фосфатидного концентрату (фузу олійного) і пересмаженої олії, а також їх комбінацій з гліцерином для синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17. Показано ефективність дозованого додавання субстратів (гідрофільних і гідрофобних) – при культивуванні за режимом дозованого додавання субстратів вміст рамноліпідів суттєво підвищувався: на гліцерині з фузом – на 23,43 %, а на гліцерині з олією – на 17,96 % (порівняно з середовищами із гліцерином).

Проведено оптимізацію методів виділення рамноліпідних ПАР із скр *Pseudomonas* sp. PS-17. Розроблено 5 цільових продуктів, за принципом раціонального застосування екзо- та ендо-метаболітів. Що дозволило використати компоненти КР, які традиційно в технології отримання рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 були побічними (відходами), а саме: полігідроксиалканоат (виділений з біомаси) а також фугат.

Досліджено фізико-хімічні і біологічні властивості розроблених продуктів. Встановлено що вони мають високу емульгувальну, поверхневу активність, покращують змочування поверхонь. Показано, що отримані препарати здатні до регулювання проникності клітинних мембран рослин та мікроорганізмів, що є важливим для їх використання у рослинництві. Встановлені біологічні властивості СКР і РБК вказують на перспективи їх застосування у комплексі з засобами захисту та регуляторами росту рослин для їх стійкості до хвороб, підвищенню врожайів.

За результатами досліджень, що наведені в розділі, опубліковано 3 статті: одна – іноземна [172], та одна у фаховому виданні, що входить до наукометричних баз даних [181].

РОЗДІЛ 4

ЗАСТОСУВАННЯ РАМНОЛІПІДНИХ ПАР У РОСЛИННИЦТВІ

У наш час важливим завданням, яке може бути вирішено біотехнологією є розроблення безпечних для довкілля і людей препаратів широкого спектру активності для використання у сучасному рослинництві. Пояснюється це зростаючим забрудненням ґрунтів, кормів, харчових продуктів синтетичними пестицидами, регуляторами росту, добривами, які широко використовуються впродовж багатьох років. Ще одна проблема пов'язана з низькою ефективністю існуючих агрозасобів, наслідком чого є зменшення врожаїв, якості одержаної продукції, отже, економічні збитки для сільського господарства. У зв'язку з цим, пріоритетними у наш час є препарати природного походження, зокрема біотехнологічного, оскільки вони можуть мати високу ефективність, широкий спектр дії, але разом з тим є деградабельними й низькотоксичними. Отже, створення препаратів для сільськогосподарських рослин на основі біогенних ПАР є перспективним напрямком, зважаючи на їх фізико-хімічні і біологічні властивості. Серед важливих агрокультур все більшого значення в усьому світі набувають олійні рослини у зв'язку з їх багатоцільовим призначенням – для різноманітних харчових продуктів (рослинні олії, маргарини, жири), для кормів, а також для виробництва біодизельного палива. Макуха і шрот з насіння олійних рослин містять до 30-40 % цінного білку, тому їх використовують як протеїнові добавки для тварин та для збагачення комбикормів органічним фосфором і кальцієм. У сучасній альтернативній енергетиці багатьох країн світу олійні рослини є цінною сировиною для виробництва дизельного біопалива, отже, їх часто називають культурами третього тисячоліття. У зв'язку з вищезазначеним, розроблення екологічно чистих препаратів для технологій вирощування олійних рослин є актуальною проблемою

4.1 Лабораторні досліді по впливу рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на олійні рослини.

На нашу думку, враховуючи властивості одержаних рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, вони можуть бути використані у технологіях вирощування сільськогосподарських рослин у різних напрямках:

- як регулятори росту (для передпосівного оброблення насіння) для стимулювання росту й фізіологічних процесів, збільшення продуктивності
- для розроблення композицій із засобами захисту, регуляторами росту рослин.

Для встановлення впливу одержаних рамноліпідних ПАР на олійні культури передусім необхідно було визначити їх дію на лабораторну схожість та на проростання насіння. Так, досліджено вплив супернатанту культуральної рідини (за різних розведень) на морфометричні показники низки олійних культур (тифону, соняшника, редьки, ріпаку) за передпосівного оброблення насіння (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Дія препаратів на основі супернатанту культуральної рідини *Pseudomonas* sp. PS-17 на ростові показники олійних культур

Препарати для оброблення насіння	Маса кореня, г	Маса пагона, г	Довжина кореня, см	Довжина пагона, см
1	2	3	4	5
Соняшник сорту Чумак				
Контроль	0,22±0,010	0,35±0,015	3,1±0,13	4,3±0,21
СКР 1:50	0,20±0,009	0,33±0,011	2,25±0,10	3,43±0,15
СКР 1:100	0,31±0,011	0,41±0,012	2,9±0,14	4,7±0,17
СКР 1:200	0,32±0,013	0,48±0,013	4,1±0,19	5,05±0,20
СКР 1:300	0,32±0,011	0,48±0,012	4,0±0,19	5,10±0,15

Таблиця 4.1 (продовження)

Дія препаратів на основі супернатанту культуральної рідини *Pseudomonas* sp. PS-17 на ростові показники олійних культур

1	2	3	4	5
Ріпак				
Контроль	0,42±0,012	0,35±0,014	6,0±0,30	3,5±0,17
СКР 1:50	0,33±0,013	0,32±0,012	6,1±0,24	2,8±0,14
СКР 1:100	0,50±0,021	0,40±0,012	7,1±0,30	3,8±0,15
СКР 1:200	0,55±0,021	0,48±0,019	7,8±0,31	4,5±0,18
СКР 1:300	0,50±0,015	0,41±0,012	7,7±0,30	4,3±0,13
Тифон				
Контроль	0,41±0,02	0,20±0,008	5,0±0,25	2,8±0,11
СКР 1:50	0,38±0,01	0,16±0,004	4,2±0,21	2,0±0,08
СКР 1:100	0,60±0,02	0,36±0,014	6,3±0,25	3,8±0,19
СКР 1:200	0,59±0,02	0,38±0,015	6,2±0,24	3,8±0,15
СКР 1:300	0,61±0,03	0,38±0,011	6,5±0,26	3,5±0,14
Редька олійна				
Контроль	0,42±0,020	0,30±0,012	3,0±0,15	3,2±0,12
СКР 1:50	0,23±0,010	0,36±0,014	4,1±0,20	1,8±0,05
СКР 1:100	0,50±0,022	0,40±0,016	4,3±0,21	3,8±0,15
СКР 1:200	0,58±0,017	0,41±0,016	4,2±0,16	3,8±0,19
СКР 1:300	0,55±0,016	0,41±0,020	4,3±0,17	3,9±0,19

Примітки: СКР – супернатант культуральної рідини; n = 45; показники вірогідно відмінні від контролю, P < 0,05

Як свідчать наведені результати, СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 (за передпосівного оброблення насіння) здатний значно стимулювати ріст досліджених олійних рослин, причому ефективність його дії залежить від його розведення. Показано, що при оптимальному розведення СКР 1:200- маса

кореневої і надземної частин соняшника зростали на 45,4 і 37,1 % відповідно, ріпаку – на 30,9 і 37,1 %, тифону – на 43,9 і 90,0% та редьки олійної – на 38,0 і 36,6 % порівняно із контролем. Довжини кореневої і надземної частини соняшника були на 32,2 і 17,4 % більшими, ніж у контрольному варіанті, ріпаку – на 30,0 і 28,5 %, тифону – на 24,0 і 35,7 % та редьки олійної – на 40,0 і 18,7 % відповідно. Отже, для препарату СКР було обрано розведення 1:200 для подальшого розроблення препаратів для олійних рослин.

Досліджено також ефективність різних форм препаратів на основі ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, а саме рамноліпідів, рамноліпідного біокомплексу та СКР. Так, встановлено, що рамноліпідний біокомплекс (0,01 г/дм³) та супернатант культуральної рідини (за розведення 1:200) є ефективними регуляторами росту олійних рослин, зокрема ріпаку, тифону, редьки та соняшнику.

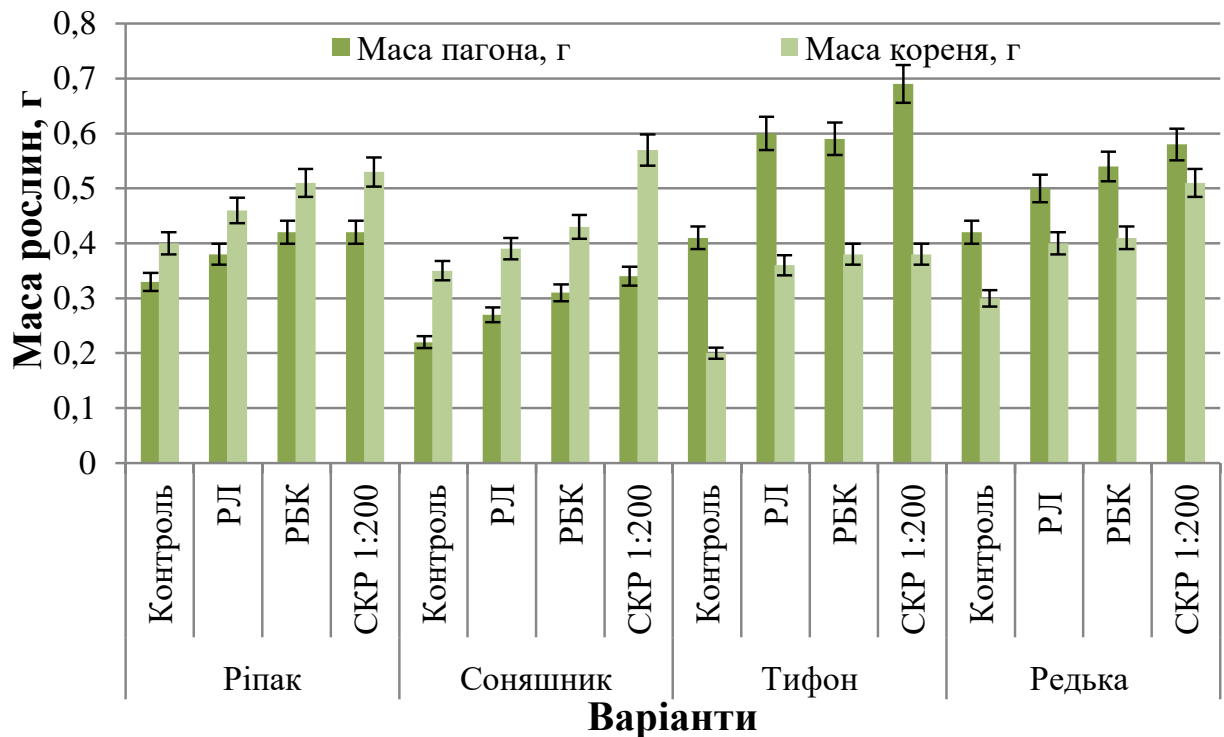


Рис. 4.1. Вплив рамноліпідних ПАР на ростові показники олійних рослин: РЛ – рамноліпіди; РБК – рамноліпідний біокомплекс; СКР – супернатант культуральної рідини

Встановлено, що ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 є стимулятором росту олійних рослин. Порівняльні дослідження впливу на рослини розчинів рамноліпідів та рамноліпідного біокомплексу (0,01 г/дм³) показали більшу активність РБК: надземна та коренева маса ріпаку та соняшника зросли за обробки РБК на 10-15 % більше, ніж за використання РЛ. Застосування препарату СКР було найбільш ефективним, оскільки передпосівне оброблення насіння сприяло зростанню маси кореневої і надземної частин соняшника на 62 і 54 % відповідно, ріпаку – на 32 і 27 %, тифону – на 90 і 68 %, редьки олійної – на 70 і 38 % щодо контролю. Високу ефективність препарату СКР ми пояснюємо наявністю у ньому не тільки поверхнево-активних, а й інших біологічно активних метаболітів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 (фітогормонів, амінокислот, вітамінів), які також виявляють стимулювальний вплив на ріст рослин. Заслуговує на увагу той факт, що препарат СКР є дешевшим за РЛ і РБК, тобто економічно вигідним.

Вплив рамноліпідних ПАР на рослини пов'язаний, ймовірно, із поліпшенням біодоступності поживних речовин або гідрофобних молекул рослинами, наприклад, біоПАР підвищують змочуваність ґрунту і підтримують кращий розподіл хімічних добрив у ґрунті, сприяючи поглинанню поживних речовин рослиною (Sachdev і Cameotra 2013). Під дією біоПАР підвищується енергія проростання насіння, ростові, біохімічні показники рослин, а у результаті – врожайність.

Враховуючи, актуальність розроблення економічно й екологічно вигідних препаратів для рослин, було досліджено вплив препаратів СКР *Pseudomonas* sp. PS-17 отриманих на різних джерелах вуглецю, на ростові показники соняшника. Раніше було показано, що СКР *Pseudomonas* sp. PS-17, отриманий при культивуванні на гліцерині, стимулює розвиток проростків і підвищує енергію проростання [18]. Ймовірно, це пов'язано із здатністю біоПАР змінювати властивості поверхні кореня та сприяти його колонізації бактеріями [19]. Також відомо, що біоПАР забезпечують покращення змочуваності ґрунту й

підтримують потрібний розподіл у ньому поживних речовин, таким чином, сприяючи покращенню росту рослин [20]. (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Ростові показники соняшника за оброблення насіння сорту Чумак препаратами СКР, отриманими на середовищах з різними субстратами

Джерела вуглецю у поживних середовищах	Пагон		Корінь		Схожість, %
	Довжина, см	Маса, г	Довжина, см	Маса, г	
Контроль	3,7±0,1	0,2±0,006	7,2±0,2	0,5±0,01	89
Гліцерин 50	5,7±0,2	0,3±0,01	10,8±0,3	0,8±0,03	95
Гліцерин/фуз олійний 30/15	5,9±0,2	0,4±0,01	9,8±0,3	0,8±0,03	96
Гліцерин/олія 30/15	6,0±0,2	0,4±0,01	9,5±0,3	0,7±0,02	95

Примітки: СКР – супернатант культуральної рідини; n = 40, показники вірогідно відмінні від контролю, P < 0,05.

Встановлено, що передпосівне оброблення насіння соняшника розчином СКР, отриманим на поживному середовищі з гліцерином, сприяло збільшенню довжини пагона на 56 %, а кореня – на 50 % порівняно з контролем, а також приросту маси пагона і кореня на 47 % і 61 % відповідно. При використанні змішаних субстратів також спостерігався значний стимулювальний ефект, а саме: з препаратом СКР, отриманим на середовищі з гліцерином і фузом, довжина пагона була більшою на 60 %, кореня - на 35 % порівняно з контролем, а маса пагона і кореня – на 65 % і 59 % відповідно, з СКР (гліцерин/олія) – 63 % і 31 % та 65 % та 48 % відповідно. Отже, застосування препаратів СКР *Pseudomonas* sp. PS-17, отриманих при культивуванні на різних субстратах, зокрема економічно вигідних, показало високу стимулювальну дію.

Для з'ясування одного з ймовірних механізмів дії рамноліпідних ПАР на рослини (при обробленні насіння), враховуючи їх фізико-хімічні властивості, досліджено вплив СКР та РБК штаму *Pseudomonas sp.* PS-17 на поглинання води і розчинів насінням соняшнику (процес набрякання) (рис.4.2).

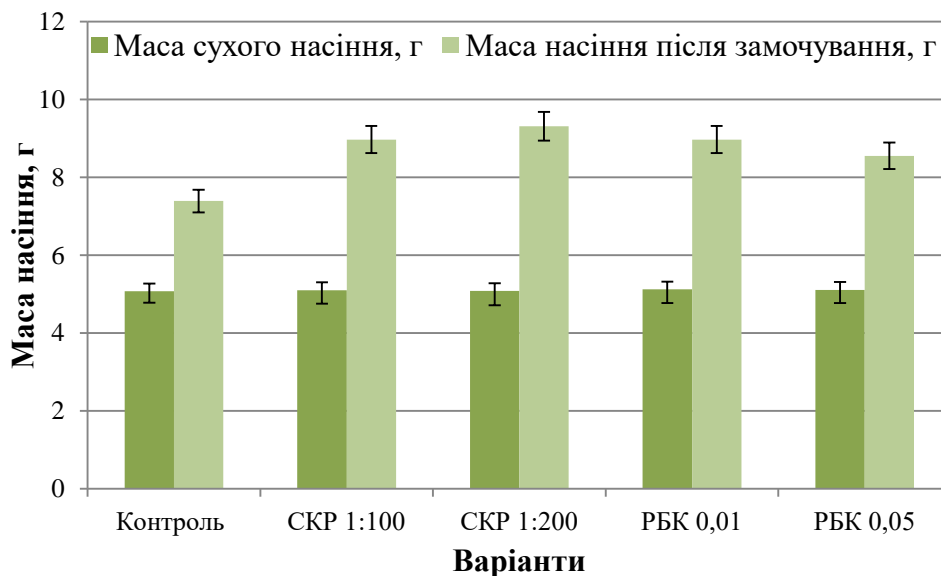


Рис. 4.2. Зміна набрякання насіння соняшнику під дією рамноліпідних ПАР: РБК – рамноліпідний біокомплекс; СКР – супернатант культуральної рідини

Встановлено, що в результаті замочування насіння соняшнику у розчинах препаратів РБК або СКР його маса збільшувалася на 13-27 % порівняно із контрольним варіантом. Це дуже важливий ефект, оскільки відомо, що забезпечення проростання насіння [8,9іл] є передумовою активного розвитку проростків рослин, а також їх витривалості і відповідно для отримання високих врожаїв.

