

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ВІДДІЛЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЇ ГОРЮЧИХ КОПАЛИН
ІНСТИТУТУ ФІЗИКО-ОРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА ВУГЛЕХІМІЇ ІМ. Л.М. ЛИТВИНЕНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

*Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису*

Корецька Наталія Ігорівна

УДК 604.2:61.185 (043.3)

ДИСЕРТАЦІЯ
«БІОТЕХНОЛОГІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ
ШТАМУ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* Au-1,
ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ»

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук.
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____Н.І. Корецька

Науковий керівник: **Карпенко Олена Володимирівна**, д. т. н., проф.

Львів – 2020

АНОТАЦІЯ

Корецька Н.І. Біотехнологія поверхнево-активних продуктів штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1, властивості та застосування.— Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

У наш час поверхнево-активні речовини широко застосовуються в сучасній промисловості, сільському господарстві, медицині, для біоремедіації довкілля. Проте синтетичні ПАР – це небезпечні для навколишнього середовища речовини. Водночас перевагами поверхнево-активних речовин мікробного синтезу є висока ефективність, стабільність за різних температур і рН, біологічна активність, а також біодеградабельність і низька токсичність.

Дисертація присвячена дослідженню процесів біосинтезу ПАР актинобактерій *Rhodococcus erythropolis* Au-1 (*R. erythropolis* УКМ Ас-603), вивченню фізико-хімічних і біологічних властивостей біоПАР та їх практичного застосування.

У результаті скринінгу культур *R. erythropolis* відібрано штам *R. erythropolis* Au-1 (*R. erythropolis* УКМ Ас-603), який є активним продуцентом клітинно-зв'язаних та позаклітинних трегалозоліпідних ПАР. Визначено раціональний склад поживного середовища (гексадекан – 20 г/дм³, натрій нітрат – 3 г/дм³) та доцільність застосування відходів олійної промисловості (рослинних фосфатидних концентратів, фузів, пересмаженої соняшникової олії) для синтезу ТПАР. Проведено апробацію синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 у біореакторі з вихровою системою аерації (вихід цільових продуктів зріс на 41-50%). Із застосуванням математичного моделювання (метод лінійних багатопараметрових рівнянь) встановлено залежність між розчинністю ТПАР і властивостями розчинників та визначено, що опримальними екстрагентами ТПАР є речовини, що проявляють високу поляризуючу здатність щодо молекул біоПАР.

Розроблено нові способи виділення позаклітинних ТПАР з використанням натрій альгінату (вихід ТПАР – 0,45 г/дм³) або магніточутливих багаточарових

композитних адсорбентів на основі оксидів металів (MnO – 0,32г/дм³, CoO – 0,64 г/дм³, CuO – 0,88 г/дм³ ТПАР). Обґрунтовано використання етанолу як екстрагента клітинно-зв'язаних ТПАР (вихід – 0,29 г з 1 г АСБ).

Вперше з клітин штаму *R. erythropolis* Au-1 виділено біодеградабельний клітинний полімер, який ідентифіковано як полігідроксиалканоат, визначено його температуру плавлення (42°C) та термічну стійкість (до 175°C).

Встановлено здатність штаму *R. erythropolis* Au-1 до синтезу позаклітинних фітогормонів ауксинової природи.

Описано фізико-хімічні властивості поверхнево-активних продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1. Вивчено біологічні властивості ТПАР: підвищують проникність клітинних мембран бактерій (на 6-18%), поглинання мінеральних елементів рослинами (на 27-48 %), стимулюють метаболізм бактерій (приріст біомаси і метаболітів на 13-17%) та ріст рослин (приріст на 20-36%). Показано, що ТПАР *R. erythropolis* Au-1 підсилюють дію інших біологічно-активних речовин, зокрема, біоцидів-тіосульфонатів (на 20-50%) та фітогормонів – індоліл-оцтової кислоти (практично у 10 разів). Встановлено, що трегалозоліпідні ПАР є менш токсичними речовинами порівняно з синтетичними та деякими біогенними ПАР.

Доведено можливість практичного застосування поверхнево-активних метаболітів *R. erythropolis* Au-1 у рослинництві (ТПАР підвищують урожайність бобових і злакових культур в середньому на 20%) . Встановлено здатність досліджуваних бактерій до синтезу фітогормонів фуксинової природи та обґрунтовано доцільність використання супернатанту культуральної рідини як ефективного та економічно доступного стимулятора росту рослин.

Встановлено, що продукти метаболізму штаму *R. erythropolis* Au-1 є екологічно безпечними інгібіторами корозії сталі та алюмінію. Розроблено інгібувальні композиції ТПАР та цинк фосфату, які забезпечують ступінь захисту вуглецевої сталі від корозії у пластовій воді за різних температур на рівні 88-95% (патент України № 136578 від 27.08.2019р.).

На основі отриманих результатів розроблено технологію промислового виробництва практично цінних метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1, яка дозволяє максимально використати усі компоненти постферментаційної культуральної рідини та отримати 5 товарних форм: супернатант культуральної рідини, позаклітинні та клітинно-зв'язані трегалозоліпідні ПАР, екзополісахаридний комплекс, полігідроксиалканоат.

За результатами досліджень опубліковано 22 наукових праці, у тому числі 12 статей (з них 7 статей у журналах, які представлено у міжнародних наукометричних базах даних Scopus, Google Scholar), 2 статті – в інших виданнях, патент України на корисну модель, 9 тез доповідей.

Ключові слова: біоПАР, *Rhodococcus erythropolis*, трегалозоліпідни, фізико-хімічні і біологічні властивості, стимулятори росту рослин, інгібітори корозії.

SUMMARY

Koretska N.I. Biotechnology, characteristics and application of metabolites of the strain *Rhodococcus erythropolis* Au-1. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Dissertation for the candidate of technical science degree in speciality 03.00.20 - Biotechnology. – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute” of the Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2020.

Surfactants are widely used in modern industry, agriculture, environmental restoration, medicine, however, synthetic surfactants are environmentally hazardous substances. Advantages of products of microbial synthesis (biosurfactants) – high efficiency, stability in various temperatures and pH, biological activity, as well as biodegradability and low toxicity.

The aim of the work is the development of biotechnology of surface-active substances of *R. erythropolis* Au-1 via optimizing the cultivation conditions and isolation, studying physico-chemical, biological properties of the products, determine of their practical potential.

The strain *R. erythropolis* Au-1 (*R. erythropolis* UCM Ac-603) is a promising producer of cell-bound and extracellular trehalose lipid surfactants, exopolysaccharides, cell polymers. The rational composition of the nutrient medium has been determined: hexadecane – 20 g/dm³, sodium nitrate – 3 g/dm³. The cultivation of bacteria *R. erythropolis* Au-1 for trehalose lipid surfactants synthesis has been carried out in a bioreactor with vortex aeration system (the yield of the target products increased by 41-50%). The possibility of waste vegetable oil using (phosphatide concentrate, oil sludge, waste frying sunflower oil) for the synthesis of trehalose lipid surfactants of *R. erythropolis* Au-1 has been established.

New approaches of extracellular trehalose lipids isolation with adsorbents were developed: sodium alginate or multilayer metal oxides based composite adsorbents (MnO, CoO, CuO). The use of ethanol for extraction of cell-bound trehalose lipid surfactants was justified (yield 0.29 g from 1 g biomass).

For the first time biodegradable polymer from bacteria cells of *R. erythropolis* Au-1 was obtained. It has been identified as the polyhydroxyalkanoate, its melting point – 42°C, thermal stability – up to 175°C.

The ability of the *R. erythropolis* Au-1 strain to synthesize the phytohormones has been established.