Як свідчать отримані результати, під впливом препаратів рамноліпідних ПАР підвищувався вміст хлорофілів *a* і *b*, а також суми каротиноїдів у листках соняшнику. Отже, можна припустити, що розроблені рамноліпідні ПАР сприяють активуванню окисно-відновних процесів у рослинах.

4.2 Підвищення стійкості соняшнику до несприятливих умов за дії рамноліпідних ПАР.

У наш час актуальною проблемою рослинництва та охорони довкілля залишається проблема підвищення стійкості рослин до несприятливих умов середовища, зокрема ґрунтів – наявність різноманітних забруднень у ґрунті, дефіцит вологи, підвищений вміст солей. У зв'язку з цим завданням було випробувано здатність препаратів на основі ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 для покращення росту рослин соняшнику в модельних умовах посухи. Для цього у лабораторному експерименті насіння соняшнику, попередньо оброблене розчинами СКР та РБК вирощували на середовищах з манітом, що імітувало умови дефіциту вологи у ґрунті.

Показано, що передпосівне замочування насіння пшениці у розчинах ПАР сприяло збільшенню схожості на 12-18 %, енергії його проростання – на 15-25 % на середовищах із манітом (рис. 4.3).

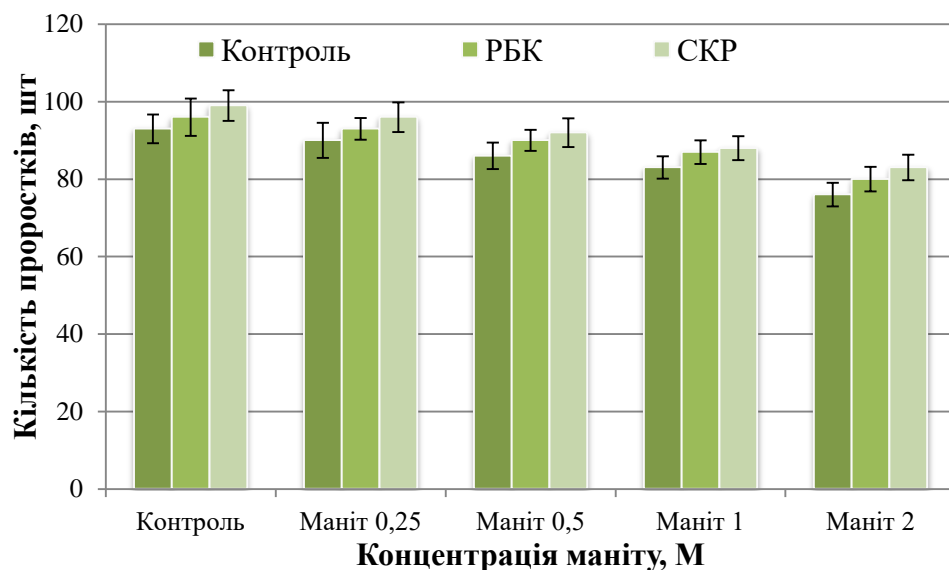


Рис. 4.3 Вплив рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на проростання насіння соняшнику на модельному середовищі з манітом

Результати показали, що ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 (за оброблення насіння їх розчинами) позитивно впливають на енергію проростання насіння соняшнику у модельних умовах посухи.

Встановлено також, що на середовищах з манітом після оброблення насіння соняшнику препаратом СКР (1:200) збільшувалися морфометричні параметри проростків соняшнику порівняно з насінням, обробленим водою: маса пагона зростала на 31-131 %, довжина кореня – на 26-87 % та пагона – на 27-133 % (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Вплив рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на морфометричні показники соняшнику сорту Чумак у модельних умовах посухи

Препарати для оброблення насіння	Вміст маніту у середовищі, М	Маса пагона, г	Довжина кореня, мм	Довжина пагона, мм
Оброблення водою	0	0,38±0,017	40,1±2,00	41,0±2,0
Оброблення водою	2,0	0,19±0,009	21,6±0,8	18,0±0,8
СКР 1:200	2,0	0,28±0,008	29,1±1,1	25,7±1,1
РБК, 0,01 г/дм ³	2,0	0,25±0,011	27,2±1,0	23,0±0,9
Оброблення водою	1,0	0,23±0,009	27,5±1,0	29,1±1,1
СКР 1:200	1,0	0,31±0,012	32,5±1,3	34,9±1,4
РБК, 0,01 г/дм ³	1,0	0,30±0,012	33,0±1,3	33,3±1,4
Оброблення водою	0,5	0,28±0,011	30,8±1,2	32,3±1,2
СКР 1:200	0,5	0,34±0,013	37,6±1,1	40,9±1,7
РБК, 0,01 г/дм ³	0,5	0,33±0,010	37,3±1,1	38,7±1,6
Оброблення водою	0,25	0,33±0,013	31,4±1,0	33,3±1,3
СКР 1:200	0,25	0,44±0,017	40,4±1,1	41,9±1,7
РБК, 0,01 г/дм ³	0,25	0,41±0,016	39,5±1,2	39,1±1,2

Примітки: РБК – рамноліпідний біокомплекс; СКР – супернатант культуральної рідини; n=45, показники вірогідно відмінні від контролю P<0,05.

Таку дію препаратів СКР і РБК можна пояснити покращенням поглинання води та поживних речовин рослинами, покращенням змочування ґрунтових часток. Отримані результати свідчать про перспективність використання рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 для адаптації рослин до несприятливих умов, що є важливою проблемою сільського господарства та екології.

4.3 Дрібноділянкові та виробничі дослідження по впливу рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на олійні рослини.

Ефективність передпосівного оброблення насіння соняшнику, препаратами рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 встановлено у дрібноділянкових експериментах, проведених впродовж 2012-2014 років. Аналіз проводили за ростовими характеристиками рослин, а також за якісними показниками одержаного врожаю.

Показано, що у дослідних рослин, вирощених на відкритому ґрунті, величина площі листової пластинки збільшувалася у 1,8 - 2 рази (рис 4.3). Відомо, що цей показник є важливим для розвитку рослин, оскільки добре розвинені листові поверхні сприяють збільшенню накопичення вегетативної маси рослин. Крім того, існує навіть зв'язок між площею листової поверхні, чистою продуктивністю, а також накопиченням сухої маси та врожайністю рослин.



Рис. 4.4. Вплив рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на розміри поверхні листової пластинки соняшнику за передпосівного оброблення насіння: а) супернатант культуральної рідини, б) контроль (вода)

Збільшення асиміляційної поверхні листя може бути пов'язано з інтенсивністю процесів фотосинтезу у рослин, тому доцільним також було дослідження впливу рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 (РБК та СКР) на вміст фотосинтетичних пігментів (хлорофілу а, хлорофілу б, сумарного вмісту каротиноїдів) у листках соняшнику (рис.4.4).

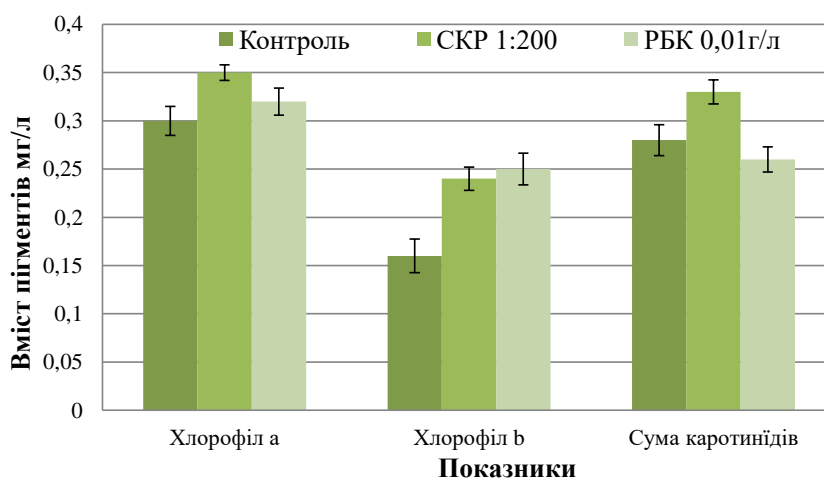


Рис. 4.5. Вплив біоПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на вміст пігментів фотосинтезу у листках соняшнику: СКР – супернатант культуральної рідини; РБК – рамноліпідний біокомплекс; контроль (вода)

Як свідчать дані експерименту, під дією рамноліпідних ПАР суттєво збільшувався вміст хлорофілу а – на 6 % (з РБК) і на 16 % (з СКР), хлорофілу

в -56 % і 50 % відповідно, проте сумарний вміст каротиноїдів збільшився тільки після оброблення насіння препаратом СКР – на 16 %.

У дрібноділянкових дослідах показано, що передпосівне оброблення насіння розчинами препаратів супернатанту культуральної рідини або рамноліпідного біокомплексу позитивно впливає і на інші важливі ростові показники соняшника, які характеризують процеси розвитку рослин та формування врожаю, у першу чергу – це діаметр кошика, а також висота і діаметр стебла (рис. 4.5).

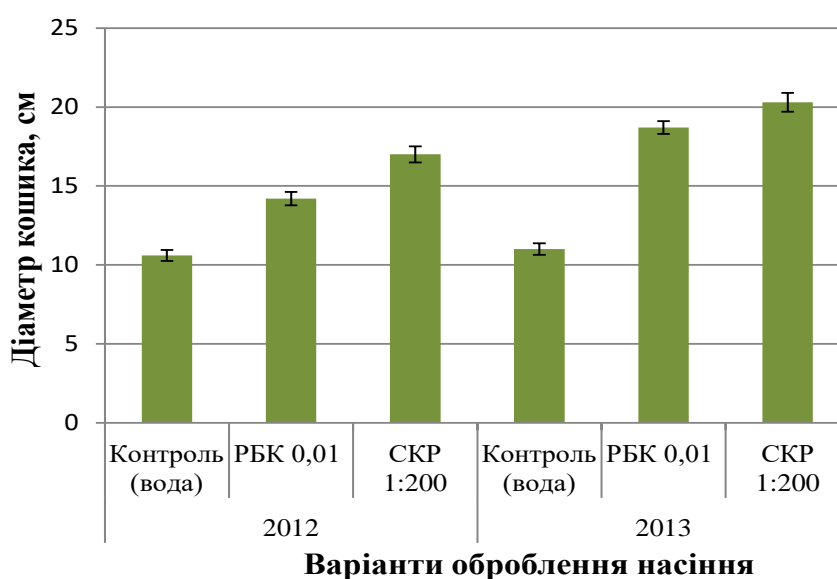


Рис. 4.6. Ростові показники соняшнику сорту Чумак (діаметр кошику) при використанні рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17

Як свідчать результати, за використання препаратів СКР і РБК суттєво підвищувалися важливі ростові показники соняшнику, зокрема діаметр кошика – у 2012 році на 60,3 % (з СКР), і на 33,9 % (з РБК), а в 2013 році – на 84,5-70 % відповідно.



а)

б)

Рис. 4.7. Вплив препаратів рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 (при передпосівному обробленні насіння) на розміри кошика соняшнику у виробничому експерименті 2014р. а) СКР – супернатант культуральної рідини (1:200); б) – контроль (вода)

Препарати рамноліпідних ПАР також сприяли збільшенню розмірів стебла соняшника: при використанні РБК його висота зростала на 20 % порівняно з контролем, а під впливом СКР – на 31 %. Діаметр стебла збільшувався на 46-48 %. Ці є важливим для розвитку рослин, оскільки сприяють підвищенню стійкості соняшника до вилягання у польових умовах.

При вирощуванні соняшнику на ділянках також встановлено, що оброблення насіння розчинами СКР і РБК сприяло покращенню інших важливих характеристик рослин: маси 1000 насінин відповідно на 28,7-39,8% (у 2012 році), і 32,3-50,5% (у 2013 році) (табл.4.5). Крім того суттєво покращувалися й якісні показники отриманого врожаю: вміст жиру у насінні зростав порівняно з контролем на 19,4-21 % (у 2012 році) та 25-34,3 % (у 2013 році), а вміст протеїну – на 9-10,2 % і 8-11,2 % відповідно (табл. 4.5).

Таблиця 4.4

**Дія рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на якість врожаю
соняшнику сорту Чумак у дрібноділянкових дослідах**

Варіанти оброблення насіння	Маса 1000 насінин, г	Вміст жиру у насінні, %	Вміст протеїну у насінні, %
2012 рік			
Контроль (вода)	59,8±2,9	35,1	13,1
РБК 0,01 г/дм ³	83,6±4,1	42,7	14,1
СКР 1:200	77,0±3,6	41,9	14,3
2013 рік			
Контроль	48,2±2,2	27,4	14,3
РБК 0,01 г/дм ³	63,8±3,2	34,3	15,5
СКР 1:200	72,5±4,4	36,8	15,9

Примітки: РБК – рамноліпідний біокомплекс; СКР – супернатант культуральної рідини; n = 50, показники вірогідно відмінні від контролю, P < 0,05.

Ефективність та практичні перспективи використання розроблених рамноліпідних ПАР при вирощуванні соняшника підтверджено результатами виробничого дослідження, проведеного на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України у 2014 р. (табл. 4.6).

Таблиця 4.5

**Вплив рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на показники
соняшника сорту Чумак та якість врожаю у виробничих умовах**

Варіанти оброблення насіння	Діаметр кошика, см	Маса 1000 насінин, г	Вміст жиру у насінні, %	Вміст протеїну у насінні, %
2014 рік				

Контроль (вода)	14,5±0,7	96,61±4,8	39,5	16,9
Вимпел-К 0,5 см ³ /кг	20,5±1,0	120,48±4,8	42,7	17,8
РБК 0,01 г/дм ³	19,9±1,2	146,42±7,1	41,5	16,6
СКР 1:200	21,0±1,0	158,37±7,0	45,8	18,3

Примітки: Вимпел – препарат фірми ООО «АГРО-БІО-ТЕХ»; РБК – рамноліпідний біокомплекс; СКР – супернатант культуральної рідини; n = 60, показники вірогідно відмінні від контролю, P < 0,05.

У виробничому експерименті ефект розроблених препаратів рамноліпідних ПАР при вирощуванні соняшнику досліджувався у порівнянні з стимулятором росту рослин Вимпел (ООО «АГРО-БІО-ТЕХ»), який використовується у сільському господарстві. Встановлено, що передпосівне оброблення насіння розчинами біоПАР (супернатанту культуральної рідини та рамноліпідного біокомплексу) сприяло збільшенню діаметру кошика рослин на 37,2-44,8 %, тоді як при обробленні Вимпелом – на 41,4 % відносно контролю. Маса 1000 насінин збільшувалась при використанні СКР на 64 % і РБК на 51,5 %, а Вимпелом – на 24,6 %, вміст жиру у насінні соняшника підвищувався на 16 % (з препаратом СКР) і на 8 % (з Вимпелом) та вмісту протеїну – на 8 % і 5 % відповідно (табл. 4.3).

За використання рамноліпідних поверхнево-активних речовин штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у польових умовах було досягнуто підвищення ростових показників соняшника (маси 1000 насінин та діаметру кошику), а також якості отриманого насіння (вмісту жиру та протеїну). Найбільшу ефективність виявлено для препарату супернатанту культуральної рідини.

Висновки до розділу 4

Отримані результати лабораторних, дрібноділянкових, виробничих експериментів з олійними рослинами засвідчили, що у сучасних технологіях

землеробства рамноліпідні ПАР можна використовувати як екологічно безпечні засоби для передпосівного оброблення насіння, що сприятиме стимулюванню росту, активуванню фізіологічних процесів, збільшенню врожайності рослин. Показано, що у польових умовах при вирощуванні соняшнику стимулювальна дія рамноліпідних біоПАР мала чітко виражений характер, крім того вони були ефективнішими у порівнянні із стимулятором росту Вимпел.

За результатами досліджень, що наведені в розділі, опубліковано 4 статті: з яких три у фахових виданнях, що входять до наукометричних баз даних [188, 189, 192].

РОЗДІЛ 5
ТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ РАМНОЛІПІДНИХ ПАР ШТАМУ
PSEUDOMONAS SP. PS-17

5.1 Технологічна та апаратурно-технологічна схеми одержання продуктів *Pseudomonas sp. PS-17*

Результати розроблення складу поживного середовища із застосуванням економічно вигідних джерел вуглецю стали підґрунтям для створення технології промислового виробництва ПАР штаму *Pseudomonas sp. PS-17*. Запропоновано 5 форм цільових продуктів: культуральна рідина після ферментолізу (1), супернатант КР (2) та рамноліпідний біокомплекс РБК (3), полігідроксиалкоаноат (4), фугат (5). Технологія ґрунтується на використанні ферментера з вихровою системою аерації, який може бути модернізований на основі стандартного біореактора з нижньопривідною мішалкою. Для виробництва рамноліпідних ПАР дана конструкція є особливо ефективною, враховуючи проблеми з надмірним піноутворення КР у процесі культивування штаму-продуценту. Вихрова система дозволяє суттєво збільшити коефіцієнт масопереносу за киснем порівняно з реакторами інших систем аерації, що забезпечує зменшення витрат кисню, тобто дає змогу знизити загальні енерговитрати.