Physico-chemical and biological properties of the metabolites of *Rhodococcus erythropolis* strain Au-1 were established: high surface activity, emulsification of hydrophobic substances, wetting of surfaces as well as the influence on the permeability of cell membranes of microorganisms and plants, on the auxin phytohormones activity. The antimicrobial activity of surfactants against phytopathogen bacteria and fungi was shown. The highly effective formulations of trehalose lipid surfactants with thiosulfonates-biocides were designed. The biological properties of trehalose lipid surfactants were established: increase the permeability of bacteria cell membranes (by 6-18%), adsorption of mineral elements by plants (by 27-48%), stimulate plant growth (by 20-36%). It has been shown that trehalose lipid surfactants promote the action of other biologically active substances, in particular, biocide-thiosulfonates (by 20-50%) and phytohormones – indolyl-acetic acid (almost

10 times). It was found, that trehalose lipid surfactants are less toxic than synthetic and some biogenic surfactants.

It have been substantiated that the cultural liquid supernatant (CLS) of *R. erythropolis* Au-1 is an effective and economically available plant growth regulator. Using the trehalose lipid surfactants increase the yield of legumes and cereals by an average of 20%. So, the possibility of practical use of metabolites in crop production has been proved.

The surface-active substances of the strain are environmentally friendly corrosion inhibitors of steel and aluminum alloy. The effective compositive inhibitor based on CLS of *R. erythropolis* Au-1 and zinc phosphate has been developed (patent of Ukraine № 136578, 2019): the degree of carbon steel protection from corrosion is 88-95%.

The technology process, the flow and equipment diagrams for the industrial production of the biosurfactants of *R. erythropolis* Au-1 have been developed. This technology allows maximum use of all components of post-fermentation culture liquid. It is possible to obtain 5 commercial forms: the culture liquid supernatant, extracellular and cell-bound trehalose lipid surfactants, exopolysacharides, cell polyhydroxyalkanoate. The results have ecological and economic advantages.

On the topic of the thesis, 22 works were published, among them: 12 scientific articles, including 7 articles indexed in Scopus, Google Scholar, 1 patent of Ukraine, 9 proceeding of conferences.

Key words: biosurfactants, *Rhodococcus erythropolis*, trehalose lipids, physico-chemical and biological properties, corrosion inhibitors, plant growth regulators.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Koretska, N.I.**; Prystay, M.V.; Karpenko, E.V. Rare phosphatide concentrate in the technologies of surfactants production by the *Actinobacteria*. *Ukrainian food journal*, **2014**, 3(3), pp 429-436. *Особистий внесок: біосинтез поверхнево-активних речовин, їх виділення та властивостей, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 1609 від 21.11.2013. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Index Copernicus, Google Scholar, UlrichsWeb, Directory of Research Journals Indexing.

2. **Корецька, Н.І.**; Мідяна, Г.Г.; Карпенко, О.В. Оптимізація екстракції трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1. *Innov Biosyst Bioeng*. **2018**, 2(4), с. 246–251. <https://doi.org/10.20535/ibb.2018.2.4.148935>. *Особистий внесок: біосинтез поверхнево-активних речовин та екстракція різними розчинниками, підготовка матеріалів до друку*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Index Copernicus, Google Scholar, WorldCat.

3. Похмурський, В.І.; Зінь, І.М.; Карпенко, О.В.; Покинсьброда, Т.Я.; **Корецька, Н.І.**; Тимусь, М.Б.; Квятковські, Л.; Копилець, В.; Хлопик, О. Захист вуглецевої сталі інгібіторами біогенного походження. Проблеми корозії та протикорозійного захисту матеріалів. Спецвипуск журналу “Фізико-хімічна механіка матеріалів”, **2018**, 12, с.183-187. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar.

4. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Баранов, В.І.; Лубенець, В.І.; Ногіна, Т.М. Біологічні властивості поверхнево-активних метаболітів *Rhodococcus erythropolis* Au-1 та їх перспективи для рослинництва. *Innov Biosyst Bioeng*, **2019**, 3 (2), с. 144–148. <https://doi.org/10.20535/ibb.2019.3.2.165165>. *Особистий*

внесок: біосинтез поверхнево-активних речовин, проведення експериментів для вивчення їх біологічних властивостей, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Index Copernicus, Google Scholar, WorldCat.

5. Zin, I. M.; Karpenko, O. V.; Pokyn'broda, T. Ya.; **Korets'ka, N. I.**; Tymus', M. B.; Kwiatkowski, L.; Kornii, S. A. Inhibition of the corrosion of carbon steels by trehalose lipid surfactants. *Materials Science*, **2019**, 54 (4), (Ukrainian Original Vol. 54, No. 4, July–August, 2018). <https://doi.org/10.1007/s11003-019-00207-0>. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин.* Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar, **Scopus**, SciSearch.

6. Слободян, З. В.; Маглатюк, Л. А.; Купович, Р. Б.; **Корецька, Н. І.**; Зінь, Я. І. Вплив супернатанту культуральної рідини трегалозоліпиду на корозію сталі 20 та алюмінію в хлоридних розчинах. *Фізико-хімічна механіка матеріалів*, **2019**, 55 (5), с.27-33. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин.* Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar.

7. Pokhmurs'kyi, V. I.; Zin', I. M.; Tymus', M. B.; Kornii, S. A.; Karpenko, O. V.; Khlopyk, O. P.; **Korets'ka, N. I.** Inhibition of the corrosion of carbon steel by xanthan biopolymer. *Materials Science*, 2020, 55 (4). (Ukrainian Original Vol. 55, No. 4, July–August, 2019). <https://doi.org/10.1007/s11003-020-00334-z>. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин.* Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України № 326 від 04.04.2018. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar, **Scopus**, SciSearch.

8. **Корецька, Н.І.**; Баранов, В.І.; Пристай, М.В.; Карпенко, О.В. Вплив метаболітів бактерій роду *Rhodococcus* на ростові показники проростків

пшениці. *Вісник НУ «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. **2013**, 761, с.128-132. *Особистий внесок: проведення досліджень для вивчення впливу метаболітів бактерій роду *Rhodococcus* на ріст пшениці, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2.

9. **Корецька, Н.І.**; Пристай, М.В.; Карпенко, О.В. Біосинтез та властивості поверхнево-активних речовин штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1. *Вісник НУ «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. **2014**, 787, с. 258-263. *Особистий внесок: біосинтез поверхнево-активних речовин, їх виділення та дослідження властивостей, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2.

10. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, І.В.; Плотникова, Т.В.; Тютюнникова, Є.М.; Мідяна, Г.Г.; Лубенець, В.І. Перспективи використання біогенних поверхнево-активних речовин та етилтіосульфанілату у технології вирощування тютюну. *Вісник НУ «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. **2015**, 81, с.257-261. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин, підготовка матеріалів до друку*. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2.

11. Карпенко, О.В.; **Корецька, Н.І.**; Щеглова, Н.С.; Карпенко, І.В.; Баранов, В.І. Стимування росту злакових рослин поверхнево-активними рамноліпідами. *Biotechnologia acta*, **2013**, 6(6), с.94-99. <https://doi.org/10.15407/biotech6.06.094>. *Особистий внесок: проведення експерименту для вивчення впливу ПАР на ріст рослин*. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: CrossRef, DOAJ, Google Scholar, InfoBase Index, Index Copernicus, Scientific Indexing Services.

12. Баня, А. Р.; Баранов, В. І.; Карпенко, І. В.; **Корецька, Н. І.**; Вільданова, Р. І.; Карпенко, О. В. Вплив біогенних поверхнево-активних речовин і мікробного препарату на морфометричні показники проростків *Raphanus sativus L.* і *Pisum arvense L.* *Біологічні студії*. **2013**, 7 (1), с.115-122. *Особистий внесок: біосинтез трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин.* Входить до міжнародних наукометричних баз даних: CrossRef, DOAJ, Google Scholar, J-gate, Open access.

13. Патент України на корисну модель № 136578 від 27.08.2019. Інгібіторна композиція. Зінь, І.М.; Похмурський, В.І.; Карпенко, О.В.; Слободян, З.В.; Тимусь, М.Б.; Корній, С.А.; Хлопик, О.П.; **Корецька, Н.І.**; Покинсьброда, Т.Я.; Ногіна, Т.М.; Хоменко, Л.А.

14. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Пристай, М.В.; Щеглова, Н.С. Дія мікробних поверхнево-активних речовин на проростання насіння деяких видів сільськогосподарських рослин. *Збірник тез V Міжнародної наукової конференції "Молодь та поступ біології"*, 12-15 травня 2009 року, м. Львів. Т. 2, с 203.

15. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Пристай, М.В.; Баранов, В.І. Рістстимулюючі препарати для рослин на основі метаболітів бактерій роду *Gordonia* та *Rhodococcus*. *Матеріали ІХ міжнародної конференції «daRostim: Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно-активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища»*, 7-10 жовтня 2013, Львів, с.66.

16. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Баранов, В.І. Вплив препарату трегалозоліпідів на поглинання калію та кальцію проростками сої та пшениці. *Матеріали наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку»*, 12-15 вересня 2013р, Шацьк. с. 38.

17. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Баранов, В.І. Вплив продуктів метаболізму бактерій роду *Rhodococcus* на схожість і морфометричні показники проростків пшениці. *Збірник тез ІХ Міжнародної наукової конференції "Молодь та поступ біології"* (16-19 квітня 2013р.), с.306.

18. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.В.; Баранов, В.І.; Карпенко, І.В. Трегалозоліпідни як ефективний препарат для стимулювання росту, підвищення врожайності та захисту пшениці. *Матеріали наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку»*. 11-14 вересня 2014р., Шацьк. с.45.

19. **Корецька, Н.І.**; Карпенко, О.І.; Пристай, М.В.; Баранов, В.І. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* Au-1 та перспективи їх використання як регуляторів росту рослин. *Збірник тез X Міжнародної наукової конференції "Молодь та поступ біології"* (8-11 квітня 2014р.), с.177-178.

20. Плотникова, Т.В.; Тютюнникова, Е.М.; Карпенко, І.В.; **Корецька, Н.І.**; Лубенець, В.І. Результати испытаний біологічески активних веществ при возделывании табака.: *Материалы XI междунар. науч.-практ. конф. «daRostim: Теория, практика и перспективы применения биологически активных соединений в сельском хозяйстве»*. 17-19 червня 2015. Сыктывкар, Россия. с. 135-136.

21. Швець, В.В.; Карпенко, О.В.; **Корецька, Н.І.**; Новіков, В.П.; Лубенець, В.І. Нові біоцидні препарати на основі тіосульфонатів та трегалозоліпідних ПАР проти фітопатогенних мікроорганізмів. *I Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Науково-практичні засади загальноінженерної підготовки фахівців фармації»*. 25-26 жовтня 2018 р., м. Харків. с. 264-267.

22. Kuntiyi, O.; Kytsya, A.; Karpenko, E.; Bondarenko, A.; Mazur, A.; Bazylyak, L.; **Koretska, N.**; Zayarnyuk, A. Synthesis of silver nanoparticles by contact glow discharge electrolysis in sodium polyacrylate (NaPa) solutions. *7-ма міжнародна конференція «Нанотехнології та наноматеріали»*. 27-30 серпня 2019 р. м.Львів.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	14
ВСТУП	15
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Загальна характеристика біогенних ПАР	20
1.2. Застосування біоПАР	22
1.3. Бактерії роду <i>Rhodococcus</i>	27
1.4. ПАР бактерій роду <i>Rhodococcus</i> та шляхи їх синтезу	28
1.5. Синтез інших практично цінних метаболітів бактеріями роду <i>Rhodococcus</i>	35
Висновки до розділу 1	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
2.1. Об'єкти досліджень	39
2.2. Мікробіологічні методи	39
2.3. Способи виділення продуктів	42
2.4. Аналітичні методи	43
2.5. Фізико-хімічні методи	46
2.6. Математичні методи	47
2.7. Методи визначення біологічної активності	48
2.8. Методи дослідження впливу на рослини	50
2.9. Методи визначення корозійної стійкості	51
2.10. Статистичний аналіз	53
РОЗДІЛ 3. СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ШТАМУ <i>R. ERYTHROPOLIS</i> Au-1	
3.1. Скринінг бактерій виду <i>Rhodococcus erythropolis</i> як продуцентів ПАР	55
3.2. Характеристика метаболітів штаму <i>R. erythropolis</i> Au-1	56
3.3. Раціональні умови синтезу ПАР штаму <i>R. erythropolis</i> Au-1	66
3.4. Апробація біосинтезу ТПАР штаму <i>R. erythropolis</i> Au-1 у ферментері	69
3.5. Відходи промисловості для отримання продуктів	

	13
штаму <i>R. erythropolis</i> Au-1	70
3.6. Способи виділення ТПАР штаму <i>R. erythropolis</i> Au-1	73
Висновки до розділу 3	79
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ПАР <i>R. ERYTHROPOLIS</i> Au-1	
4.1. Принципова технологічна й апаратурно-технологічна схеми процесу отримання продуктів штаму <i>R. erythropolis</i> Au-1	82
4.2. Опис технологічного процесу одержання продуктів <i>R. erythropolis</i> Au-1	87
4.3. Розрахунок економічної ефективності технології отримання ПАР	93
4.4. SWOT-аналіз трегалозоліпідних ПАР	99
Висновки до розділу 4	100
РОЗДІЛ 5. Фізико-хімічні та біологічні властивості ПАР штаму <i>R. erythropolis</i> Au-1	
5.1. Фізико-хімічні властивості	101
5.2. Біологічні властивості	103
Висновки до 5 розділу	109
РОЗДІЛ 6. Практичне застосування трегалозоліпідних ПАР	
6.1. Продукти штаму <i>R. erythropolis</i> Au-1 для рослинництва	111
6.2. Продукти штаму <i>R. erythropolis</i> Au-1 як інгібітори корозії металів	118
Висновки до 6 розділу	126
ВИСНОВКИ	129
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	132
ДОДАТКИ	155
А. Акти впровадження	156

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТС – алілтіосульфанілат

АСБ – абсолютно суха біомаса

біоПАР – біогенні поверхнево-активні речовини

ДДС – натрій додецилсульфат

ЕТС - етилтіосульфанілат

ЕПК – екзополісахаридний комплекс

E₂₄ – індекс емульгування

ІОК - індоліл-3-оцтова кислота

ІЧ-спектрометрія – інфрачервона спектрометрія,

ККМ – критична концентрація міцело утворення

МБК – мінімальна біоцидна концентрація

МІК – мінімальна інгібувальна концентрація

ПАР – поверхнево-активні речовини

ПГА – полігідроксиалканоати

ПН – поверхневий натяг

СКР – супернатант культуральної рідини

ТП – технологічний процес

ТПАР – трегалозоліпідні поверхнево-активні речовини

ТШХ – тонкошарова хроматографа

ФК – фосфатидний концентрат

ЯМР – ядерний магнітний резонанс

ВСТУП

Актуальність теми. Успішний розвиток сучасних технологій передбачає використання нових екологічно безпечних речовин, до яких належать і поверхнево-активні продукти мікробного походження (біоПАР, біосурфактанти). Висока ефективність біоПАР зумовлена поєднанням їх фізико-хімічних властивостей з біологічною активністю (поверхневою, емульгувальною активністю, стійкістю за різних температур, рН, впливом на клітинні мембрани), а також біодеградабельністю і низькою токсичністю (Vanat et al., 2010; Mulligan et al., 2014; Singh et al., 2018). Серед продуцентів біоПАР значний практичний потенціал мають актинобактерії роду *Rhodococcus*, які синтезують широкий спектр важливих метаболітів – трегалозоліпідні ПАР та біополімери різної локалізації (Lu et al., 2009; Franzetti et al., 2010; Hu et al., 2020). Проте їх практичне впровадження можливе тільки за наявності ефективних технологій виробництва. Натепер промислове отримання біогенних ПАР, зокрема трегалозоліпідної природи, лімітується низьким виходом продуктів, а також значною вартістю процесів їх очищення. Створення конкурентоспроможних технологій біоПАР включає не тільки підбір активних штамів-продуцентів, а й оптимізацію біосинтезу, раціональні, економічно обґрунтовані шляхи виділення та очищення цільових продуктів (Okoliegbe and Agarry, 2012).