Технологія виробництва цільових продуктів *Pseudomonas sp. PS-17* складається із допоміжних та основних робіт. Допоміжні роботи включають: санітарну підготовку виробництва (підготовка приміщень, обладнання, мийних, дезінфікувальних розчинів), підготовку стерильного технологічного повітря й поживного середовища. Основний технологічний процес (ТП) включає лабораторну та виробничу стадії отримання посівного матеріалу (ПМ), товарну ферментацію та стадії виділення цільових продуктів.

Технологічну схему процесу отримання продуктів *Pseudomonas* sp. PS-17, апаратурно-технологічна схема подано на рис. 5.1; 5. 2.

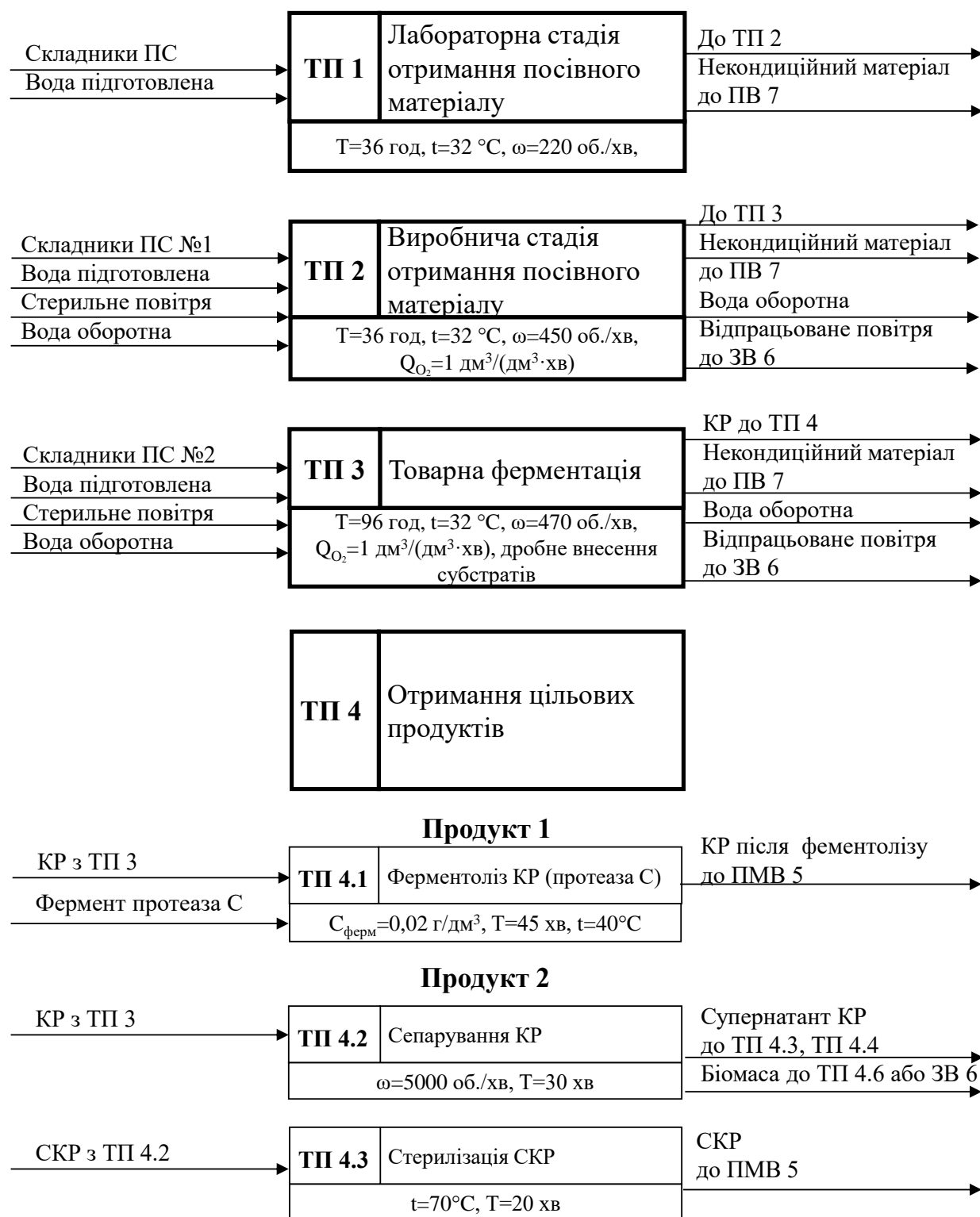


Рис. 5.1 Технологічна схема одержання ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17

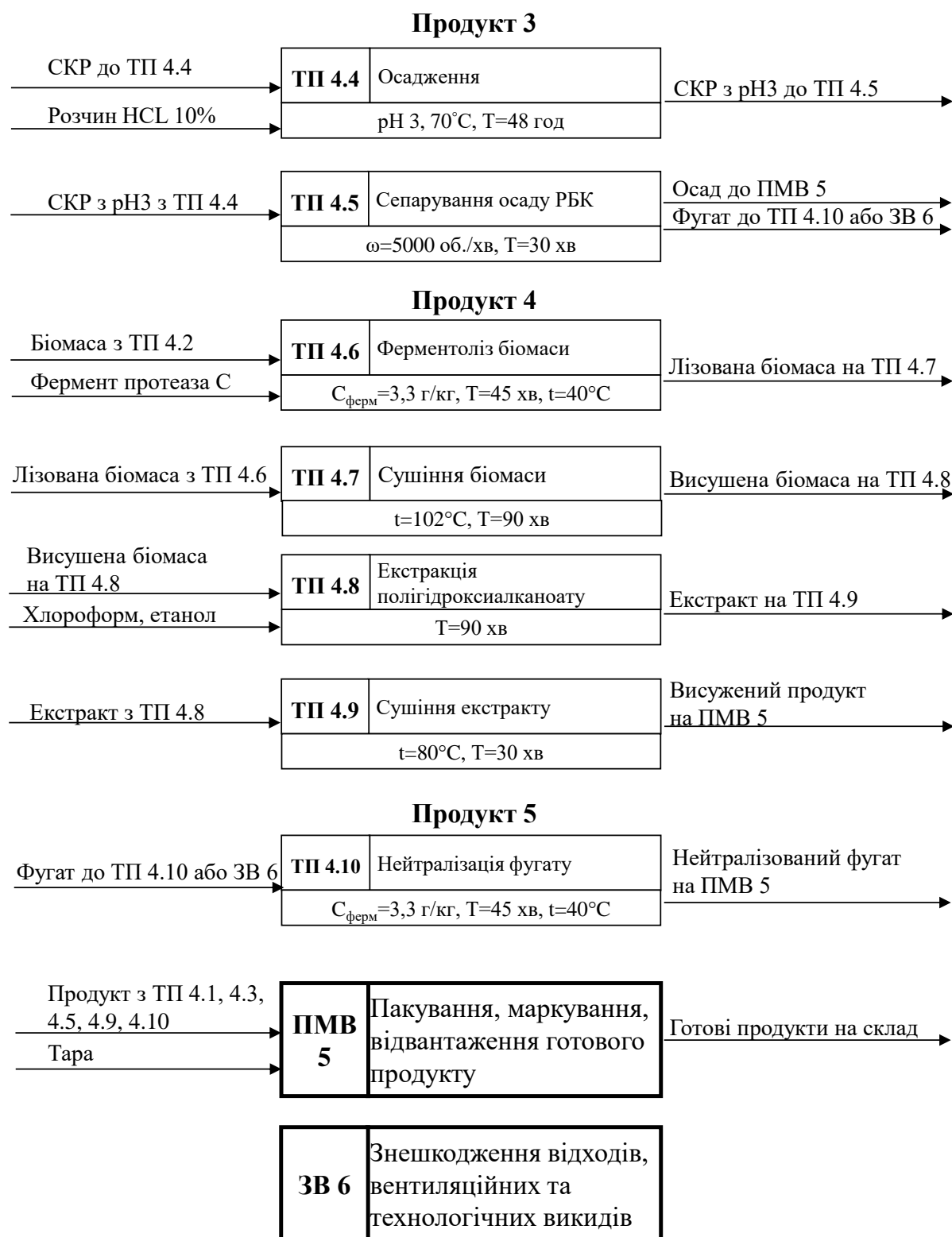
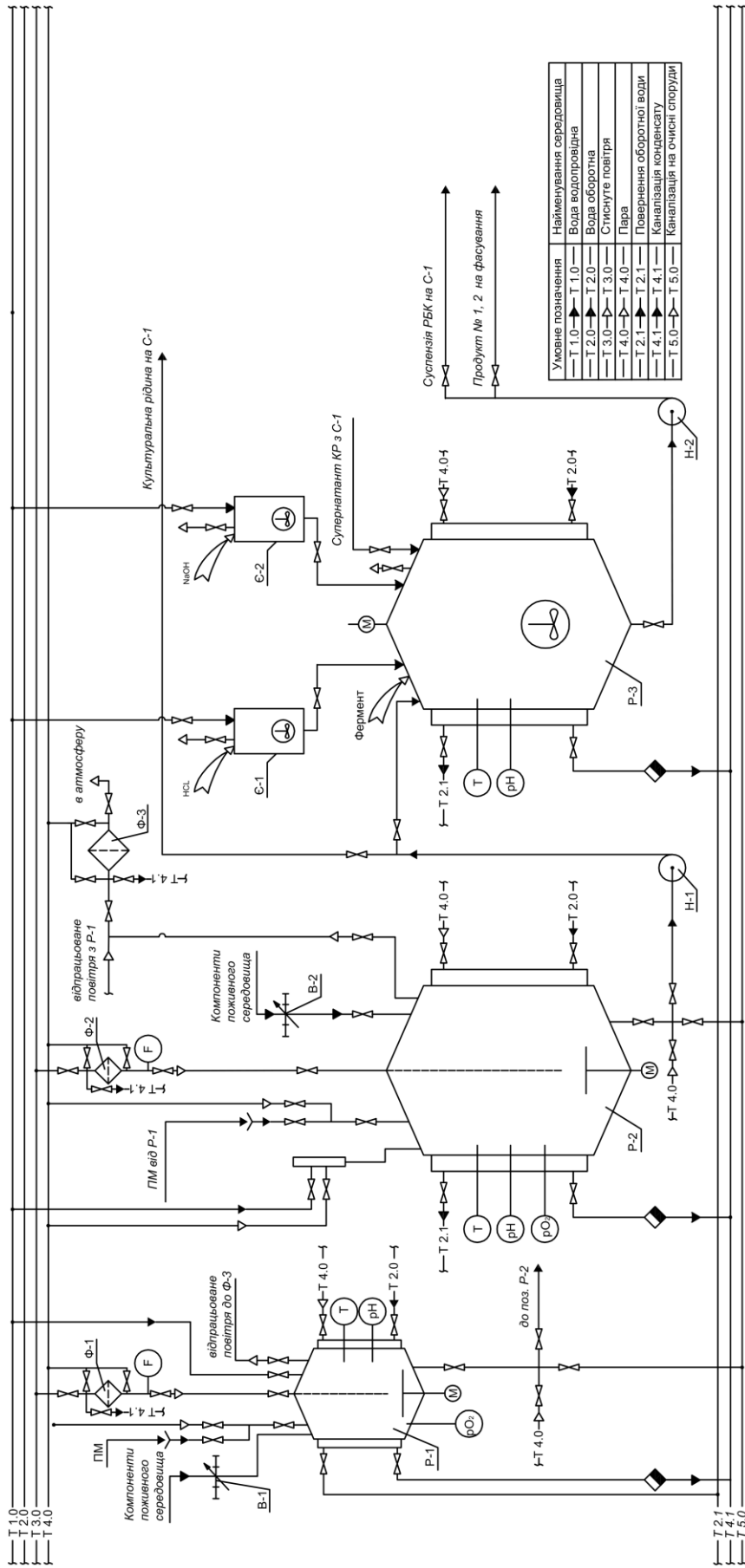


Рис. 5.1 (продовження) Технологічна схема одержання ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17



Ф-1,2 – фільтри для стерилізації повітря; Ф-3 – фільтр відпрацьованого повітря; В-1,2 – ваги; Р-1 – інокулятор; Р-2 – виробничий ферментер; Н-1,2 – відцентрові насоси; Р-3 – реактор для прогрівання КР та супернатанту КР; С-1 – сепаратор; С-1 – смінь для приготування розчинів; З-1,2 – збірники; Р-4 – реактор для екстракції; Ф-4 – друк-фільтр; Рисунок 5.2 – Апаратурно-технологічна схема одержання продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17

ТП 1 Лабораторна стадія вирощування посівного матеріалу

ТП 1.1 Підтримання музейної культури

Музейну культуру *Pseudomonas* sp. PS-17 зберігають у пробірках з агаризованим поживним середовищем під мінеральним маслом. Для підтримання активності культуру пересівають у пробірки зі свіжим середовищем 1 раз на рік. Всі роботи з музейною культурою проводяться в строго асептичних умовах.

ТП 1.2 Підготування середовища для лабораторної стадії приготування поживного середовища

Для вирощування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у колбах на ротаційній качалці використовують ПС № 1 (розділ 4.1) (г/дм³): гліцерин – 30; натрій цитрат – 5,0; NaNO₃ – 4,0; K₂HPO₄×3H₂O – 2,0; KH₂PO₄ – 1,2; MgSO₄×7H₂O – 0,5; дріжджовий екстракт – 1.

Для приготування ПС колбу заповнюють водопровідною водою визначеного об'єму, вносять солі при перемішуванні до повного розчинення і додають відповідну кількість гліцерину. Готове поживне середовище розливають у колби і стерилізують в автоклаві за 132°C впродовж 20 хв.

ТП 1.3 Культивування у колбах

Для вирощування рідкого посівного матеріалу першої генерації у колбах відбирають по 200 см³ готового поживного середовища (див. ТП 1.2) і розливають у колби об'ємом 1 дм³.

У пробірку з робочою культурою *Pseudomonas* sp. PS-17, вносять 5 см³ стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колбу з рідким поживним середовищем для ПМ. Колби поміщають на лабораторну качалку (220 об./хв) на 36 год. за температури 32±2 °C. Одержаний посівний матеріал перевіряють на відсутність сторонньої мікрофлори шляхом

розсіву на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем та мікроскопуванням.

ТП 1.4 *Культивування посівного матеріалу в лабораторній ємності*

Для вирощування рідкого посівного матеріалу другої генерації у колбах відбирають по 200 см³ готового поживного середовища (див. ТП 1.2) і розливають у колби об'ємом 1 дм³.

З посівного матеріалу, отриманого з ТП 1, культуральну рідину переносять в колби із стерильним поживним середовищем. Колби поміщають на лабораторну качалку (220 об./хв) на 36 год. за температури 32±2 °С. Одержаний посівний матеріал перевіряють на відсутність сторонньої мікрофлори шляхом розсіву на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем та мікроскопуванням. Титр клітин має бути не менше 2×10⁸ КУО/см³. Перевірений ПМ з колб використовують для засіву виробничого інокулятора (P-1).

ТП 2 Виробнича стадія вирощування посівного матеріалу

ТП 2.1 *Приготування і стерилізація середовища для виробничої стадії вирощування інокуляту*

Виробничий інокулятор (P-1) має об'єм 50 дм³, він обладнаний термостатуючою оболонкою та системою вихрової аерації.

Поживне середовище для культивування *Pseudomonas* sp. PS-17 в інокуляторі має такий же склад, як у колбах на качалці. У стерилізований й охолоджений інокулятор (P-1) заливають 25 дм³ водопровідної води (з урахуванням конденсату і 5 % ПМ з колб, загальний об'єм становить 30 дм³) і при працюючій мішалці засипають солі до повного їх розчинення, додають дріжджовий екстракт та гліцерин, доводять рН до 7,0 10%-ним розчином HCl і стерилізують гострою парою за температури 120 °С впродовж 30 хв.

ТП 2.2 *Одержання посівного матеріалу в інокуляторі P-1*

Посівний матеріал з колб в стерильних умовах переносять в реактор (P-1) зі стерильним поживним середовищем. Культивування проводять за швидкості

перемішувального пристрою (450 об./хв) і подачі повітря 30 дм³/хв. Швидкість перемішування і витрати повітря регулюють за показниками концентрації розчиненого кисню рО₂. Кожні 4 год процесу ферментації визначають оптичну густину середовища. Тривалість культивування 36 год.

Отриманий ПМ (титр клітин не менше 2×10^8 КУО/см³), контролюють на присутність сторонньої мікрофлори і передають ПМ на засів ферментера (Р-2). Об'єм посівного матеріалу з інокулятора – 30 дм³.

ТП 3 Товарна ферментація

ТП 3.1 Підготування поживного середовища для товарної ферментації. Для ферментації у виробничому біореакторі (Р-2) готують оптимізоване поживне середовище №2 (див. розділ 3.2) наступного складу г/дм³: фуз олійний – 15; гліцерин – 30; натрій цитрат – 4,0; NaNO₃ – 4,0; K₂HPO₄×3H₂O – 2,0; KH₂PO₄ – 1,2; MgSO₄×7H₂O – 0,5, дріжджовий екстракт -1.