Отже, актуальною проблемою є розроблення ефективних маловідходних біотехнологій трегалозоліпідних ПАР (ТПАР), багатовекторне дослідження їх властивостей, що сприятиме підвищенню практичного потенціалу екологічно безпечних продуктів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є складовою частиною наукових напрямків Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України – дослідження процесів мікробного синтезу біоПАР та їх практичного використання. Робота виконана в рамках бюджетних науково-дослідних тем: №

0107U001276 “Створення нових екологічно безпечних матеріалів на основі каротиноїдів, полісахаридів та ПАР” (2007-2011 рр.), № 0110U005055 «Фізико-хімічні основи створення високоефективних поверхнево-активних систем на основі біогенних ліпідів, біополімерів та їх комплексів» (2011-2015 рр.); №0119U002996 «Фізико-хімічні основи використання біогенних поверхнево-активних речовин у композиційних препаратах» (2016–2020 рр.); № 0117U004288 «Розробка наукових основ комплексної ремедіації техногенно забруднених ґрунтів» (2017-2021 рр.), а також договірних тем: № 0116U008879 «Розроблення технології біогенних поверхнево-активних речовин та композиційних біоцидних препаратів для рослинництва» (2016-2017 рр.), № 0117U001347 «Розробка біогенних інгібіторів для захисту від корозії та біокорозії нафтогазовидобувного обладнання» програми «Ресурс-2» (2016-2020 рр.), проекту Українського науково-технологічного центру та НАН України № 5965 «Створення нових інгібіторів корозії металів для нафтогазової промисловості із застосуванням екологічно безпечних поверхнево-активних речовин» (2014-2016 рр.). Дисертантка брала участь у виконанні наведених тем як виконавець.

Мета і завдання досліджень

Метою роботи є розроблення технології отримання метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1, визначення їх властивостей та застосування у рослинництві і для захисту металів від корозії.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **задачі**:

- провести скринінг культур *R. erythropolis* на здатність до синтезу ПАР;
- опрацювати раціональні умови синтезу трегалозоліпідних ПАР та біополімерів штаму *R. erythropolis* Au-1;
- дослідити ефективність відходів олійної промисловості як економічно вигідних субстратів для синтезу продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1;
- опрацювати раціональні способи виділення цільових метаболітів *R. erythropolis* Au-1;

- розробити технологічну схему одержання продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1;
- вивчити фізико-хімічні та біологічні властивості отриманих метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 для оцінки їх практичного потенціалу;
- розробити технології застосування продуктів *R. erythropolis* Au-1 у рослинництві та для захисту металів від корозії.

Об'єкт дослідження – біотехнології мікробного синтезу поверхнево-активних речовин.

Предмет дослідження – біотехнологічні параметри одержання поверхнево-активних метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1, їхні функціональні властивості, застосування у рослинництві та антикорозійному захисті металів.

Методи досліджень. Для виконання поставлених завдань використано наступні методи: мікробіологічні (культивування й аналіз мікроорганізмів, визначення антимікробної активності), хімічні (аналіз вмісту метаболітів), фізико-хімічні (визначення поверхневої, емульгувальної активності, показників критичної концентрації міцелоутворення, крайових кутів змочування), спектральні (ідентифікація метаболітів), біохімічні (вміст пігментів фотосинтезу), фізіологічні (біотести на фітогормони), математичні (визначення оптимальних екстрагентів ПАР, статистична обробка результатів), хемоінформатики (віртуальний скринінг біологічної активності з використанням програми PASS). Польові (виробничі) дослідження проведено стандартними методами на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України.

Наукова новизна одержаних результатів. За результатами скринінгу вибрано новий перспективний продуцент поверхнево-активних речовин – штам *R. erythropolis* Au-1, що синтезує не тільки клітинно-зв'язані, а й позаклітинні трегалозоліпідні ПАР, а також екзополісахаридний комплекс. Вперше виділено та ідентифіковано клітинний біополімер штаму *R. erythropolis* Au-1 – полігідроксиалканоат. З використанням математичного моделювання (метод

лінійних багатопараметрових рівнянь) визначено оптимальні екстрагенти ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 з культуральної рідини. Вперше показано ефективність виділення позаклітинних ТПАР шляхом сорбції багат шаровими магніточутливими композитними адсорбентами типу «ядро-оболонка» на основі оксидів перехідних металів. Визначено, що ТПАР сприяють підвищенню проникності клітинних мембран мікроорганізмів і рослин, підсиленню активності біоцидів-тіосульфонатів та ауксинових фітогормонів (індоліл-3-оцтової кислоти).

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологію виробництва метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1, застосування якої дозволило отримати 5 цільових продуктів та максимально використати всі компоненти постферментаційної культуральної рідини. Встановлено ефективність продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1 як регуляторів росту рослин, що підтверджено польовими експериментами. Розроблено екологічно безпечні антикорозійні препарати на основі супернатанту культуральної рідини *R. erythropolis* Au-1, їх ефективність апробовано у промислових умовах. Результати роботи використовуються у навчальному процесі і науковій роботі кафедри фізіології та екології рослин Львівського національного університету ім. І. Франка та кафедри технології біологічно активних сполук, фармації і біотехнології Національного університету «Львівська політехніка». Практичне значення одержаних результатів засвідчено відповідними актами впровадження та патентом України.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою проведено критичний аналіз літератури, експерименти з біосинтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1, дослідження їх властивостей. Планування й постановку експериментів, аналіз результатів проводили спільно з науковим керівником д.т.н., проф. Карпенко О.В., виділення полігидроксиалканоату – з к.т.н. Семенюком І.В., оптимізацію екстракції математичним методом – спільно з к.х.н., с.н.с. Мідяною Г.Г., виділення ТПАР з сорбентами – з к.б.н. Щегловою Н.С. і к.т.н. Макідо О.Ю., дослідження композицій ТПАР з біоцидами – з д.х.н., проф. Лубенець В.І. (НУ

«Львівська політехніка»), інгібування корозії металів – з д.т.н. Зінем І.М. і д.т.н. Корнієм С.А. (Фізико-механічний інститут ім. Г.В. Карпенка НАН України), вплив ПАР на рослини – з к.б.н., доц. Барановим В.І. (ЛНУ ім. І. Франка), виробничі дослідження – з к.б.н. Яцух К.І. (Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААН України). Авторка висловлює подяку к.б.н. Ногіній Т.М. (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України) за надані для досліджень штами бактерій роду *Rhodococcus*, а також всім, хто сприяв виконанню роботи. Зазначені науковці є співавторами публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях: «Молодь та поступ біології» Львів 2009, 2013, 2014 рр.; «daRostim: Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно-активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища», Львів, 2013; «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку», Шацьк, 2013, 2014 рр.; «daRostim: Теория, практика, перспективы применения биологически активных соединений в сельском хозяйстве», Сыктывкар, Россия, 2015; «Науково-практичні засади загально інженерної підготовки фахівців фармації», Харків, 2018 р.

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 22 наукових праці, у тому числі 10 статей у наукових фахових виданнях (з них 7 статей у вітчизняних журналах, які представлено у міжнародних наукометричних базах даних), 2 статті – в інших виданнях, патент України на корисну модель, 9 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних літературних джерел (187 найменувань) і додатка. Робота викладена на 131 сторінці тексту, містить 42 рисунки і 25 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика біогенних ПАР

Біосурфактанти (поверхнево-активні речовини біологічного походження – біоПАР) є поверхнево-активними речовинами, які синтезуються живими організмами, зокрема, бактеріями. Вже досліджено велику кількість різних видів і штамів мікроорганізмів, які синтезують біоПАР з різноманітною хімічною структурою та властивостями (Deleu & Raquot, 2004; Abdel-Mawgoud & Stephanopoulos, 2017). БіоПАР залежно від молекулярної маси поділяють на низькомолекулярні і високомолекулярні біосурфактанти. Перша група ефективно знижує поверхневий та міжфазний натяг, тоді як друга має емульгувальні властивості. За будовою молекули, біоПАР діляють на гліколіпіди (рамноліпіди, софороліпіди, трегалоліпіди, сфінголіпіди), ліпопептиди (сурфактин, ліхенізін, фенгіцин, серветин), жирні кислоти, фосфоліпіди, нейтральні ліпіди (фосфатидилетаноламін), полімерні біоПАР (емульсан, аласан, біодиспезан, ліпосан) (Muthusamy et al, 2008; Paswa-Płosiniczak et al, 2011). Ліпопептиди, гліколіпіди та фосфоліпіди належать до низькомолекулярних сурфактантів, тоді як до високомолекулярних відносять полімерні біоПАР (Shekhar et al, 2015).