Поживне середовище для культивування готують безпосередньо у ферментері (Р-2), загальний об'єм – 1 м³. У стерильний апарат заливають 500 дм³ водопровідної води. Враховуючи внесення 30 дм³ ПМ з інокулятора (Р-1), внесення гліцерину та утворення конденсату під час стерилізації гострим паром, загальний об'єм ПС становить 600 дм³. При працюючій мішалці засипають солі до повного розчинення, додають дріжджовий екстракт та гліцерин, стерилізують гострою парою за 120°С впродовж 30 хв, охолоджують до 32±2 °С і відбирають пробу на аналіз (стерильність середовища). Як додаткове джерело вуглецю фуз олійний додають за концентрації 15 г/дм³ до ПС. Фуз олійний стерилізується в окремій ємності термостатуючою сорочкою і перемішуючим пристроєм.

ТП 3.2 Культивування продуцента у ферментері

Виробниче культивування здійснюється у ферментері (Р-2) об'ємом 1 м³ з робочим об'ємом 600 дм³ з нижньопривідою турбінною мішалкою, термостатуючою сорочкою та системою вихрової аерації.

Засів ферментера (Р-2) проводять посівним матеріалом, отриманим в інокуляторі (Р-1). Кількість ПМ – 5% від об'єму середовища. Засів проводять при перекачуванні ПМ з інокулятора (Р-1) за допомогою стисненого стерильного повітря. Засівну лінію попередньо стерилізують гострою парою протягом 20 хв (120 °С).

Перемішувачий пристрій встановлюють на 450 об./хв, подачу повітря – 600 дм³/хв. Через 48 год від початку процесу додають стерильно фуз олійний. Впродовж ферментації кожні 5 год проводять мікробіологічний контроль, визначають оптичну густину ПС та вміст продукту (РЛ). Тривалість культивування складає 96 год.

ТП 4 Отримання цільових продуктів *Pseudomonas* sp. PS-17

Продукт № 1 Постферментаційна культуральна рідина КР

ТП 4.1 Ферментоліз культуральної рідини

Культуральну рідину з ферментера (Р-2) подають в реактор (Р-3), доводять рН до 10 і додають розчин протеази С, нагрівають глухою парою до температури 40°С і перемішують впродовж 20 хв. Оброблена культуральна рідина охолоджується, до неї додається консервант (Salimix (MCI), Bronopol або Dowicil 75 (0,3 г/ дм³) і продукт подається на фасування.

Продукт у вигляді постферментаційної культуральної рідини характеризується такими показниками:

- кількість РЛ – 13,9±0,4 г/дм³;
- поверхневий натяг – 28,7±0,6 мН/м;
- індекс емульгування – 83±2,5 %.

Продукт № 2 Супернатант культуральної рідини СКР

ТП 4.2 Сепарування культуральної рідини

Культуральну рідину з ферментера Р-2 насосом Н-1 подають у тарілчастий сепаратор С-1. Волога біомаса періодично вивантажується автоматичним пристроєм у реактор Р-4, з якого його подають на сушку.

ТП 4.3 Термічне оброблення супернатанту культуральної рідини

Супернатант культуральної рідини надходить у збірник Р-3, де його нагрівають глухою парою до температури 70 °С і витримують впродовж 20 хв при перемішуванні. До отриманого СКР додається консервант (Salimix (MCI), Bronopol або Dowicil 75 (0,3 г/ дм³) і продукт подається на фасування.

Продукт у вигляді супернатанту культуральної рідини характеризується такими показниками:

- вміст РБК– 15,8±0,47 г/дм³;
- поверхневий натяг – 29,0±0,8 мН/м;
- індекс емульгування – 80±3 %.

Продукт № 3 Рамноліпідний біокомплекс РБК

ТП 4.2 Сепарування культуральної рідини

Культуральну рідину з ферментера Р-2 насосом Н-1 подають у тарілчастий сепаратор С-1. Супернатант культуральної рідини надходить у збірник Р-3. Волога біомаса періодично вивантажується автоматичним пристроєм у збірник З-1, з якого його подають на сушку.

ТП 4.4 Кислотне осадження РБК

Супернатант культуральної рідини у реакторі Р-3 доводять до рН 3,0 10% розчином НС1, який подають з ємності Є-1, при перемішуванні і нагріванні до 70 °С.

ТП 4.5 Центрифугування осаду РБК

Одержану суспензію РБК з реактора Р-3 подають насосом Н-2 у сепаратор С-1. Вологий осад РБК вивантажується у збірник З-1, з якого він

подається на фасування. Фугат подається в ємність Є-2.

Продукт № 4 Полігідроксиалканоат

ТП 4.6 Ферментоліз біомаси

Біомасу подають у реактор Р-4, де його обробляють ферментом (протеазою). При постійному перемішуванні і нагріванні до 45°C витримують 30 хв.

ТП 4.7 Сушіння біомаси

Зруйновану біомасу з реактора Р-4 подають на сушарку ВСШ-1, де сушать при 80 °С впродовж 2 год.

ТП 4.8 Екстракція полігідроксиалканоату.

Висушену біомасу з сушарки ВСШ-1 передають у реактор Р-6, де її обробляють хлороформом та перемішують впродовж 3 год для ефективного протікання процесу екстракції. Після екстракції одержану суспензію передавлюють стиснутим повітрям через фільтр Ф-4. Фільтрат з Ф-4 переносять у реактор Р-7, де його промивають спиртом.

ТП 4.9 Сушіння екстракту

Отриманий органічний екстракт, що містить полігідроксиалканоат, переносять у вакуум-сушильну шафу ВСШ-1. Розчинник після відгонки подається на регенерацію, а висушену суміш ліпідів з ВСШ-1 подають на фасування.

Продукт № 5 Фугат

ТП 4.10 Нейтралізація фугату

В ємність Є-2 до отриманого фугату додають 10%-ний розчин NaOH з ємності Є-3 і доводять до рН 7. До отриманого продукту додається консервант (Salimix (МСІ), Bronopol або Dowicil 75 (0,3 г/ дм³)) і він подається на фасування.

ПМВ 5 Пакування, маркування, відвантаження продукту

Маркування виконується державною мовою і мовою, що обумовлена в контракті на поставку. На кожен пакувальну одиницю наносять маркування або етикетку з даними: назва підприємства-виробника, адреса, товарний знак, номер партії, маса нетто, дата виготовлення, термін придатності до використання. Продукт № 1 (культуральна рідина після ферментолізу), № 2 (супернатант КР) та № 4 (фугат) пакуються у поліетиленові каністри об'ємом 10 дм³. Термін зберігання – за температури не вище 5 °С – 6 місяців при додаванні консервантів – Salimix (MCI), Bronopol або Dowicil 75 (0,3 г/ дм³). Продукт № 3 (РБК) пакується у герметичні поліетиленові пакети масою 100 г. Термін зберігання (за температури не вище 10 °С) – 1 рік.

ЗВ 6 Знешкодження відходів

Останньою стадією технологічного процесу є регенерація і знешкодження відходів, а саме некондиційного посівного матеріалу, вентиляційного та технологічного повітря при їх викидах в атмосферу, партій бракованого препарату, залишків пакувальних матеріалів тощо. Дана стадія забезпечує екологічну чистоту виробництва даних продуктів.

Схема очистки стічних вод включає первинну і вторинну очистку. Первинна включає механічне відділення забруднень (вловлювання крупних домішок), а вторинна – очистка стічних вод в системі очисних споруд.

5.2 Розрахунок економічної ефективності технології отримання ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17

Економічну доцільність технології нового продукту оцінюють за її собівартістю, яка є грошовим виразом витрат підприємства на виробництво і реалізацію цієї продукції.

У промисловості найчастіше застосовується калькуляційні статті витрат:

- 1) сировина і матеріали;

- 2) паливо та енергія на технологічні цілі;
- 3) основна заробітна плата технологічних робітників;
- 4) додаткова заробітна плата технологічних робітників;
- 5) відрахування на соціальні заходи;
- 6) витрати на утримання і експлуатацію устаткування;
- 7) загальновиробничі витрати;
- 8) втрати внаслідок технічно неминучого браку;
- 9) інші виробничі витрати;
- 10) адміністративні витрати;
- 11) витрати на підготовку та освоєння нового виробництва;
- 12) позавиробничі витрати на збут продукції.

Розрахунок економічної ефективності здійснено по статтях витрат, що оптимізувалися у роботі: витрати на сировину та матеріали і витрати на електроенергію. Для визначення їх впливу на загальний економічний ефект технології, проаналізовано економічні показники для одержання 1 кг ПАР у різних умовах:

- 1) у колбах на оптимізованому поживному середовищі №2;
- 2) у ферментері з вихровою системою аерації.

Витрати на сировину і матеріали розраховуються як сума добутоків норм витрачання різних видів сировини й матеріалів та вартості одиниці відповідних видів сировини й матеріалів:

$$B_m = \sum P_i \cdot C_i \quad (5.1)$$

де P_i – витрата i -того виду матеріальних ресурсів, кг;

C_i – ціна i -того виду матеріальних ресурсів, грн./кг.

В якості сировини - компоненти ПС для культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 (ціни з каталогу реактивів ТОВ “СФЕРА СІМ” за 2016 рік). Вартість компонентів для отримання 1 м³ ПС – у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

**Вартість сировини необхідної для одержання 1 м³ поживного середовища
для культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 до оптимізації**

№	Компонент поживного середовища	Кількість сировини, витрачена на 1 м ³ ПС, кг	Вартість сировини, грн./кг	Вартість сировини, грн./м ³ ПС	Вартість реактиву на 1 кг ПАР, грн./кг
1	C ₃ H ₈ O ₃	50,0	21,9	1095	91,2
3	NaNO ₃	4,0	48,00	192	15,9
5	KH ₂ PO ₄	1,2	32,40	38,8	3,25
6	K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	2,0	71,40	142,8	11,9
7	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	5,70	2,85	0,24
8	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ×2H ₂ O	5,0	28,80	144	11,9
9	Дріждж. екстракт	1,0	850,0	850	71,0
Разом				2465,45	205,4

Таблиця 5.2

**Вартість сировини необхідної для одержання 1 м³ поживного середовища
для культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 після оптимізації**

№	Компонент поживного середовища	Кількість сировини, витрачена на 1 м ³ ПС, кг	Вартість сировини, грн./кг	Вартість сировини, грн./м ³ ПС	Вартість реактиву на 1 кг ПАР, грн./кг
1	C ₃ H ₈ O ₃	30,0	21,9	657,0	41,68
2	Фуз олійний	15	5	75	4,76
3	NaNO ₃	4,0	48,00	192	12,2
5	KH ₂ PO ₄	1,2	32,40	38,8	2,46
6	K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	2,0	71,40	142,8	9,0
7	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	5,70	2,85	0,20
8	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ×2H ₂ O	5,0	28,80	144	9,2
9	Дріждж. екстракт	1,0	850,0	850	54,0
Разом				2102,45	133,5

Отже, в результаті оптимізації умов культивування вдалося зменшити витрати на реактиви для отримання 1 кг ПАР на 54%.

Витрати на електроенергію визначаються за формулою:

$$E_c = \sum W_i \cdot \Phi_{ci} \cdot T_{pi}, \quad (5.2)$$

де W_i – потужність електроспоживачів, кВт;

Φ_{ci} – фонд роботи електричного обладнання, год;

T_{pi} – тариф, грн/кВт·год. (1,68 грн./кВт·год).

При культивуванні штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 в лабораторних умовах на колбах використовується наступне обладнання: ротаційна качалка (0,9 кВт), термостат (2 кВт). За один цикл роботи (120 год.) можна отримати 4,5 дм³ КР, при цьому витрачається 348 кВт·год. електроенергії.

При культивуванні штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері використовується наступне електрообладнання (табл. А.2):

Таблиця 5.3

Дані потужності частин ферментеру для біосинтезу ПАР *Pseudomonas* sp.

PS-17

№	Тип обладнання	Потужність, кВт
1	Мотор перемішувального пристрою	3,0
2	Компресор повітря	3,0
3	Термостат	3,0
4	Парогенератор	10,0

3. Розрахунок фонду заробітної плати

Для отримання ПАР необхідний один молодший науковий співробітник та один інженер. Денна ставка заробітної плати молодшого наукового співробітника – 122,7, інженера – 85,4 грн.

Термін проведення дослідів для отримання 1 кг ПАР до оптимізації – 695 днів.

Фонд заробітної плати становить: $\Phi_{\text{заг}} = (122,7+85,4) \times 695 = 144629,5$ грн.

Термін проведення дослідів для отримання 1 кг ПАР після оптимізації – 530 днів. Фонд заробітної плати становить: $\Phi_{\text{заг}} = (122,7+85,4) \times 424,6 = 88359,3$ грн.

Вартості поживного середовища та електроенергії для 1 циклу ферментації *Pseudomonas* sp. PS-17 і на 1 кг ПАР (РБК) залежно від способу культивування подані у табл. 5.3 із урахуванням виходу ПАР, тривалості ферментації, коефіцієнту завантаження ферментера 0,6 при загальному об'ємі 1 м³.

Таблиця 5.4

Вартість витрат на одержання 1 кг РЛ штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 за різних умов культивування

Умови культивування		У ферментері до оптимізації	У ферментері після оптимізації
Вихід РЛ, кг/м ³		12,0	15,7
Вихід РЛ з одного циклу, кг		7,20	9,42
Час ферментації, год		120	96
Вартість ПС, грн	за 1 цикл	1479,27	1261,47
	на 1 т РЛ	205400	133500
Вартість електроенергії, грн	за 1 цикл	1982,4	1619,5
	на 1 т РЛ	275333,3	171921,4
Заробітна плата, грн		144629,5	88359,3
Собівартість 1 т РЛ, грн/т		625362,8	393780,7

Отже завдяки раціоналізації процесу синтезу рамноліпідів штамом ... вдалося знизити собівартість виробництва на 37 % прикладі виробництва препарату на 1 м³ ферментері.

Розрахунок економічної ефективності проводили по перших трьох статтях витрат (приблизно 30 % собівартості продукції), повна собівартість 1 кг ПАР після оптимізації: $393780,7/0,3 = 1312602,3$ грн./кг. Якщо рентабельність виробництва буде 40 %, відпускна ціна 1 кг ПАР –

$1312602,3 \cdot 1,4 = 1837643,2$ грн/т або 65630 \$/т. Ринкова ціна на подібні закордонні продукти становить 200000-300000 \$/т, що свідчить про економічну ефективність та ринкову конкурентоспроможність технології.

Висновки до розділу 5

На основі отриманих результатів розроблено технологію виробництва поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 із застосуванням економічно вигідних субстратів, що дозволило знизити собівартість виробництва на 37 % (у ферментері об'ємом 1 м³). Важливою відмінністю даної технології є режим дробної подачі джерел вуглецю у систему: спочатку гліцерину, який є водорозчинним і легше утилізується, а далі – фузу олійного. Така технологія дозволяє одержати 5 форм продуктів для практичного застосування у рослинництві.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Створення ефективних препаратів для сучасного рослинництва, безпечних для людини й довкілля, є одним з пріоритетних завдань біотехнології. Враховуючи багатовекторні фізико-хімічні та біологічні властивості біоПАР (поверхнева, емульгувальна, змочувальна активність, регулювання проникності клітинних мембран), їх використання у рослинництві є новим перспективним напрямком. Важливими екологічними і технологічними перевагами біогенних ПАР перед синтетичними є біодеградабельність, низька токсичність, ефективність дії за низьких концентрацій, стабільність при різних температурах, рН, вмісті солей у середовищі. Метою роботи було як розроблення технології отримання ефективних, економічно вигідних препаратів рамноліпідних ПАР, так і технологій їх застосування у вирощуванні олійних рослин.

Успішне практичне впровадження біоПАР у рослинництво є реальним тільки за наявності раціональних технологій їх виробництва. Незважаючи на значний потенціал й переваги біогенних ПАР, в даний час їх застосування обмежується цілою низкою технологічних й економічних показників, а саме малими виходами цільових продуктів, їх високою собівартістю [165]. Серед чинників, що впливають на ефективність мікробного синтезу і собівартість цільових продуктів, важливу роль має вибір раціональних джерел вуглецю та їх вмісту у складі поживного середовища, що може становити до 10-30% вартості всього виробництва. Тому серед завдань оптимізації виробництва важливе місце займає пошук доступної, вигідної сировини [166-168]. До переліку таких субстратів входять відходи нафтової, спиртової, аграрної, харчової промисловості, дешеві рослинні олії, тощо. Зокрема, використовують ріпакову, соєву, соняшникову, кокосову та інші олії [169-171], а також і відпрацьовані відходи рафінації олій [45]. У зв'язку з цим

досліджено ефективність культивування *Pseudomonas* sp. PS-17 на економічно вигідних субстратах (відходах виробництв). Показано доцільність використання фосфатидного концентрату (фузу олійного) й пересмаженої олії як доступних джерел вуглецю, а також їх комбінацій з гліцерином [172]. При культивуванні штаму на середовищі з фузом олійним (30-40 г/дм³) кількість отриманих рамноліпідів на 16,0-39,6 % більша, ніж на гліцерині, на пересмаженій соняшниковій олії вихід ПАР дещо нижчим. Новизною роботи є також застосування роботи є також встановлена ефективність режиму дозованого додавання джерел вуглецю (гідрофільних і гідрофобних) для синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17. Як додаткові субстрати до гліцерину – початкового джерела вуглецю (30 г/дм³) через 72 год культивування у середовище вносили фуз олійний або пересмажену олію (15 г/л). Це дало змогу збільшити кількість продуктів: на середовищі із гліцерином і фузом – на 24 %, а на гліцерині з олією – на 18 % (порівняно із гліцерином). Також удосконалено способи підготовки інокуляту і його кількість, оскільки з літератури відомо, що ці параметри теж відіграють значну роль у процесах біосинтезу мікробних ПАР [173].