Фізико-хімічні властивості біоПАР подібні до синтетичних поверхнево-активних речовин за піноутворюючою, емульгувальною здатністю, ефективністю знижувати поверхневий натяг, солюбілізацією тощо. Проте часто мають кращі піноутворюючі властивості та більшу селективність (Edwards et al., 2003; Mulligan, 2005). БіоПАР мають ряд переваг перед синтетичними поверхнево-активними речовинами, включаючи:

- 1) ефективність у широкому діапазоні температури, солоності та рН (Das et al., 2008; Vijayakumar & Saravanan, 2015). Для прикладу, McInerney та ін. (1990) встановили, що ліхенізін, що синтезується *Bacillus licheniformis*,

ефективний при температурі до 50°C, в діапазоні рН 4,5–9,0, та солоності до 50 г/дм³ NaCl або 25 г/дм³ CaCl₂.

2) синтез біоПАР, як правило, проходить в зручних умовах (наприклад, невисока температура (30°C) і атмосферний тиск) та є можливим при використанні відходів промисловості (Montoneri et al, 2009; George & Jayachandran, 2018).

3) біодеградабельність. Проведено ряд наукових досліджень, результати яких показують, що біогенні ПАР швидко руйнуються в навколишньому середовищі, на відміну від хімічно синтезованих поверхнево-активних речовин (Mohan et al., 2006; Hirata et al., 2009; Mnif & Ghribi, 2016).

4) низька токсичність. На основі результатів оцінки токсичності біоПАР для різних тестових організмів, встановлено, що це, як правило, малотоксичні або нетоксичні продукти (Kuyukina et al., 2007; Hwang et al., 2009; Sahnoun et al., 2014). Зокрема, токсичність біоПАР, синтезованих бактеріями *Rhodococcus ruber*, в 10–100 разів нижча щодо бактерій *Vibrio fischeri*, ніж кількох комерційних синтетичних поверхнево-активних речовин (Ivshina et al., 1998). Дослідження показали, що Corexit – аніонна синтетична ПАР в десять разів токсичніша для *Photobacterium phosphoreum*, ніж рамноліпіди (Poremba et al., 1991). Порівняно з деякими катіонними та аніонними синтетичними ПАР (тетрадецилтриметиламоній бромід, цетилтриметиламоній хлорид, додецилсульфат натрію) біоПАР виявляють значно нижчу гемолітичну активність до еритроцитів людини (Shin et al., 2005; Mędrzycka et al., 2009). БіоПАР штаму *Candida sphaerica* UCP 0995 не виявляли токсичності щодо насіння *Brassica oleracea*, *Chicoria intybus* та *Solanum gilo* (Sobrinho et al., 2013). Показано, що цитотоксичність та фітотоксичність біоПАР штаму *Lactobacillus helveticus* MRTL91 була нижчою, ніж в додецилсульфату натрію (Sharma et al., 2014). Через нижчу токсичність біоПАР безпечніші для живих організмів, ніж синтетичні поверхнево-активні речовини (Rebello et al., 2014).

Таким чином, біоПАР вважаються дуже перспективними біотехнологічними продуктами. Застосування біосурфактантів на заміну синтетичних ПАР

дозволить забезпечити високий рівень специфічності, а також ефективність у багатьох сферах промисловості та сільського господарства (Banat et al, 2010; Akbari et al, 2018).

1.2. Застосування біоПАР

На сьогодні ПАР широко використовуються у всіх сферах народного господарства та у побуті. Їх світове виробництво становить 2-3 кг на душу населення в рік (Зелена хвиля), а ринок характеризується постійним зростанням: з 43,7 млн. USD у 2017 р. до прогнозованих 66,4 млн USD у 2025 р.(Allied Market research). Проте, більшість ПАР мають негативний вплив на довкілля. Молекули ПАР не розкладаються, а накопичуються на різних поверхнях, поширюються течією чи вітром на значні відстані, таким чином потрапляючи у воду, на рослини, а згодом і в людські організми (Ivanković & Hrenović, 2010). Біосурфактанти, на відміну від синтетичних, є екологічно безпечними, біодеградабельними й низькотоксичними, тому можуть стати альтернативою для сучасної економіки (Mulligan et al., 2014; Mir et al., 2017; Liu et al., 2019). Проте, незважаючи на переваги біосурфактантів натепер частка препаратів на їх основі на світовому ринку становить лише 2,5% від загального виробництва ПАР (Mordor Intelligence). Це обумовлено невисокою продуктивністю мікроорганізмів щодо біоПАР та високою вартістю процесів виділення та очищення продуктів (Banat et al., 2010; Franzetti et al., 2010). Тому актуальною проблемою науки є розроблення конкурентноздатного виробництва біогенних ПАР (Jahan et al., 2010).

Сільське господарство. Є кілька перспективних напрямів для застосування біоПАР у аргпромишловості:

1. Покращення якості ґрунту. Показано, що біоПАР відіграють велику роль у біоремедіації вуглеводнів, прискоренні біодеградації пестицидів, детоксикації або видаленні важких металів і в технологіях промивання ґрунтів (Sachdev & Cameotra, 2013; Liu et al., 2018; Singh et al., 2018).

2. Біоконтроль фітопатогенів та імуностимулюючий вплив на рослини. БіоПАР володіють антибактеріальною, фунгіцидною та інсектицидною активністю щодо збудників хвороб рослин (Mulligan, 2005; Kim et al., 2010; Sachdev & Cameotra, 2013). У США запатентовано препарати на основі біоПАР та способи їх застосування для боротьби із шкідниками (Awada et al., 2011). БіоПАР бактерій *Pseudomonas fluorescens* виявилися ефективними проти грибів-фітопатогенів *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* і *Phytophthora cryptogea* (Nielsen et al., 2003; Hultberg et al., 2008). Parthipan та ін. (2018) повідомили, що біосурфактанти бактерій *Bacillus subtilis* A1 та *Pseudomonas stutzeri* NA3 гальмують розвиток молодих і зменшують довговічність та плодючість дорослих особин комарів *Anopheles stephensi*. Таким чином, біоПАР є ефективними у боротьбі із збудниками різних захворювань.

3. Підсилення взаємодії між рослиною та ризосферними бактеріями. Важливим фактором такої симбіотичної взаємодії є продукування ПАР ризосферними бактеріями (D'aes et al., 2010). Ці мікроорганізми живляться рослинними ексудатами, водночас сприяючи росту рослин за рахунок індукції захисних механізмів проти фітопатогенів та синтезу ряду корисних сполук, зокрема, біосурфактантів. БіоПАР підвищують біодоступність поживних речовин і знижують фітотоксичність важких металів та інших поллютантів. Також служать джерелом вуглецю для ризобактерій, підтримують ефективний розподіл металів та мікроелементів у ґрунті, підвищують доступність та поглинання поживних речовин рослинами, і як наслідок, сприяють росту рослин (Sachdev & Cameotra, 2013; Singh et al., 2018). Показано, що трегалозоліпіди у складі бактеріальних препаратів *S. meliloti* LH11 стимулюють формування симбіозу бактерій роду *Rhizobium* з люцерною (Ozawa et al., 1992).

4. Стимулювання росту рослин. Цей напрямок використання біоПАР у агропромисловості є результатом описаних вище властивостей. Проведено ряд експериментів в лабораторних та польових умовах, які підтверджують що біоПАР покращують енергію проростання та схожість насіння, стимулюють

ріст та розвиток рослин і підвищують урожайність сільськогосподарських культур (Щеглова та ін., 2015; Kumar and Dubey, 2016; Wu et al., 2018).

5. Заміна синтетичних ПАР біогенними при виробництві агропрепаратів (зокрема, пестицидів) (Sachdev & Cameotra, 2013).

Загалом, значна кількість галузей промисловості та сільського господарства, в яких біоПАР знаходять застосування, свідчить про те, що вони цілком можуть замінити синтетичні поверхнево-активні речовини в найближчому майбутньому.

Біоремедіація. У технологіях ремедіації широке застосування знаходять біосурфактанти (Szułczyńska, 2017). Спосіб дії біоПАР в очистці як від органічних поллютантів, так і від важких металів схожий: збільшити розчинність забруднюючих речовин, для полегшення їх видалення шляхом біодеградації або промивання. Завдяки своїм емульгувальним властивостям біоПАР утворюють міцели з забруднюючими речовинами, збільшують їх розчинність і рухливість, таким чином підвищуючи біодоступність вуглеводнів для мікроорганізмів та прискорюючи біодеградацію забруднень (Mahjoubi et al, 2018) Щодо мікроорганізмів (особливо бактерій), біосурфактанти також підвищують індекс піноцитозу вуглеводнів (Patel et al., 2019). Видалення важких металів за допомогою біоПАР ґрунтується на основі механізмів сорбції, десорбції та комплексоутворення (Mulligan et al., 1999).

Паливна промисловість. Біогенні ПАР знаходять широке застосування в нафтовій промисловості. Результати експериментів показують, що вони є перспективними на всіх етапах переробки, транспортування та зберігання сирої нафти. Зокрема, біосурфактанти застосовуються у складі емульгуючих/демульгуючих препаратів, антикорозійних речовин, біоцидів та в інших інноваційних підходах (Almeida et al., 2016). Також їх використовують для очищення забруднених нафтою цистерн, обладнання, інструментів та для полегшення транспортування нафти трубопроводами (Mazaheri-Assadi et al, 2010). У США запатентовано застосування композицій на основі біоПАР або мікроорганізмів, що їх продукують, для зменшення кількості сірководню та

меркаптанів у нафті, природному газі, а також для зниження індукованої мікробами корозії в супутньому обладнанні (Farmer et al., 2020).

Процес десульфуризації вугілля і нафти має на меті знизити викиди сірки, спричинені горінням палива, і відповідно, уникнути пов'язаних з цим проблем, таких як кислотні дощі, негативний вплив на здоров'я людини та ін. Методи, які застосовують на даний час, потребують підвищення ефективності. Кілька груп вчених дослідили потенціал різних видів родококів при десульфуризації викопного палива. Показано, що родококи здатні руйнувати зв'язки вуглець-сірка, залишаючи при цьому цілісними зв'язки вуглець-вуглець. Ця селективність є унікальною для родококів (Bell et al. 1998). Досліджено, що штам *R. erythropolis* IGTS8 здатний вивільняти неорганічну сірку. При чому при такому способі десульфуризації, паливо залишається теплотворним, що пояснюється вивільненням сірки без деградації ароматичного кільця вуглеводів (Carvalho & Fonseca, 2005).

Медична / фармацевтична сфера. В умовах низького обсягу виробництва експериментальні дані довели, що біоПАР можуть використовуватися в медичній / фармацевтичній сфері (Gharaei-Fathabad, 2011 Delegan), зокрема, як протимікробні (Zhao et al., 2010; Abdel-Megeed et al., 2011; Sha et al., 2011), противірусні (Singh et al., 2004; Akbari et al., 2018), протипухлинні (Pasiar et al., 2016; Yüewen et al., 2017), протиадгезивні препарати (Rodrigues et al., 2006; Bucci et al., 2018; Janek et al., 2018), як імунологічні ад'юванти (Al-wazni et al., 2016), імуномодулятори (Kuzyukina et al., 2020; Sajid et al., 2020) і як агенти доставки генів (Maitani et al., 2006; Sil et al., 2017). Зокрема, встановлено, ефективність щодо ракових клітин та механізм протипухлинної дії трегалозоліпідів *Rhodococcus wratislaviensis* BN38 (Nikolova et al., 2020). Використання біосурфактантів у системах зворотних міцел для відновлення антибіотиків, ферментів та білків (Chuo et al., 2018) є відносно новим, але демонструє високу перспективність з потенціалом для масштабного виробництва та безперервного функціонування.

Харчова промисловість. У харчовій промисловості мікробні ПАР можуть використовуватися як харчові емульгатори та стабілізатори (Alizadeh-Sani et al., 2018; Silva et al., 2020), піноутворювачі, адгезивні, змочуючі та протимікробні засоби (Singh et al., 2004).

Текстильна промисловість. БіоПАР пропонують використовувати як засоби для попередньої обробки тканин, розчинення барвників і їх проникнення у тканину (Kilic et al., 2013; Fracchia et al., 2014).

Лакофарбна промисловість. У лакофарбній промисловості біоПАР пропонують використовувати як знежирюючий засіб, як агент диспергатора, піногасника, знежирення, покриття та вирівнювання кольору (Kilic et al., 2013). Біодисперсант, отриманий з *Acinetobacter calcoaceticus* A2, використовували для диспергування 10% вапняку у водяній суміші, а також він запобігав флокуляції (Vanat et al., 2000).

БіоПАР як інгібітори корозії. Органічні інгібітори широко використовуються у різних галузях народного господарства (зокрема, у нафтогазовій промисловості, в енергетиці) для захисту від корозії металоконструкцій, обладнання і рухомих засобів. Переважна більшість цих речовин є синтетичними і не зустрічаються в природі (Kuznetsov, 1996; Brycki et al., 2017). Вони важко утилізуються та є потенціальними забруднювачами біосфери. Тому постійно ведуться пошуки нових інгібіторів корозії, які би вигідно відрізнялись від відомих не тільки вищою ефективністю, але й екологічною безпекою. Мікробні біоПАР мають значні перспективи для вирішення вказаних проблем, проте їх вплив на корозію металів практично не досліджено. Волкленд з колегами показали, що культуральні рідини бактерій *Rhodococcus* sp. C125, *Pseudomonas putida* mt2 та *Streptomyces pilosus* DSM 40714 можуть створювати умови для інгібування корозії вуглецевої сталі (Volkland et al., 2000). При вивченні інгібування корозії сталеві арматури залізобетону ліпopeптидами показано, що досліджувані біоПАР є інгібіторами змішаного типу і сповільнюють швидкість обох електродних реакцій електрохімічної корозії вуглецевої сталі (Shubina et al., 2016). У США

zareєстровано патент на метод використання біосурфактантів, в тому числі трегалозоліпідів, для інгібування кислотної корозії в операціях з очистки нафтових свердловин (Gunawan et al., 2016). Похмурський та ін. показали, що рамноліпідні ПАР та СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 інгібують корозію алюмінієвого сплаву у 0,1% розчині натрій хлориду (Pokhmurs'kyi et al., 2014). Зроблено припущення, що механізм інгібування корозії полягає в адсорбції молекул цих біоПАР на поверхні алюмінієвого сплаву з наступним утворенням бар'єрної плівки. Вказаний інгібітор є також ефективним і на свіжоутвореній поверхні алюмінієвого сплаву (Zin' et al., 2016).

1.3. Бактерії роду *Rhodococcus*

Рід *Rhodococcus* охоплює групу грампозитивних, аеробних, нерухливих, міколовмісних актиноміцетів (Bell et al. 1998). Морфологічною особливістю клітин родококів є плеоморфізм та трьохстадійний цикл розвитку. У всіх штамів морфогенетичний цикл починається зі стадії коків або коротких паличок, які в подальшому можуть утворювати нитки з боковими виростами або сильно розгалужені гіфи. Такий первинний міцелій легко розпадається на палички і коки (Holt et al., 1997). Ці бактерії не утворюють спор за несприятливих умов, хоча в склад клітинної стінки входять міколові кислоти, які, ймовірно, є важливим чинником для виживання бактерій при жорстких умовах навколишнього середовища. Завдяки особливості будови клітинної стінки родококам притаманна стійкість до висушування й голодування, екстремальних значень рН, концентрації солей, токсичних речовин, механічного та ультразвукового руйнування (Осипенко и др., 2010).