Отримані дані мають практичне значення, оскільки кількість і тип сировини може значно впливати на собівартість продукції [42]. Впровадження цих економічно вигідних джерел вуглецю створить можливість зменшити вартість рамноліпідних ПАР та успішно застосовувати ці продукти як альтернативні екологічно безпечні агрозасоби для рослинництва. Одержані результати узгоджуються з літературними даними про доцільність використання відходів виробництва й перероблення рослинних олій, а саме кокосової і кукурудзяної [169, 174], соняшnikової, ріпакової та соєвої [170,171], а також відходи очищення олій [45] і відпрацьовані олії (відходи смаження із закладів харчування тощо).

Відомо, що виробництво біоПАР найбільше лімітується високою вартістю процесів їх виділення та очищення, а тому актуальним завданням

роботи була оптимізація процесів отримання економічно і технологічно доцільних продуктів. Розроблено 5 форм цільових продуктів *Pseudomonas* sp. PS-17 з використанням цінних метаболітів: культуральної рідини після ферментолізу, супернатанту культуральної рідини, рамноліпідного біокомплексу, біополімеру – полігідроксиалканоату (ПГА) з біомаси, фугату супернатанту СКР після виділення з нього РБК. Кінцевим постферментаційним продуктом *Pseudomonas* sp. PS-17 є культуральна рідина – природний розчин ПАР, яку можна використовувати як цільовий препарат. Її собівартість достатньо низька: процес включає культивування штаму з наступним ферментолізом (з протеазою С) або термічним обробленням. Наступним раціональним продуктом є супернатант культуральної рідини, який отримано після відділення клітин. Оскільки культуральна рідина, СКР є біодеградабельними продуктами, важливим завданням було збільшення терміну його придатності. Для цього здійснено підбір консервантів за наступними вимогами: 1) ефективність за низьких концентрацій; 2) відсутність впливу на функціональні властивості СКР; 3) економічна вигідність; 4) низька токсичність. Проведено дослідження дії низки консервантів, які використовуються у промисловості: Dowicil 75, Salimix (MCI), Germall, Bronopol, Тимол, парабени на зберігання СКР, його склад, поверхневу активність. Оптимальними консервантами визнано Salimix (MCI), Bronopol та Dowicil 75 за концентрації 0,3 г/л. Відомо, що впровадження у виробництво та практичне застосування біоПАР значною мірою обмежено високою вартістю постферментаційних процесів, тому актуальним завданням є удосконалення процесів виділення ПАР, отримання різних товарних форм цільових продуктів. У зв'язку з цим було удосконалено способи виділення рамноліпідних ПАР із супернатанту культуральної рідини *Pseudomonas* sp. PS-17, а саме: 1) осадження рамноліпідного біокомплексу, який є ефективним і перспективним продуктом; 2) екстракція рамноліпідів різними розчинниками. Для

підвищення виходу РБК досліджено процес його виділення із СКР з керованими змінами температурного режиму, а саме: додавання до СКР розчину HCl при нагріванні та подальшому охолодженні системи. При цьому випробувано різні температури нагрівання і режим охолодження. В результаті експерименту визначено температурні параметри процесу осадження РБК та його тривалість для отримання максимальної кількості продукту. Досліджено, що найкращими умовами є нагрівання системи до +70°C (після додавання розчину HCl) впродовж 20 хв з подальшим охолодженням до +20°C. Витримуючи такі умови, одержаний осад містить 88-90 % рамноліпідів. Розроблений підхід дає змогу збільшити кількість продукту на 32,7 % (до 16,39 г/дм³).

Вперше досліджено процес екстракції із супернатанту культуральної рідини рамноліпідів – поверхнево-активних метаболітів, що визначають функціональну активність цільових продуктів *Pseudomonas* sp. PS-17, здійснено підбір оптимальних екстрагентів. Процес екстрагування проводили в 16 розчинниках різної природи. Математичну обробку експериментальних даних по екстракції рамноліпідів розчинниками різної природи проводили за допомогою багатопараметрових рівнянь, виходячи з принципу лінійності вільних енергій з використанням модифікованого рівняння Коппеля-Пальма [139,140]. Раніше такий підхід було застосовано для оптимізації екстракції трегалозоліпідних ПАР бактерій роду *Rhodococcus* [175]. Такий підхід дозволив кількісно пов'язати розчинність рамноліпідів із властивостями екстрагентів. Показано, що кращими екстрагентами для рамноліпідів є вищі спирти, що пов'язано з електрофільною сольватацією естерної групи рамноліпідів за допомогою водневого зв'язку, а також паралельним розташуванням алкільних ланцюгів спиртів та залишку β-оксидеканової кислоти в молекулах рамноліпідів [176].

Отже, розроблено оптимальні методи отримання цільових продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 і запропоновано їх ефективні форми, які є

перспективними та економічно доцільними для практичного застосування, зокрема у сучасному сільському господарстві.

Для характеристики і оцінки одержаних продуктів досліджено їх фізико-хімічні й біологічні властивості. Так, визначено, що препарати СКР та РБК штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, отримані за розробленою технологією на відходах виробництва, мають високу емульгувальну і поверхневу активність, покращують змочування поверхонь. Вони не поступаються, а часом й кращі за продукти, одержані раніше на поживних середовищах з гліцерином, як моноsubstrатом [177]. При застосуванні рамноліпінних ПАР у сільському господарстві велике значення має інформація про їх дію на клітини живих організмів. У зв'язку з цим, вивчено вплив отриманих рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на проникність клітинних мембран тестових мікроорганізмів, зокрема бактерій-фітопатогенів *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis*, які спричиняють хвороби важливих сільськогосподарських рослин. Встановлено, що рамноліпідний біокомплекс за концентрацій 0,05 - 0,5 г/дм³ сприяв підвищенню проникності клітинних мембран досліджених мікроорганізмів-фітопатогенів. Раніше підвищення проникності клітинних мембран під дією рамноліпідів, отриманих на гліцерині, було показано щодо інших тестових мікроорганізмів [178,179]. Одним з можливих механізмів впливу ПАР на мікроорганізми може бути їх взаємодія з мембранними фосfolіпідами, що виявлено за даними мас-спектроскопії [180]. Формування комплексів РЛ з мембранними фосfolіпідами розглядається як можливий молекулярний механізм мембранотропної (у тому числі й антимікробної) дії біоПАР на мікробні клітини. Здатність рамноліпідних ПАР до регулювання проникності мембран мікроорганізмів є важливим показником для їх використання при створенні ефективних композицій для сільського господарства, а саме для підсилення дії біоцидів та інших препаратів.

Важливим результатом роботи, який необхідно враховувати для обґрунтованого застосування рамноліпідних ПАР у рослинництві, є встановлення їх впливу на проникність клітинних мембран рослин. Показано, що передпосівне оброблення насіння соняшнику розчинами РБК і СКР, отриманих на економічно вигідних субстратах, сприяє збільшенню поглинання проростками соняшнику іонів K^+ , Na^+ , Ca^{2+} із модельного поживного розчину на 30-61%. Одержані результати вказують на потенційну здатність рамноліпідних ПАР підсилювати дію агропрепаратів (регуляторів росту, добрив, засобів захисту рослин) у відповідних композиціях.

Однією з важливих проблем екологічно безпечного сільського господарства є створення ефективних регуляторів росту рослин та підвищення активності існуючих засобів. В даний час для збільшення ефективності різноманітних агропрепаратів широко застосовуються синтетичні поверхнево-активні речовини, проте біогенні ПАР, завдяки їх перевагам, безумовно, значно перспективніші для сучасного сільського господарства. Нами встановлено, що рамноліпідні ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 при сумісному використанні з фітогормонами (ауксини, цитокініни, гіберелінова кислота) сприяють підвищенню їх активності [181]. Показано, що у композиціях РБК підвищується активність: ауксинів (індоліл-3-оцтова кислота) – на 28%, (індоліл-3-масляна кислота) – на 63%; гіберелінової кислоти – на 30%, цитокінінів (6- бензиламінопурину) – на 30% порівняно з варіантами без біоПАР. Подібний стимулюючий вплив на фітогормони встановлено також і для СКР, крім того цей препарат сам виявляв фітогормоноподібну дію, що визначено у біотестах на ауксини і гібереліни. Отримані результати вказують на можливість застосування рамноліпідних ПАР (у формах СКР та РБК) у композиціях з фітогормонами, що дозволить зменшити їх діючі концентрації більше, ніж у 2 рази. Це свідчить про перспективи використання отриманих біоПАР для розроблення ефективних регуляторів росту рослин на основі фітогормонів.

Розроблення ефективних і безпечних біоцидних препаратів для захисту сільськогосподарських рослин від фітопатогенів є актуальним завданням сучасної біотехнології. Стратегії боротьби з різними хворобами потребують нових препаратів для подолання резистентності мікроорганізмів до існуючих засобів. Доцільність використання рамноліпідних ПАР у комплексних засобах для рослинництва пов'язані з їх фізико-хімічними властивостями та низькою токсичністю [182]. Встановлено, що розроблені ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 сприяють підвищенню активності антимікробних речовин, зокрема синтетичного аналогу фітонцидів часнику – етилтіосульфонату, який має цінні біологічні властивості [183]. Проте ЕТС є малорозчинним у воді і це ускладнює його використання. У попередніх дослідженнях визначено підвищення біоцидної активності етил- і метилтіосульфонатів під дією рамноліпідів щодо інших тестових мікроорганізмів (*Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis*, *Rhizopus nigricans* [178, 184]. Отримані нами результати показали, що композиції СКР з етилтіосульфонатом є активнішими, ніж сам ЕТС, щодо фітопатогенів *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* *Erwinia corotovora* про що свідчать нижчі значення мінімальних інгібувальних концентрацій (на 50-80 %) та мінімальних біоцидних концентрацій – на 40-42,8%. Встановлено, що у композиціях з РБК також можна суттєво зменшити МК етилтіосульфонату – на 50 % та його МК – на 28,6-66,8 %. Такий ефект можна пояснити як впливом рамноліпідних ПАР на проникність клітинних мембран мікроорганізмів-фітопатогенів, так і їх здатністю до солюбілізації малорозчинних у воді речовин [185].

Створення стабільних композицій, в яких рамноліпідні ПАР будуть виконувати функції солюбілізаторів різних біологічно активних речовин, регуляторів їх транспорту у рослинні та мікробні клітини матиме велике значення, оскільки дасть змогу зменшити робочі дози хімічних агрозасобів і відповідно знизити екологічне навантаження на довкілля.

У наш час важливим завданням, яке може бути вирішено із залученням біотехнології, є розроблення препаратів широкого спектру активності, безпечних для довкілля і людей, з метою їх використання в рослинництві [186, 187]. Це пояснюється зростаючим забрудненням ґрунтів, кормів, харчових продуктів синтетичними засобами (пестицидами, регуляторами росту, добривами), які широко вживають протягом багатьох років. Отже, створення препаратів для сільськогосподарських рослин на основі біогенних ПАР є перспективним напрямком, зважаючи на їх фізико-хімічні і біологічні властивості. Серед важливих агрокультур у світі все більшого значення набувають олійні рослини у зв'язку з їх багатоцільовим призначенням – для різноманітних харчових продуктів (рослинні олії, маргарини, жири), кормів, а також для виробництва біодизельного палива.

Показано можливість та ефективність використання розроблених препаратів ПАР штаму *Pseudomonas* sp.PS-17 при вирощуванні практично важливих олійних культур. Показано, що одержані продукти – супернатант культуральної рідини і рамноліпідний біокомплекс, мають здатність регулювати ріст і фізіологічні процеси олійних рослин. Передпосівне оброблення насіння препаратами рамноліпідних ПАР сприяє підвищенню проростання насіння, ростових, біохімічних показників рослин, а також їх врожайності. [188, 189]. Так, встановлено, що РБК (0,01 г/дм³) або СКР (за розведення 1:200) є ефективними регуляторами росту ріпаку, тифону, редьки та соняшнику. Порівняльні дослідження впливу на рослини розчинів виділених рамноліпідів та рамноліпідного біокомплексу (0,01 г/дм³) показали, що РБК має більшу активність: при його використанні показники надземної і кореневої маси ріпаку та були на 10-15 % більшими, ніж у варіантах з РЛ. Цей результат є практично важливим, оскільки препарат РБК дешевший за РЛ, тобто РБК економічно вигідніший. Виявлено також високу ефективність препарату СКР: за його використання для оброблення насіння значно підвищилася маса кореневої і надземної частин олійних рослин:

соняшнику – на 62% і 54 % відповідно, ріпаку – на 32 і 27 %, тифону – на 90 і 68 %, редьки олійної – на 70 і 38 % щодо контролю. Високу ефективність препарату СКР ми пояснюємо наявністю в його складі не тільки поверхнево-активних, а й інших біологічно активних метаболітів (фітогормонів, амінокислот, вітамінів), які виявляють стимулювальний вплив на ріст рослин. Перевагою препарату СКР також є економічна вигідність, оскільки його виробництво складається з меншої кількості технологічних стадій, оскільки це природний розчин ПАР – постферментаційна культуральна рідина після відділення клітинної маси.

На нашу думку, стимулювальну дію рамноліпідних ПАР на рослини можна пояснити низкою їх функціональних властивостей. Так, у біотесті на колеоптилях пшениці, що характеризує вплив препаратів на ріст клітин шляхом розтягнення, визначено здатність РБК сприяти збільшенню приросту відрізків колеоптилей. З літератури відомо, що зростання клітин через розтягнення пов'язано з поглинанням води й активуванням мембранозв'язаних ензимів, зокрема H^+ АТФ-ази і кислих гідролаз [190]. У процесі розтягнення клітин активуються також процеси утворення целюлази і везикулярної секреції, при цьому синтезуються полісахариди для клітинної стінки рослин. Можливість впливу ПАР на активність ферментів, зв'язаних з мембраною клітини рослин, узгоджується з даними їх дії на мембранозв'язані АТФ-азу та фосфоліпазу. Ще одним поясненням впливу ПАР на рослини є підвищення біодоступності різних поживних речовин або води, що сприяє зокрема покращенню змочування ґрунту та розподілу добрив у ґрунті, засвоєнню поживних речовин рослиною [190]. Також біоПАР мають здатність змінювати властивості поверхні коренів [191].

Ефективність застосування рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 при вирощуванні соняшнику підтверджено також у дрібноділянкових дослідах. Встановлено, що передпосівне оброблення насіння соняшнику розчинами СКР або РБК сприяло підвищенню важливих ростових

показників, зокрема діаметру кошика на 25,8 і 22,4% (у 2012 р.) і на 56,1 і 39,7 % (у 2013 р.). Суттєво збільшувалася маса 1000 насінин – відповідно на 39,8 і 28,7%, та 50,5 і 32,3 %. Крім того, покращувалися й якісні показники врожаю: вміст жиру в отриманому насінні зростав на 21,6-19,4 % (2012 р.) та 25-34,3 % (2013 р.) та вміст протеїну – на 9-10,2 % і 11,2-8 % відповідно. Під впливом препаратів СКР або РБК збільшувалася продуктивність рослин, а також якість отриманого врожаю, про що свідчать показники вмісту жиру і протеїну у зібраному насінні.

Практичне значення одержаних результатів цілком підтвердили результати апробації розроблених препаратів рамноліпідних ПАР при вирощуванні соняшнику в умовах виробничого дослідження, проведеного на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України [192]. У польових умовах ефективність препаратів РБК і СКР при вирощуванні соняшнику вивчалася у порівнянні із регулятором росту рослин Вимпел, який використовується у сучасному рослинництві. Встановлено, що за передпосівного оброблення насіння розчинами РБК або СКР у рослин збільшувався діаметр кошика на 37,2 і 44,8 %, тоді як при обробленні препаратом Вимпел – на 41,4 % відносно контролю. Водночас маса 1000 насінин збільшувалася за використання препаратів РБК або СКР на 51,5 і 64 %, відносно контрольного варіанту, а при використанні Вимпелу – тільки на 24,6 %, вміст жиру у насінні соняшника підвищувався на 5 і 16 % (з біоПАР) і на 8 % (з Вимпелом), а вміст протеїну – на 5 % і 8 % відповідно. Отже, у польових умовах при вирощуванні соняшнику стимулювальна дія рамноліпідних біоПАР мала чітко виражений характер, крім того вони були більш ефективними за відомий стимулятор росту рослин Вимпел. Отримані результати свідчать про перспективність використання рамноліпідних поверхнево-активних речовин, отриманих на економічно вигідних субстратах, у сільськогосподарській практиці при створенні ефективних екологічно безпечних препаратів для вирощування олійних культур.

Отже, у сучасних технологіях рослинництва рамноліпідні ПАР можна використовувати у таких напрямках: 1) як самостійні препарати для передпосівного оброблення насіння, які сприяють стимулюванню росту і активуванню фізіологічних процесів рослин, збільшенню врожайності, 2) у комплексі із різноманітними агрозасобами (для передпосівного оброблення насіння та позакореневого оброблення рослин), що сприятиме захисту рослин від різноманітних хвороб, стимулюванню росту, збільшенню врожайності. Це пояснюється вищезазначеними фізико-хімічними і біологічними властивостями біоПАР, завдяки яким можна підвищити ефективність регуляторів росту рослин та засобів захисту, наприклад, синтетичних фунгіцидів [193]. Це має економічне значення для рослинництва, оскільки знижується розхід препаратів, а також й екологічне – зменшується хімічне навантаження агрозасобів на довкілля.