Родококи, як правило, утворюють гладкі, шороховаті або мукоїдні колонії забарвлені від світлорожевого, кремового до оранжевого та червоного кольорів, хоча зустрічаються й безбарвні варіанти (Holt et al., 1997).

Родококи вважаються ґрунтовими бактеріями, хоча ці мікроорганізми були виділені з різних джерел, що охоплюють ґрунти, підземні води, комах, рослин

та тварин (Bell et al. 1998). Вони були знайдені як у глибоководних, так і прибережних зонах від Арктики до Антарктики (Carvalho & Fonesca, 2005). Проте, *R. equi* і *R. fascians*, також можуть бути патогенними, відповідно, у тварин і рослин. Так, *R. fascians* здатний інфікувати тютюн, горох польовий, декоративні рослини, тощо, що призводить до вад розвитку і затримки росту рослин (Cornelis et al., 2001). *R. equi* часто є причиною пневмонії у лошах або інших сільськогосподарських тварин за умови імунодефіциту (Meijer & Prescott, 2004). Для більшості видів родококів оптимальною температурою для росту є 30°C, хоча для патогена *Rhodococcus equi* – 37°C.

Родококи здатні трансформувати або деградувати широкий спектр хімічних речовин навколишнього середовища, в тому числі і полютантів (Singh, 2007; Stancu, 2015). Також ці бактерії синтезують ряд продуктів, включаючи поверхнево-активні речовини, ферменти, сидерофори і полімери, що підвищує їх потенціал в біотехнології (Bell et al. 1998). Таким чином, бактерії роду *Rhodococcus* є перспективними для практичного використання в промисловості, сільському господарстві та охороні навколишнього середовища.

1.4. Трегалозоліпідні ПАР бактерій роду *Rhodococcus*

Структура трегалозоліпідів бактерій роду *Rhodococcus* та шляхи їх синтезу. БіоПАР, які синтезують бактерії роду *Rhodococcus*, відносять, в основному, до гліколіпідів, а саме, трегалозоліпідів (Пирог та Конон, 2014а). До складу цих сполук входить α , α' -D-трегалоза, зв'язана естерним зв'язком із довголанцюговими жирними кислотами, які належать до α -розгалужених- β -гідроксикислот (міколових кислот) (Franzetti et al, 2010). Kretschmer та ін. (1982) дослідили структуру біосурфактантів штаму *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215 та виявили, що до їхнього складу входять трегалозо-6-монокоріноміколат, трегалозо-6,6'-диацилат (3-оксо-2-алкіл алканової кислоти) і трегалозо-6-ацилат. Інша група дослідників встановила, що один із трегалозоліпідів штаму *Rhodococcus* sp. SD-74 є 3,4-ди-*O*-алканоіл-2-*O*-

сукциноіл- α -D-глюкопіранозил-2'-сукциноіл - α -D-глюкопіранозид трегалози (Tokumoto et al., 2009). Структурні формули деяких трегалозоліпідів, які синтезують бактерії роду *Rhodococcus* представлено на рис. 1.1.

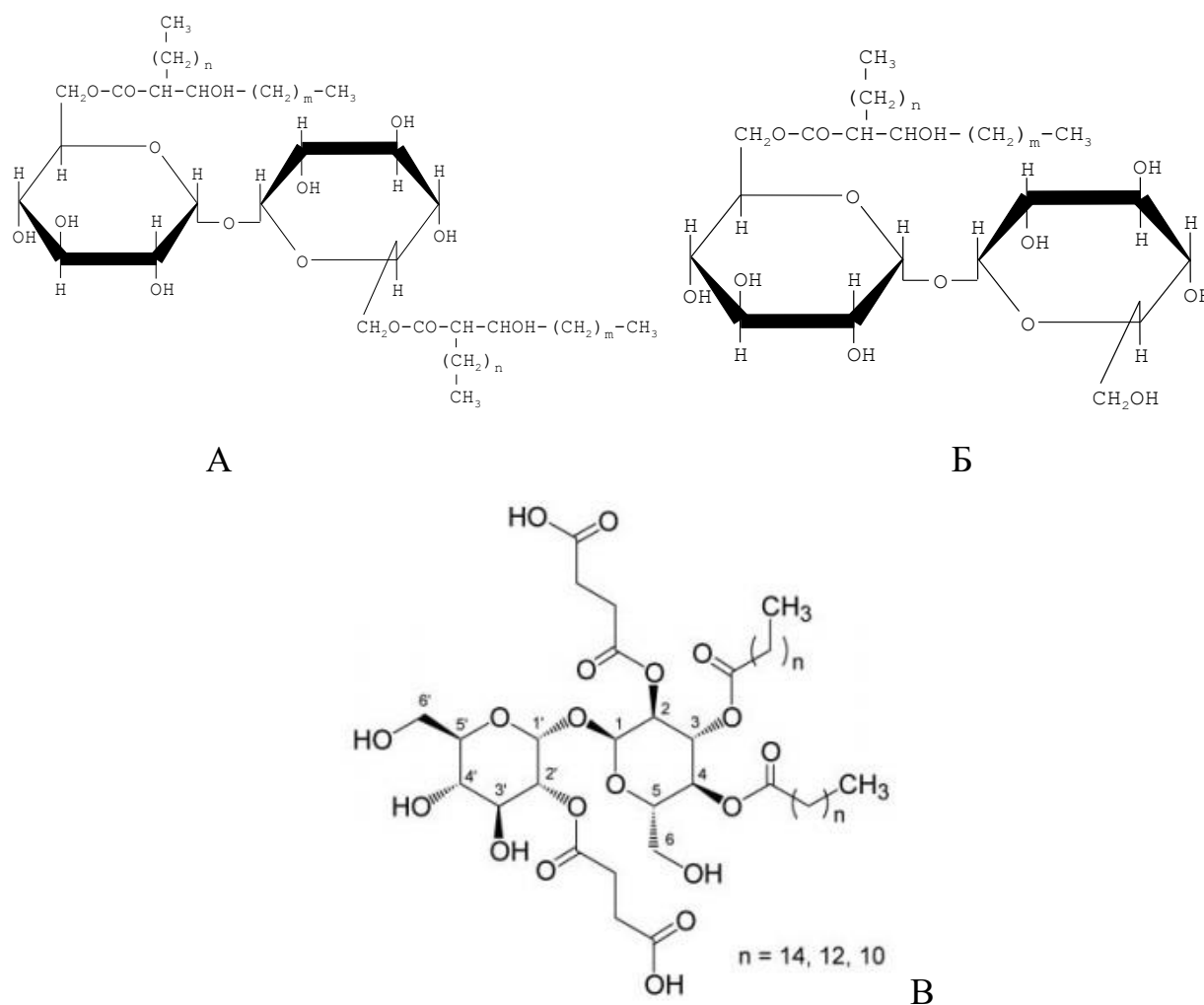


Рис. 1.1. Структурні формули деяких трегалозоліпідів, де А – 6,6'-трегалозодиміколат; Б – 6-трегалозомономіколат; $m+n=27-31$ (Rapp et al., 1979); В – сукциноіл трегалозоліпід (Tokumoto et al., 2009).

Біосинтез трегалозоліпідів проходить через утворення міколату шляхом конденсації двох жирних кислот. Синтез трегалозо-6-фосфату каталізується трегалозо-6-фосфатсинтетазою. У цьому процесі УДФ-глюкоза і глюкозо-6-фосфат діють як попередники (прекурсори). Алкани є індукторами синтезу трегалозоміколатів з трегалозо-6-фосфату. Kretschmer та Wagner (1983) запропонували такий шлях біосинтезу трегалозоліпідів (рис.1.2).