На основі результатів проведених досліджень запропоновано технологію виробництва поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, новизною якої (у порівнянні з попередніми роботами) є використання економічно вигідних джерел вуглецю. Важливою відмінністю даної технології є також режим дробної подачі джерел вуглецю у систему: спочатку гліцерину, який є водорозчинним і легше утилізується, а далі – фузу олійного. Для практичного застосування у технологіях вирощування сільськогосподарських культур запропоновано одержання 5 товарних форм цільового продукту, які розроблені за принципом максимального використання екзо- й ендометаболітів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, а саме: культуральна рідина після ферментолізу (1), супернатант культуральної рідини (2), рамноліпідний біокомплекс (3), полігідроксиалканоати з виділеної біомаси (4), фугат СКР після відділення РБК (5). Раніше даний продуцент використовувався тільки для отримання позаклітинних ПАР [194]. Технологічний процес одержання продуктів *Pseudomonas* sp. PS-17 складається з допоміжних стадій (санітарна

підготовка виробництва, підготовка стерильного технологічного повітря та поживного середовища), стадій основного технологічного процесу (товарна ферментація і постферментаційна обробка культуральної рідини) та стадій пакування і маркування готового продукту.

З практичної точки зору важливо, що запропонована технологія виробництва рамноліпідних ПАР може бути реалізована на стандартному біотехнологічному обладнанні, за винятком деяких конструктивних удосконалень у будові ферментера, що було показано раніше [195].

Здійснено розрахунок економічної ефективності виробництва рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 при застосуванні запропонованої технології. Завдяки розробленню раціональних умов синтезу та способів виділення цільових продуктів вдалося знизити собівартість виробництва на 37 % (у ферментері об'ємом 1 м³). В результаті розрахунку роздрібною вартості показано, що отриманий препарат СКР *Pseudomonas* sp. PS-17 у 3-5 разів дешевший, ніж представлені на сучасному ринку закордонні аналоги.

Отже, у результаті проведених досліджень, теоретично обґрунтовано та практично вирішено важливе наукове завдання, що полягає у розробленні раціональної біотехнології одержання препаратів на основі рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 та їх застосування як екологічно безпечних препаратів у сучасних технологіях вирощування практично важливих олійних рослин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі науково обґрунтовано та практично вирішено важливе завдання, що полягає у розробленні раціональної біотехнології препаратів на основі рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 та їх застосування для вирощування олійних рослин.

1. Встановлено можливість інтенсифікації синтезу рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 з використанням економічно вигідних джерел вуглецю (фузу олійного, пересмаженої олії) їх композицій з гліцерином, а також дробного способу подачі субстратів, що дало змогу підвищити вихід синтезованих продуктів (за вмістом рамноліпідів) на 18-39 % у порівнянні з використанням гліцерину як моносубстрату.

2. Удосконалено способи виділення рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17: осадження РБК із супернатанту культуральної рідини при зміні температури впродовж процесу, що привело до зростання кількості продукту на 32,7 %. Використовуючи метод лінійних багатопараметрових рівнянь, визначено оптимальні розчинники для екстракції рамноліпідів з СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17.

3. Запропоновано економічно обґрунтовані форми цільових продуктів на основі екзо- й ендометаболітів *Pseudomonas* sp. PS-17: культуральна рідина після ферментолізу, супернатант культуральної рідини, рамноліпідний біокомплекс, полігідроксиалканоат, фугат СКР після відділення РБК.

4. Досліджено фізико-хімічні і біологічні властивості продуктів на основі рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17: поверхневу активність (28,3-29 мН/м), емульгування гідрофобних речовин (індекс E24 становить 60-80 %), змочування поверхонь, а також вплив на проникність клітинних мембран мікроорганізмів і рослин.

5. Виявлено підвищення активності фітогормонів основних груп (ауксинів – на 28-63%, цитокинінів – на 30%, гіберелінів – на 30%) під впливом рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17.

6. Встановлено антимікробну активність одержаних ПАР та розроблено їх композиції з тіосульфонатами, які мають високу ефективність щодо мікроорганізмів-фітопатогенів, на що вказує зниження мінімальних інгібувальних концентрацій тіосульфонатів на 50-80 % та мінімальних біоцидних концентрацій на 28,6-66,8 % завдяки застосуванню біоПАР.

7. Виявлено стимулювальний вплив на олійні рослини отриманих продуктів: передпосівне оброблення насіння сприяло зростанню маси кореневої і надземної частин соняшника на 62 і 54 % відповідно, ріпаку – на 32 і 27 %, тифону – на 90 і 68 %, редьки олійної – на 70 і 38 % порівняно з контролем. Доведено, що дія ПАР на мікроорганізми і рослини зумовлена змінами їх фізіолого-біохімічних характеристик (ростові показники, проникність клітинних мембран рослин та активність фітогормонів).

8. Ефективність використання розроблених рамноліпідних ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 при вирощуванні соняшника підтверджено результатами дрібноділянкових та виробничого експериментів. Показано, що за використання рамноліпідних ПАР підвищувалися ростові показники соняшника в середньому на 31%, а також показники якості врожаю (маса 1000 насінин – 51-64 %, вміст жиру – 5-16 % і протеїну у насінні – 5-8 %).

9. Запропоновано технологічну та апаратурну схему промислового виробництва рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 з використанням дробного способу подачі економічно вигідних субстратів на вихровому біореакторі. Дана технологія дозволяє одержати 5 форм продуктів для практичного застосування у рослинництві.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Randhawa K. Rhamnolipid biosurfactants – past, present, and future scenario of global market / K. Randhawa, P. Rahman. // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – No. 5. – P. 1–7.
2. Rhamnolipid biosurfactants: evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource / [G. Kiran, A. Ninawe, A. Lipton et al.]. // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2016. – No. 36. – P. 399–415.
3. Стимулювання росту злакових рослин поверхнево-активними рамноліпідами / [О. В. Карпенко, Н. І. Корецька, Н. С. Щеглова та ін.]. // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Т. 6, № 6. – С. 94–99.
4. Пирог Т. П. Ключові проблеми промислового одержання мікробних поверхнево-активних речовин / Т. П. Пирог, С. В. Ігнатенко, Д. О. Тарасенко. // *Харчова промисловість*. – 2008. – № 7. – С. 32–36.
5. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria / [L. Rodrigues, J. Teixeira, R. Oliveira et al.]. // *Process Biochemistry*. – 2006. – V. 41. – P. 1–10.
6. Nguyen T. T. Characterization and Emulsification Properties of Rhamnolipid and Sophorolipid Biosurfactants and Their Applications / T. T. Nguyen, D. A. Sabatini. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – No.12. – P. 1232–1244.
7. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules / R. B. Lovaglio, F. J. dos Santos, M. J. Junior, J. Contiero. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – No. 2. – P. 301–305.
8. Rhamnolipids—Next generation surfactants? / [M. M. Müller, J. H. Kügler, M. Henkel et al.]. // *Journal of Biotechnology*. – 2012. – No. 4. – P. 366–380.
9. Magalhães L. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin / L. Magalhães, M. Nitschke. // *Food Control*. – 2013. – No. 1. – P. 138–142.

10. Mann E. E. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology / E. Mann, D. J. Wozniak. // FEMS Microbiology Reviews. – 2012. – No. 36. – P. 893–916.
11. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation / [C. T. O’Loughlina, L. C. Millerb, A. Siryaporn et al.]. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2013. – No. 44. – P. 17981–17986.
12. Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: Antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / [E. Haba, S. Bouhdid, N. Torrego-Solana et al.]. // International Journal of Pharmaceutics. – 2014. – No. 1. – P. 134–141.
13. Vasileva-Tonkova E. The Effect of Rhamnolipid Biosurfactant Produced by *Pseudomonas fluorescens* on Model Bacterial Strains and Isolates from Industrial Wastewater / E. Vasileva-Tonkova, A. Sotirova, D. Galabova. // Current Microbiology. – 2011. – No. 2. – P. 427–433.
14. Singh A. K. Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil / A. K. Singh, S. S. Cameotra. // Environmental Science and Pollution Research. – 2013. – No. 10. – P. 7367–7376.
15. Isolation and screening of biosurfactant producing bacteria from soil contaminated with domestic waste water. / T. O.Femi-Ola, O. A. Oluwole, T. O. Olowomofe, H. Yakubu. // British Journal of Environmental Sciences. – 2015. – No. 1. – P. 58–63.
16. Saravanan V. Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil / V. Saravanan, S. Vijayakumar. // Journal Of Academia And Industrial Research. – 2012. – No. 5. – P. 264–268.
17. Statistical Screening of Medium Components for Recombinant Production of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 Rhamnolipids by Nonpathogenic Cell

- Factory *Pseudomonas putida* KT2440 / [P. Setoodeh, A. Jahanmiri, R. Eslamloueyan et al.]. // *Molecular Biotechnology*. – 2014. – No. 2. – P. 175–191.
18. Sekhon K. K. Biosurfactant Production and Potential Correlation with Esterase Activity / K. K. Sekhon, S. Khanna, S. S. Cameotra. // *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. – 2012. – No. 7. – P. 1–10.
19. Nitschke M. Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste / M. Nitschke, S. G. Costa, J. Contiero. // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2010. – No. 7. – P. 2066–2074.
20. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure / [K. Petrikova, Y. Deleganb, A. Surinc et al.]. // *Process Biochemistry*. – 2013. – No. 5. – P. 931–935.
21. Jarvis F. G. A Glycolipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa* / F. G. Jarvis, M. J. Johnson. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1949. – No. 12. – P. 4124–4126.
22. Production of Four Interfacial Active Rhamnolipids from *i*-Alkanes or Glycerol by Resting Cells of *Pseudomonas species* DSM 2874 / C. Syldatk, S. Lang, U. Matulovic, F. Wagner. // *Zeitschrift für Naturforschung*. – 1985. – No. 1. – P. 61–67.
23. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene / [E. Déziel, F. Lépine, D. Dennie et al.]. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1999. – No. 2. – P. 244–252.
24. Goren M. B. Mycobacterial Lipids: Selected Topics / Goren. // *Bacteriological reviews*. – 1972. – No. 1. – P. 33–64.
25. Suzuki T. Trehalose lipid and alpha-branched-beta-hydroxy fatty acid formed by bacteria grown on N-alkanes / T. Suzuki, K. Tanaka. // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1969. – No. 11. – P. 1619–1627.

26. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants / F.Peng, Z. Liu, L. Wang, Z. Shao. // *Journal of Applied Microbiology*. – 2007. – No. 6. – P. 1603–1611.
27. Tullock P. A new type of macrocyclic lactone from *torulopsis apicola* / P. Tullock, A. Hill, J. Spencer. // *Chemical Communications*. – 1967. – P. 584–586.
28. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *wickerhamiella domercqiae* / [J. Chen, X. Song, H. Zhang et al.]. // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – No. 39. – P. 501–506.
29. Crich D. Synthesis of the mannosyl erythritol lipid MEL A; confirmation of the configuration of the meso-erythritol moiety / D. Crich, M. de la Mora, R. Cruz. // *Tetrahedron*. – 2002. – No. 58. – P. 35–44.
30. Characterization of a biosurfactant, mannosylethritol lipid produced from *Candida sp.* SY16 / [H. S. Kim, B. D. Yoon, D. H. Choung et al.]. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1999. – No. 5. – P. 713–721.
31. Arima K. Surfactin a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*—Isolation characterization and its inhibition of fibrin clot formation / K. Arima, A. Kakinuma, G. Tamura. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1968. – No. 3. – P. 488–494.
32. Vater J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants / Vater. // *Progress in Colloid and Polymer Science*. – 1986. – No. 72. – P. 12–18.
33. Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens / J.Falardeau, C. Wise, L. Novitsky, T. J. Avis. // *Journal of Chemical Ecology*. – 2013. – No. 7. – P. 869–878.
34. Liao G. Regulation mechanisms underlying the biosynthesis of daptomycin and related lipopeptides / G. Liao, T. Shi, J. Xie. // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2012. – No. 3. – P. 735–741.

35. Mandal S. M. Lipopeptides in microbial infection control: Scope and reality for industry / S. M. Mandal, A. E. Barbosa, O. L. Franco. // *Biotechnology Advances*. – 2013. – No. 2. – P. 338–345.
36. Macdonald C. R. Surface-Active Lipids from *Nocardia erythropolis* Grown on Hydrocarbons / C. R. Macdonald, D. G. Cooper, J. E. Zajic. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1981. – No. 41. – P. 117–123.
37. Kretschmer A. Chemical and Physical Characterization of Interfacial-Active Lipids from *Rhodococcus erythropolis* Grown on n-Alkanes / A. Kretschmer, H. Bock, F. Wagner. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1982. – No. 4. – P. 864–870.
38. Wayman M. Biotechnology for oil and fat industry / M. Wayman, A. D. Jenkins, A. G. Kormady. // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1984. – No. 61. – P. 129–131.
39. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T / [M. Robert, M. E. Mercade, M. P. Bosch et al.]. // *Biotechnology Letters*. – 1989. – No. 11. – P. 871–874.
40. Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component / [M. P. Mercaldi, H. Dams-Kozłowska, B. Panilaitis et al.]. // *Biomacromolecules*. – 2008. – No. 9. – P. 1988–1996.
41. Makkar R. S. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production / R. S. Makkar, S. S. Cameotra, I. M. Banat. // *AMB Express*. – 2011. – No. 1. – P. 1–19.
42. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production / [M. Henkel, M. M. Muller, J. H. Kugler et al.]. // *Process Biochemistry*. – 2012. – No. 47. – P. 1207–1219.
43. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract / P. Maddipati, H. K. Atiyeh, D. D.

- Bellmer, R. L. Huhnke. // *Bioresource Technology*. – 2011. – No. 11. – P. 6494–6501.
44. Costa S. G. Fats and oils wastes as substrates for biosurfactant production / S. G. Costa, M. Nitschke, J. Contiero. // *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. – 2008. – No. 1. – P. 34–38.
45. George S. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D / S. George, K. Jayachandran. // *Journal of Applied Microbiology*. – 2013. – No. 2. – P. 373–383.
46. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. / [A. Wittgens, T. Tiso, T. T. Arndt et al.]. // *Microbial Cell Factories*. – 2011. – No. 1. – P. 1–17.
47. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction / F. Donota, A. Fontana, J. C. Baccou, S. Schorr-Galindo. // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – No. 2. – P. 951–962.
48. Dubey K. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production / K. Dubey, A. Juwarkar. // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2001. – No. 1. – P. 61–69.
49. Biotechnological Alternatives for the Utilization of Dairy Industry Waste Products / A. Cortés-Sánchez, E. R. Valle-González, R. D. Salazar-Flores, S. Ashutosh. // *Advances in Bioscience and Biotechnolog.* – 2015. – No. 6. – P. 223–235.
50. Casas J. A. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods / J. A. Casas, F. Garcia-Ochoa. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 1999. – No. 5. – P. 488–494.
51. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry / J. M. Lunaa, R. D. Rufinoa, L. A. Sarubboa, G. M. Campos-Takakia. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – P. 202–209.

52. Daverey A. Production, Characterization, and Properties of Sophorolipids from the Yeast *Candida bombicola* using a Low-cost Fermentative Medium / A. Daverey, K. Pakshirajan. // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2009. – No. 3. – P. 663–674.
53. Daverey A. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization / A. Daverey, K. Pakshirajan. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2010. – P. 246–253.
54. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant / [H. Abbasi, M. Hamedi, T. B. Tayebe Bagheri Lotfabad et al.]. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2012. – №2. – P. 211–219.
55. Okoliegbe I. N. Application of microbial surfactan / I. N. Okoliegbe, O. O. Agarry. // *Scholarly Journal of Biotechnology*. – 2012. – №1. – P. 15–23.
56. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems / M. M.Müller, B. Hörmann, C. Syldatk, R. Hausmann. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – No. 1. – P. 167–174.
57. Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. In: *Biosurfactants*. Berlin: Springer / [A. M. Abdel-Mawgoud, R. Hausmann, F. Lépine et al.]. // *Biosurfactants*. – 2011. – P. 13–55.
58. Patent USOO5656747A United States. Process for the quantitative purification of glycolipids/ Mixich et al. Date of Patent: Aug. 12, 1997.
59. Kumar P. Characterization of Biosurfactant from *Bacillus* Isolates as Antifungal Agent / P. Kumar, R. Sharma, A. Gajbhiye. // *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – No. 2. – P. 117–123.
60. Dzięgielewska E. Evaluation of waste products in the synthesis of surfactants by yeasts / E. Dzięgielewska, M. Adamczak. // *Chemical Papers*. – 2013. – No. 9. – P. 1113–1122.

61. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction / [M. S. Kuyukina, I. B. Ivshina, J. C. Philp et al.]. // Journal of Microbiological Methods. – 2001. – No. 2. – P. 149–156.
62. Chen H. L. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction / H. L. Chen, R. S. Juang. // Biochemical Engineering Journal. – 2008. – No. 1. – P. 39–46.
63. Hammen S. Chemoenzymatische Modifikation von nativen und hydrolysierten Sophoroselipiden : 570 Biowissensc / Hammen Sabine – Braunschweig, 2003. – 160 P.
64. Walter V. New Approaches for the Economic Production of Rhamnolipid Biosurfactants from Renewable Resources : 570 Biowissensc / Walter Vanessa – Karlsruhe, 2009. – 129 P.
65. Microbial biosurfactants production, applications and future potential / [I. M. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, et al.]. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010. – No. 2. – P. 427–444.
66. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens / [R. Y. Shax, L. F. Jiang, Q. Meng et al.]. // Journal of Basic Microbiology. – 2012. – P. 458–466.
67. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds / [L. Fracchia, J. J. Banat, M. Cavallo et al.]. // AIMS Bioengineering. – 2015. – No. 3. – P. 144–162.
68. Microbial biosurfactants as additives for food industries / [J. M. Campos, M. T. Stamford, L. A. Sarubbo et al.]. // Biotechnology Progress. – 2013. – No. 5. – P. 1097–1108.
69. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock / M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira, A. Manresa. // International Journal of General and Molecular Microbiology. – 2004. – No. 1. – P. 1–8.

70. Finnerty W. R. Biosurfactants in environmental biotechnology / R. Finnerty. // *Current Opinion in Biotechnology*. – 1994. – No. 3. – P. 291–295.
71. Badanie przydatności biosurfaktantów w procesie oczyszczania zaolejonych gruntów metodą przemywania / [S. Pastewski, I. Kłosowska, E. Hallmann et al.]. // *Podstawy biotechnologii – trendy, badania, implementacje*. – Gliwice: Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Śląska. – 2008. – P. 75–80.
72. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil / [O. Pornsunthorntawe, P. Wongpanita, S. Chavadeja et al.]. // *Bioresource Technology*. – 2008. – P. 1589–1595.
73. Mulligan C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants / Mulligan. // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. – 2009. – No. 5. – P. 372–378.
74. Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir / W. J.Xia, H. P. Dong, L. Yu, D. F. Yu. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2011. – No. 1. – P. 124–130.
75. Ozdemir G. Wetting characteristics of aqueous rhamnolipids solutions / G. Ozdemir, U. Malayoglu. // *Colloids and Surfaces B—Biointerfaces*. – 2004. – No. 1. – P. 1–7.
76. Use of some carbon sources by *Pseudomonas* strains for synthesizing polyhydroxyalkanoates and/or rhamnolipids / D. M.Cirstea, M. Stefanescu, J. M. Pahonțu, C. P. Cornea. // *Romanian Biotechnological Letters*. – 2014. – No. 3. – P. 9400–9408.
77. Dahrazma B. Effects of additives on the structure of rhamnolipid (biosurfactant): A small-angle neutron scattering (SANS) study / B. Dahrazma, C. N. Mulligan, M. P. Nieh. // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2008. – P. 590–593.

78. Surface properties and subsurface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems / [Z. A. Raza, Z. M. Khalid, M. S. Khan et al.]. // *Biotechnology Letters*. – 2010. – No. 6. – P. 811–816.
79. Frothability and surface behavior of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 / H.Khoshdast, H. Abbasi, A. Sam, K. A. Noghabi. // *Biochemical Engineering Journal*. – 2012. – P. 127–134.
80. Pathak K. V. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR) / K. V. Pathak, H. Keharia. // *3 Biotech*. – 2014. – No. 1. – P. 41–48.
81. Lotfabad T. B. Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of dirhamnolipid proportion using gamma irradiation / T. B. Lotfabad, H. Abassi, R. Ahmadkhaniha. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2010. – No. 2. – P. 397–405.
82. Thavasi R. . Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria / R. Thavasi, S. Sharma, S. Jayalakshmi. // *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. – 2011. – No. 1. – P. 1–6.
83. Wallace C. J. Effect of rhamnolipids on permeability across Caco-2 cell monolayers / C. J. Wallace, S. H. Medina, M. E. ElSayed. // *Pharmaceutical Research*. – 2013. – No. 4. – P. 887–894.
84. Dusane D. H. Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant / D. H. Dusane, S. Dam, Y. V. Nancharaiyah. // *Aquatic Biosystems*. – 2012. – P. 1–7.
85. Gomaa E. Z. Antimicrobial and antiadhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability / Eman Zakaria Gomaa. // *The Journal of General and Applied Microbiology*. – 2013. – No. 6. – P. 425–436.
86. Gomaa E. Z. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey / Gomaa. // *Brazilian Archives of*

Biology and Technology. – 2013. – No. 56. – P. 259–268.

87. Desai J. D. Microbial production of surfactants and their commercial potential / J. D. Desai, I. M. Banat. // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1997. – No. 1. – P. 47–64.

88. Effect of the lipopeptide antibiotic iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells / L.Thimon, F. Peypoux, J. Wallach, G. Michel. // *FEMS Microbiology Letters*. – 1995. – P. 101–106.

89. Molecular mechanisms of antibacterial and antitumor actions of designed surfactant-like peptides / [C. Chen, J. Hu, S. Zhang et al.]. // *Biomaterials*. – 2012. – No. 2. – P. 592–603.

90. Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa* / [E. Haba, A. Abalos, O. Jauregui et al.]. // *Journal of Surfactants and Detergents*. – 2003. – No. 2. – P. 155–161.

91. Deepika K. V. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52 / K. V. Deepika, R. P. Sridhar, P. V. Bramhachari. // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2014. – No. 4. – P. 608–615.

92. Alphamomorcharin, a RIP produced by bitter melon, enhances defense response in tobacco plants against diverse plant viruses and shows antifungal activity *in vitro* / [F. Zhu, P. Zhang, Y. Meng et al.]. // *Planta*. – 2013. – No. 1. – P. 77–88.

93. Goswami D. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari*—the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane / D. Goswami, P. J. Handique, S. Deka. // *Journal of Basic Microbiology*. – 2014. – No. 6. – P. 548–557.

94. Inhibition of fungi from diseased grape by syringomycin E-rhamnolipid mixture / [J. Y. Takemoto, M. Bensaci, A. J. De Lucca et al.]. // *American Journal of Enology and Viticulture*. – 2010. – No. 1. – P. 120–124.

95. Bockmüh D. Biosurfactants as Antimicrobial Ingredients for Cleaning Products and Cosmetics / Dirk Bockmüh. // 2012. – No. 3. – P. 196–198.
96. do Valle Gomes M. Z. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria / M. Z. do Valle Gomes, M. Nitschke. // Food Control. – 2012. – No. 2. – P. 441–447.
97. Cell surface properties of *Pseudomonas stutzeri* in the process of diesel oil biodegradation / E.Kaczorek, T. Jesionowski, A. Giec, A. Olszanowski. // Biotechnology Letters. – 2012. – No. 5. – P. 857–862.
98. Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition / [L. Chrzanowski, M. Dziadas, L. Lawniczak et al.]. // Bioresource Technology. – 2012. – P. 328–335.
99. Mohan P. K. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions / P. K. Mohan, G. Nakhla, E. K. Yanful. // Water Resources. – 2006. – No. 3. – P. 533–540.
100. Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of monorhamnolipids / [S. Johann, T. B. Seile, T. Tiso et al.]. // Science of The Total Environment. – 2016. – P. 155–163.
101. Effects of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 on luminescent bacteria: toxicity and modulation of cadmium bioavailability. / [O. Bondarenko, P. K. Rahman, T. J. Rahman et al.]. // Microbial Ecology. – 2010. – No. 3. – P. 588–600.
102. Ławniczak Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation / Ł. Ławniczak, R. Marecik, Ł. Chrzanowski. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2013. – No. 6. – P. 2327–2339.
103. Banat I. M. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents / I. M. Banat, M. A. De Rienzo, G. A. Quinn. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – No. 24. – P. 9915–9929.

104. Das P. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity / P. Das, X. Yang, L. Z. Ma. // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – P. 1–8.
105. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54 / T. H.Nielsen, C. Christophersen, U. Anthoni, J. Sorensen. // *Journal of Applied Microbiology*. – 1999. – P. 80–90.
106. Biopesticide Registration Action Document *Bacillus subtilis* Strain QST 713 (PC Code 006479) [Электронный ресурс] // US Environmental Protection Agency. – 2006. – Режим доступа до ресурсу: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_P_C-006479_9-Aug-06.pdf.
107. Biopesticides Registration Action Document Rhamnolipid Biosurfactant (PC Code 110029) [Электронный ресурс] // US Environmental Protection Agency. – 2004. – Режим доступа до ресурсу: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_P_C-110029_11-May-04.pdf.
108. Pat. US 4996049 A USA, A01N63/00, C12R1/39, C12R1/425. Biological control of corn seed rot and seedling blight / Haefele D.M., Lampthey J.C., Marlow J.L.; applicant and owner Pioneer Hi-Bred International, Inc. – US 07/286,032; appl. 19.12.1988; publ. 26.02.1991.
109. Stanghellini M. E. Biosurfactants: Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens / M. E. Stanghellini, R. M. Miller. // *Plant Disease*. – 1997. – P. 4–12.
110. Mazzotta S. Pattern Recognition In Plant Innate Immunity / S. Mazzotta, B. Kemmerling. // *Journal of Plant Pathology*. – 2011. – No. 1. – P. 7–17.
111. Mackey D. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity / D. Mackey, A. J. McFall. // *Molecular Microbiology*. – 2006. – No. 6. – P. 1365–1371.

112. Boller T. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors / T. Boller, G. Felix. // *Annual Review of Plant Biology*. – 2009. – P. 379–406.
113. Induced Systemic Resistance and the Rhizosphere Microbiome / [P. A. Bakker, R. F. Doornbos, C. Zamioudis et al.]. // *Plant Pathology*. – 2013. – No. 2. – P. 136–143.
114. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine / [A. L. Varnier, L. Sanchez, P. Vatsa et al.]. // *Plant Cell and Environment*. – 2009. – P. 178–193.
115. Pat. US 8680060 B2 USA, A61K38/00, A01N63/02, A01N25/30, A01N63/00. Compositions and methods for controlling pests with glycolipids / Awada S.M., Awada M.M., Spendlove R.S.; applicant and owner Agscitech Inc. - US 13/171,960; appl. 29.06.2011; publ. 25.03.2014.
116. Pat. US 7994138 B2 USA, A01N43/16, A01N63/02, A01N25/30, A01N63/00. Microbial biosurfactants as agents for controlling pests / Awada S.M., Spendlove R.S., Awada M.; applicant and owner Agscitech Inc. – US 11/141,669; appl. 31.05.2005; publ. 09.08.2011.
117. Sachdev D. P. Biosurfactants in agriculture / D. P. Sachdev, S. S. Cameotra. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – P. 1005–1016.
118. The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion / [A. S. Alsohim, T. B. Taylor, G. A. Barrett et al.]. // *Environmental Microbiology*. – 2014. – No. 7. – P. 2267–2281.
119. Davey M. E. Rhamnolipid surfactant production affects biofilms architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PA-01 / M. E. Davey, N. C. Caiazza, G. A. Tootle. // *Journal of Bacteriology*. – 2003. – No. 3. – P. 1027–1036.
120. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances / M. Pacwa-Płociniczak, G. A. Płaza, Z. Piotrowska-Seget, S. S. Cameotra. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2011. – No. 1. – P. 633–654.

121. Rhamnolipid biosurfactants decrease the toxicity of chlorinated phenols to *Pseudomonas putida* DOT-T1E / [L. Chrzanowski, L. Y. Wick, R. Meulenkamp et al.]. // Letters in Applied Microbiology. – 2009. – No. 6. – P. 756–762.
122. A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization / [H. T. Wattanaphon, A. Kerdsin, C. Thammacharoen et al.]. // Journal of Applied Microbiology. – 2008. – P. 416–423.
123. Pat. App. US 20110306569 A1 USA, C12N1/20, C07H15/06, C12P7/64, A01N43/04. Rhamnolipid biosurfactant from pseudomonas aeruginosa strain ny3 and methods of use / Yin X., Nie M., Shen Q.; applicant and owner Oregon State University – US 13/158,241; appl. 10.06.2011; publ. 15.12.2011.
124. Pat. US 9351485 B2 USA, A01P21/00, A01P7/04, A01N43/16, A01P13/00. Use of sophorolipids and derivatives thereof in combination with pesticides as adjuvant/additive for plant protection and the industrial non-crop field / Giessler-Blank S., Schilling M., Thum O.; applicant and owner Evonik Degussa GmbH – US 13/497,588; appl. 30.08.2010; publ. 31.05.2016.
125. Bioconversion of agro-industrial by products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation / [E. J. Gudiña, A. I. Rodrigues, E. Alves et al.]. // Bioresource Technology. – 2015. – P. 87–93.
126. Mani D. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation / D. Mani, C. Kumar. // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2014. – No. 3. – P. 843–872.
127. Arjoon A. Co-contamination of water with chlorinated hydrocarbons and heavy metals: challenges and current bioremediation strategies / A. Arjoon, A. O. Olaniran, B. Pillay. // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2013. – No. 2. – P. 395–412.
128. Optimization of Extracellular Polymeric Substances production using *Azotobacter beijreincii* and *Bacillus subtilis* and its application in chromium (VI)

removal / R.Chug, V. S. Gour, S. Mathur, S. L. Kothari. // Bioresource Technology. – 2016. – P. 604–608.

129. Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus* / [S. Kang, A. Khan, M. Waqas et al.]. // Plant-Microorganism Interactions. – 2014. – No. 1. – P. 673–682.

130. Exogenous Salicylic Acid Enhances the Resistance of Wheat Seedlings to Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae) Infestation Under Heat Stress / J. Underwood, J. Moch, M. S. Chen, M. S. Zhu. // Journal of Economic Entomology. – 2014. – No. 5. – P. 2000–2004.

131. Kudoyarova G. R. Role of Bacterial Phytohormones in Plant Growth Regulation and Their Development / G. R. Kudoyarova, T. N. Arkhipova, A. I. Melent'ev // Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem / G. R. Kudoyarova, T. N. Arkhipova, A. I. Melent'ev. – Berlin: Springer International Publishing, 2015. – (1). – (Sustainable Development and Biodiversity; V. 12). – P. 69–86.

132. Cytokinin Induces Cell Division in the Quiescent Center of the Arabidopsis Root Apical Meristem / [W. Zhang, R. Swarup, M. Bennett et al.]. // Malcol. – 2013. – No. 20. – P. 1979–1989.

133. Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice / [M. Reguera, Z. Peleg, Y. M. Abdel-Tawab et al.]. // Plant Physiology. – 2013. – No. 4. – P. 1609–1622.

134. Pandya N. D. Screening and characterization of GA 3 producing *Pseudomonas monteilii* and its impact on plant growth promotion / N. D. Pandya, P. V. Desai. // International Journal of Current Microbiology and Applied. – 2014. – No. 5. – C. 110–115.

135. Bharucha U. Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

on Mustard (*Brassica nigra*) / U. Bharucha, K. Patel, U. B. Trivedi. // *Agricultural Research*. – 2013. – No. 3. – P. 215–221.

136. Kapoor R. Cytokinins production by *Pseudomonas fluorescent* isolated from rhizospheric soils of Malus and Pyrus / R. Kapoor, M. Kaur. // *African Journal of Microbiology Research*. – 2016. – No. 32. – P. 1274–1279.

137. Поверхностно-активные соединения культуры *Pseudomonas sp.* PS-17 / [Е. В. Карпенко, А. Н. Шульга, Н. С. Щеглова та ін.]. // *Микробиологический Журнал*. – 1996. – №5. – С. 18–24.

138. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, S. G. Stanley. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1957. – No. 1. – P. 497–509.

139. Koppel I.A. In *Advances in linear free energy* / I.A. Koppel, V.A. Palm.// *Relationships*, Eds. Plenum Press. – London-New York. – 1973. – P. 203 – 280.

140. Макитра Р.Г. Закономерности распределения замещенных, разветвленных и ненасыщенных карбоновых кислот между органической и водной фазами / Р.Г. Макитра // *Журнал общей химии*. – 2003. – №8. – С.1244–1252.

141. Characterisation of *Pseudomonas rhamnolipids* / [N. Rendell, G. Taylor, M. Somerville et al.]. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. – 1990. – No.1045. – P. 189–193.

142. Guerra-Santos L. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source / L. Guerra-Santos, O. Kappeli, A. Fiechter. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1984. – P. 301–305.

143. Ensign J. Characterization of a Small Proteolytic Enzyme Which Lyses Bacterial Cell Walls / J. Ensign, R. Wolfe. // *J. Bacteriol.*. – 1966. – №91. – С. 524–534.

144. Bradford M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding / Bradford. // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – P. 248–254.

145. Пат. 71792 А Україна 7 С12N1/02 С12R1:38. Поверхнево-активний біопрепарат / О. В. Карпенко, Н. Б. Мартинюк, О. Н. Шульга, Н. С Щеглова.; власник О. В. Карпенко, Н. Б. Мартинюк. – заявл. 25.12.2003; опубл. 15.12.2004. Бюл № 12.
146. Cooper D. G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species / D. G. Cooper, V. G. Goldenberg. // Applied and Environmental Microbiology. – 1987. – No. 2. – P. 224–229.
147. Абрамзон А. А. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение / А. А. Абрамзон, Л. П. Зайченко, С. И. Файнгольд// – Л.: Химия- 1988. – 200 с.
148. Практикум по коллоидной химии: учебное пособие для вузов / [под ред Р.Э. Неймана]. – М.: Высшая школа, 1970. – 176 с.
149. Киселев М. Г. Определение краевого угла смачивания на плоских поверхностях / М. Г. Киселев, В. В. Савич, Т. П. Павич. // Наука и техника. – 2006. – №1. – С. 38–41.
150. Vasileva-Tonkova E. Biosurfactant Production by Antarctic Facultative Anaerobe Pantoea sp. During Growth on Hydrocarbons / E. Vasileva-Tonkova, V. Gesheva. // Current Microbiology. – 2007. – No. 2. – P. 136–141.
151. Сеги Й. Методи ґрунтової мікробіології / Й. Сеги. – М.: Колос, 1983. – 296 с.
152. Biotechnology of nutrient uptake and assimilation in plants / D.López-Arredondo, M. Leyva-González, F. Alatorre-Cobos, L. Herrera-Estrella. // Int. J. Dev. Biol.. – 2013. – No.57. – P. 595–610.
153. Ocena toksyczności biosurfactantów produkowanych przez Pseudomonas sp. PS-17 / [B. Kolwzan, J. Biazik, A. Czarny et al.]. // Ekotoksykologia w ochronie środowiska. – 2008. – P. 191 – 197.
154. Якість води. Визначання гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* STRAUS та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (*Cladocera*, *Crustacea*) (ISO 6341:1996, MOD): ДСТУ 4173-2003. – [Чинний від 2004-07-01]. – К.:

Держспоживстандарт України 2004. – 22 с. – (Національний стандарт України).

155. Antimicrobial potential of selected tiosulfonates – based biocides and biosurfactants against bacteria and fungi / [A. Sotirova,, T. Avramova, I. Lazarkevich et al.]. // Reports BAS. – 2010. – No. 6. – P. 21–25.

156. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості: ДСТУ 4138-2002. – [Чинний від 2004-01-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2003. – 173 с. – (Національний стандарт України).

157. Кефели В. И. Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов / В. И. Кефели, Р. Х. Турецкая, Е. М. Коф. // М.: Колос. – 1973. – С. 7.

158. Хархота Л. В. Ризогенез стеблових здерев'янілих живців декоративних малопоширених кущових рослин у Донбасі / Л. В. Хархота, Н. Ф. Довбиш. // Промислова ботаніка. – 2008. – №8. – С. 161–165.

159. Evensen K. B. Differences in endogenous levels of gibberellin-like substances in nodules of *Phaseolus lunatus* L. plants inoculated with two *Rhizobium* strains / K. B. Evensen, D. G. Blevins. // Plant Physiology. – 1981. – P. 195–198.

160. Шлык А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А. А. Шлык. // Биохимические методы в физиологии растений. – 1971. – С. 154–170.

161. ГОСТ 10842–89 (ISO 520–77) Зерно зернових і бобових культур та насіння олійних культур. Метод визначання маси 1000 зерен або 1000 насінин. Чинний від 30.06.1991, перевиданий 01.05.2009 – К.: Держспоживстандарт України.

162. ГОСТ 13496.4–93 Корми, комбікорми, комбікормова сировина. Методи визначання вмісту азоту і сирого протеїну. Чинний від 01.03.2002, перевиданий 19.01.2011. – К.: Держспоживстандарт України.

163. ГОСТ 10857–64 Насіння олійне. Методи визначання олійності. Чинний

від 10.09.2010. – К.: Держспоживстандарт України.

164. Лакин А. Н. Курс вариационной статистики. / А. Н. Лакин // – К.: Вища школа-1990. – 116 с.

165. Rhamnolipids – next generation surfactants? / [M. M. Müller, J. H. Kügler, M. Henkel et al.] // Journal of Biotechnology. – 2012. – Vol. 162. – P. 366–380.

166. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials / [K. S. M. Rahman, T. J. Rahman, S. McClean et al.] // Biotechnology Progress. – 2002. – Vol. 18. – P. 1277 – 1281.

167. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil / [D. Camilios-Neto, C. Bugay, A. P. de Santana-Filho et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 89. – P. 1395 – 1403.

168. Rashedi H. Optimization of the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* HR isolated from an Iranian southern oil well / H. Rashedi // Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering. – 2006. – Vol. 25. – P. 25 – 30.

169. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil / [D. Camilios-Neto, C. Bugay, A.P. de Santana-Filho et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 89. – P. 1395 – 1403.

170. Pekin G. Production of Sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 Using Turkish Corn Oil and Honey / G. Pekin, F. Vardar-Sukan, N. Kosaric // Engineering in Life Sciences. – 2005. – Vol. 5. – P. 357 – 362.

171. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials // P. K. S. M. Rahman, T. J. Rahman, S. McClean [et al.] // Biotechnology Progress. – 2002. – Vol. 18. – P. 1277 – 1281.

172. Karpenko I.V. Influence of food industry wastes as substrates on the yield of biosurfactants of the strain *Pseudomonas* sp. PS-17 / I.V. Karpenko, G.G. Midyana, O.Y. Karpenko // Ecological Engineering and Environment Protection. – 2016. – No. 1. – P. 44-51

173. Вплив способу підготовки інокуляту на синтез поверхнево-активних речовин *acinetobacter calcoaceticus* K-4 / [Т. П. Пирог, С. І. Антонюк, О. В. Щербина та ін.]. // Наукові праці Національного університету харчових технологій. — 2010. — № 32. — С. 52-54.
174. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* / [M. Abouseouda, R. Maachi, A. Amranec et al.] // Desalination. – 2008. – Vol. 223. – P. 143 – 151
175. Оптимизация процесса экстракции биосурфактантов, синтезированных бактериями рода *Rhodococcus* / [Е. В. Карпенко, М. В. Прыстай, Р.Г.Макитра и др.] // Наукові праці Донецького Національного технічного університету. – 2011. – №17(187). – С. 124-128.
176. Экстракция биогенных поверхностно-активных рамнолипидов / [И. В. Карпенко, Г. Г. Мидяна, Е. В. Карпенко и др.] // Журнал общей химии. – 2014. – Т. 84, №7. – С. 1172-1175.
177. Колоїдні властивості синтетичних емульгаторів та рамноліпиду / [А. П. Грабаровська, В. А. Волошинець, І. В. Семенюк та ін.] // Вопросы химии и химической технологии. – 2008. – Т. 51, №6. – С. 149 – 152.
178. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains / [A. Sotirova, D. Spasova, D. Galabova et al.] // Current Microbiology. – 2008. – Vol. 56. – P. 639-644.
179. The importance of rhamnolipid-biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates / [A. Sotirova, T. Avramova, S. Stoitsova et al.] // Current Microbiology. – 2012. – Vol. 65. – P. 534-541.
180. Mass spectrometric study of rhamnolipid supramolecular complexes with membrane phospholipids / Vlada Pashynska, Olena Karpenko // Supramolecular Systems in Chemistry and Biology: int. summer school, 6-10 September 2010: proc. of conf. – Lviv, 2010. – P. 135.
181. Карпенко І.В. Біогенні рамноліпідні ПАР у комплексних регуляторах

росту рослин / І.В. Карпенко, Г.Г. Мідяна, О.В. Карпенко // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2016. – № 3(107). – С. 36-41.

182. L.R. Rodrigues. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. / L. R. Rodrigues, J. A. Teixeira, R. Oliveira // Biochemical Engineering Journal. – 2006. No. 3. – P. 135–142.

183. Лубенець В. І. Тіосульфонати: синтез і властивості / Лубенець В.І. // Укр. хім. журн. – 2003. – № 3. – С. 109–117.

184. Development of new antimicrobial compositions of thiosulfonate structure / [V V. Lubenets, O. Karpenko, M. Ponomarenko et al.] // Chemistry and Chemical Technology. – 2013. – Vol. 7 – P. 119 – 124.

185. Development of new antimicrobial compositions of thiosulfonate structure / [V. Lubenets, O. Karpenko, M. Ponomarenko et al.] // Chemistry and Chemical Technology. – 2013. – Vol. 7 – P. 119-124.

186. Биорегуляция микробно-растительных систем: [ред. Г. А. Иутинская и др.]. – К.: Ничлава – 2010. – 463 с.

187. Ostroumov S.A. Biological effects of surfactants / S.A. Ostroumov // CRC Press. – 2005.– 385 P

188. Вплив біогенних поверхнево-активних речовин на ріст олійних культур / [Карпенко І.В., Мідяна Г.Г., Карпенко О.Я та ін.] // Вісник Національного університету “Львівська політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2014 – №. 787 – С. 254-257.

189. Перспективи використання біогенних поверхнево-активних речовин та етилтіосульфанілату у технології вирощування тютюну / [Корецька Н.І., Карпенко І.В., Плотникова та ін.] // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2015. – № 812. - С. 257-261.

190. Шумилина Е. В. Влияние поверхностно-активных веществ на активность фосфолипазы ДII / Е. В. Шумилина, Н. Ю. Зонова, Ю. А. Щипунов // Биологические мембраны. – 1998. – Т. 15, №4. – С. 414 – 419.

191. D'aes J. Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol / J. D'aes, K. De Maeyer, D. Pauwelyn // *Environmental Microbiology Reports*. – 2010. – Vol. 2. – P. 359 – 372.
192. Перспективи рамноліпідних поверхнево-активних речовин у технологіях вирощування соняшника / [І. В. Карпенко, Г. Г. Мідяна, О. Я. Карпенко та ін.] // *Вісник Національного університету "Львівська політехніка"*. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2016 – № 841. – С. 164-168.
193. Application of microbial surfactants in new formulation for plant protection / [E.Karpenko, N. Scheglova, R. Vildanova et al.] // In: *Chemicals in Agriculture and Environment, series: Chemistry for Agriculture- Vol. 8.- Ed. A. Pawielczyk. Czech-Pol Trade: Prague – Bruxelles*. – 2007. – P. 113 – 117.
194. Дослідження росту та синтезу цільового продукту штамом *Pseudomonas* species PS-17 – продуцента позаклітинних біосурфактантів / [В. А. Єрохін, Т. Я. Покинсьброда, О. В. Карпенко та ін.] // *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. – 2006. – № 553. – С. 124-127
195. Застосування вихрового ферментера для одержання продуктів мікробного синтезу // [О. В. Карпенко, В. А. Єрохін, М. В. Пристай, та ін.] // *Вопросы химии и химической технологии*. – 2012. – № 2. – С. 34-39.

Додаток

Акт впровадження та використання результатів роботи



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Назва пропозиції для впровадження:**
- 2.** “Біотехнологія рамноліпідних поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 та їх застосування для олійних рослин”
- 3. Установа, її адреса, виконавець:**

Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М.Литвиненка НАН України, м. Львів, вул. Наукова За, здобувач наукового ступеня к.т.н. Карпенко І. В.
- 4. Джерела інформації:**
 - 1 Экстракция биогенных поверхностно-активных рамнолипидов / И. В. Карпенко, Г. Г. Мидяна, Е. В. Карпенко, Е. Я. Пальчикова, Р. Г. Макитра // Журнал общей химии. – 2014. – Т. 84. – С. 1172 – 1175.
 2. Influence of food industry wastes as substrates on the yield of biosurfactants of the strain *Pseudomonas* sp. PS-17 / I. V. Karpenko, G. G. Midyana, O. Y. Karpenko, V.P.Novikov // Ecological Engineering and Environment Protection, No 1, 2016, p. 44-51
 3. Перспективи використання біогенних поверхнево-активних речовин та стилтіосульфанілату у технології вирощування тютюну / Н. І. Корецька, І. В. Карпенко, Т. В. Плотникова, Є. М. Тютюнникова, Г. Г. Мідяна, В. І. Лубенець, В.П.Новіков // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування. - 2015. - № 812. - С. 257-261.
- 5. Впроваджено:** у науково-дослідну роботу кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».
- 6. Термін впровадження:** вересень-грудень 2015 р.
- 7. Ефективність впровадження:** апробація та використання роботи свідчать, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелі інформації. Розроблену біотехнологію синтезу поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 з використанням режиму дозованого додавання гліцерину та фузу олійного (як джерел вуглецю) апробовано у пілотному реакторі об'ємом 100 л. Продуктом є ферментолізована культуральна рідина штаму: поверхневий натяг – 29,2 мН/м, вміст рамноліпідного біокомплексу – 15,0 г/дм³, індекс емульгування – 70 %.

Результати апробації вказують на ефективність даної біотехнології та перспективи її промислового впровадження.
- 8. Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри
Технології біологічно активних сполук,
фармації та біотехнології,
д.х.н., проф.

В.П. Новіков

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор

Інституту сільського господарства

Карпатського регіону НААН України,

член-кореспондент НААН Седіло Г.М.



« 15 » березня 2016 р.

А К Т В П Р О В А Д Ж Е Н Н Я

*результатів дисертаційної роботи Карпенко Ілони Василівни
“Біотехнологія рамноліпідних поверхнево-активних продуктів штаму
Pseudomonas sp. PS-17 та їх застосування для олійних рослин”*

Результати досліджень з синтезу біогенних поверхнево-активних речовин, що представлені у дисертаційній роботі *Карпенко Ілони Василівни*, використані у виробничих дослідах на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України, підтверджено ефективність застосування розроблених біологічних рамноліпідних поверхнево-активних речовин при вирощуванні соняшнику. Показано, що у польових умовах стимулювальна дія біоПАР мала чітко виражений характер, крім того вони були більш ефективними у порівнянні з відомим стимулятором росту рослин Вимпел. Результати дисертації спрямовані на подальше впровадження перспективних рамноліпідних ПАР практичного застосування у сільськогосподарській практиці при створенні ефективних екологічно безпечних препаратів для вирощування олійних культур.

Провідний науковий співробітник
лабораторії захисту рослин,
канд. біол. наук.

Яцук К. І.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Національного університету
«Львівська політехніка»

підп. Давидчак О.Р.

2016 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

2. "Біотехнологія рамноліпідних поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 та їх застосування для олійних рослин"

3. Установа, її адреса, виконавець:

Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглекімії ім. Л.М.Литвиненка НАН України, м. Львів, вул. Наукова 3а, здобувач наукового ступеня к.т.н. Карпенко І. В.

4. Джерела інформації:

1. Вплив біогенних поверхнево-активних речовин на ріст олійних культур / І. В. Карпенко, Г. Г. Мідяна, О. Я. Карпенко, В. І. Баранов // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування. - 2014. - № 787. - С. 254-257.

2. Карпенко І.В., Лубенець В.І., Карпенко О.Я., Мідяна Г.Г., Новіков В.П. Перспективи композицій рамноліпідних біоПАР з етилтіосульфатом для засобів захисту рослин / daRostim: XII Міжнар. наук.-практ. конф., 7-9 вересня 2016: Матеріали конф. – Одеса, 2016. – С. 87-88.

3. Карпенко Е.В., Бая А.Р., Карпенко И.В., Пристай М.В., Щеглова Н.С., Новиков В. П., Баранов В.И. Влияние биогенных ПАВ на рост и содержание пигментов фотосинтеза у редьки масличной и рапса при выращивании на загрязненной нефтью почве, 2012, Информационный бюллетень ВПРС МОББ, 41, с. 532-533.

5. Впроваджено: у навчальний процес кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

6. Термін впровадження: лютий-травень 2016 р.

7. Ефективність впровадження: результати дисертаційної роботи використовуються в науковій роботі та навчальному процесі кафедри, зокрема у викладанні спецкурсів «Основи біотехнологічного виробництва» та «Загальна біотехнологія».

8. Зауваження та пропозиції: немає.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри
Технології біологічно активних сполук,
фармації та біотехнології,
д.х.н., проф.

В.П. Новіков

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи

Львівського Національного

університету ім. І Франка

член-кор. НАНУ, д.х.н.,

проф. Гладішевський Р.С.

2016 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи Карпенко Ілони Василівни “Біотехнологія рамноліпідних поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas sp. PS-17* та їх застосування для олійних рослин”

1. Установа, виконавець:

Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглекімії ім. Л.М.Литвиненка НАН України, м. Львів, вул. Наукова 3а, здобувач наукового ступеня канд. техн. наук Карпенко І. В.

2. Джерела інформації:

1. Карпенко Е.В., Бая А.Р., Карпенко І.В., Щеглова Н.С., Новиков В. П., Баранов В.И. Влияние биогенных ПАВ на рост и содержание пигментов фотосинтеза у редьки масличной и рапса при выращивании на загрязненной нефтью почве, 2012, Информационный бюллетень ВПРС МОББ, 41, с. 532-533

2. А. Р. Бая, В. І. Баранов, І. В. Карпенко, Н. І. Корецька, Р. І. Вільданова, О. В. Карпенко Вплив біогенних поверхнево-активних речовин і мікробного препарату на морфометричні показники проростків *Raphanus sativus* L. і *Pisum arvense* L. // Біологічні студії. – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 115 – 122.

3. І. В. Карпенко, Г. Г. Мідяна, О. Я. Карпенко, В. І. Баранов / Вплив біогенних поверхнево-активних речовин на ріст олійних культур // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування. - 2014. - № 787. - С. 254-257.

3. Ефективність впровадження: результати дисертаційної роботи Карпенко І.В. використовуються в наукових дослідженнях, при виконанні курсових і дипломних робіт, навчальному процесі кафедри фізіології та екології рослин Львівського національного університету ім.І.Франка, у викладанні окремих спецкурсів.

Доцент кафедри фізіології
та екології рослин
ЛНУ ім. І Франка, к.б.н.

В.І.Баранов



Оласо