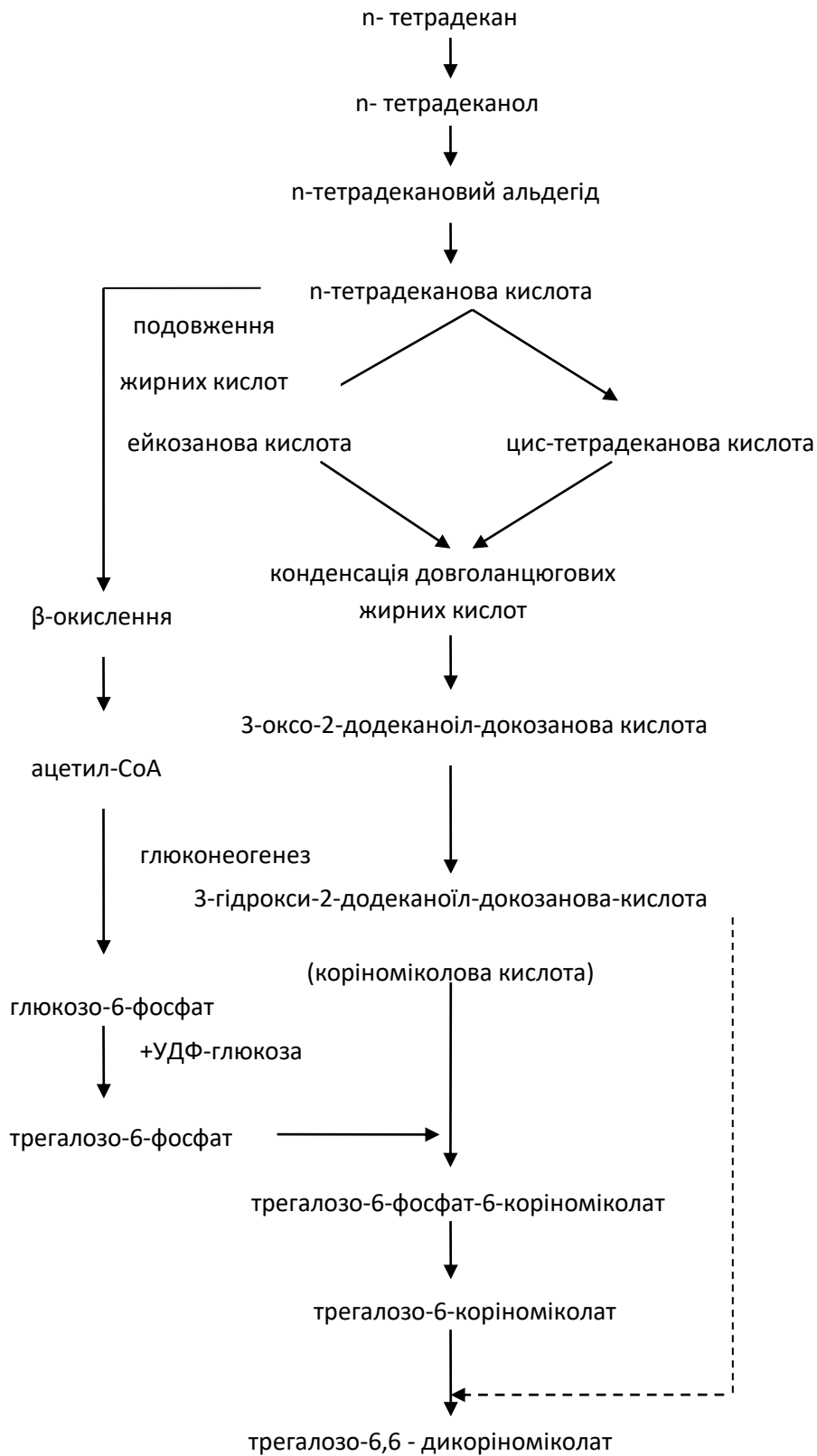


Рис. 1.2. Схема біосинтезу трегалозо- моно- і дикоріноміколату у *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215 із тетрадекану (Kretschmer & Wagner, 1983).

Детальний аналіз генів, що кодують синтез сукциноіл трегалозоліпідів штаму *Rhodococcus* sp. SD-74, дозволили встановити новий шлях біосинтезу трегалозоліпідів (рис.1.3). На основі отриманих даних вдалося вперше за допомогою генетичних мутацій підвищити синтез трегалозоліпідів (Inaba et al., 2013).

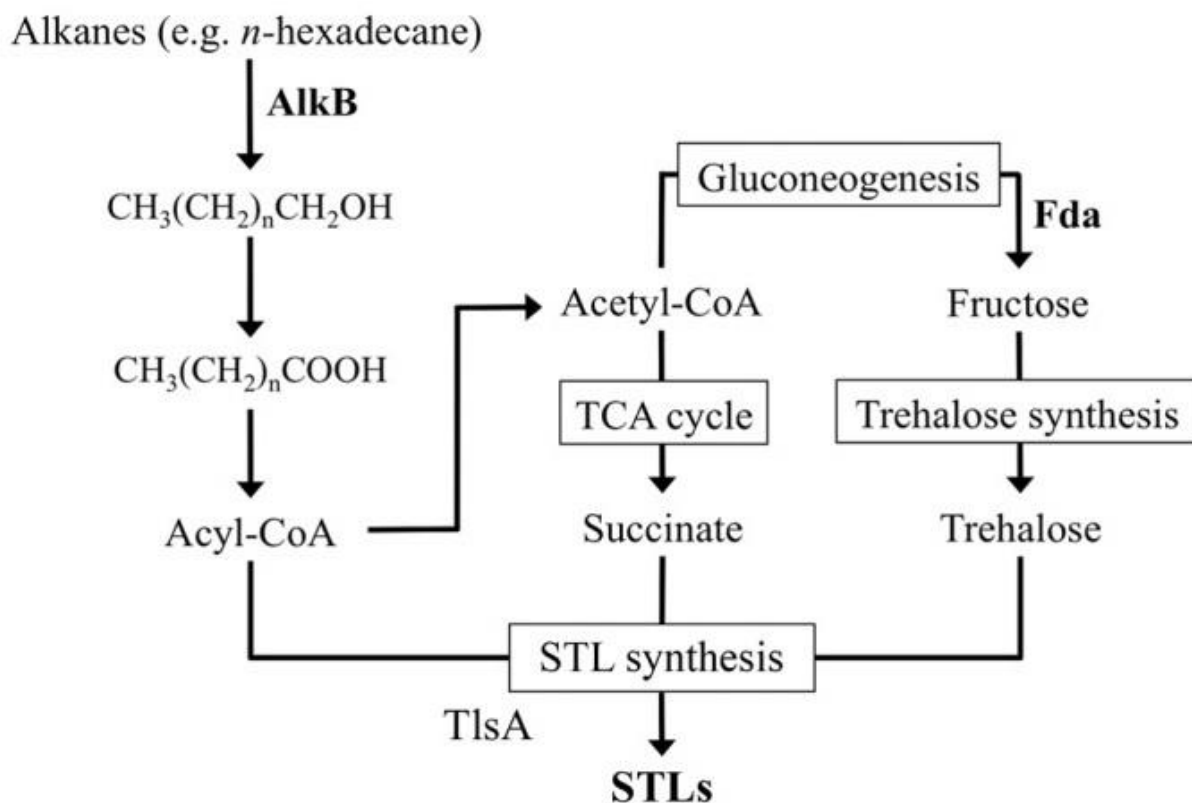


Рис.1.3. Схема біосинтезу сукциноіл трегалозоліпідів штаму штаму *Rhodococcus* sp. SD-74 (Inaba et al., 2013): STLs – сукциноіл трегалозоліпід, TCA (tricarboxylic acid) cycle – цикл карбонових кислот, Acyl-CoA – ацил-коензим А, AlkB – алкан монооксигеназа, Fda – фруктозо-біфосфат альдолаза, TlsA – трансфераза.

Jana та ін (2017) повідомили, що вперше було проведено синтез гліколіпідів, а саме сукциноіл трегалозоліпідів (рис.1.4). ТПАР були отримані з трегалози на 11–12 стадіях синтезу протягом 8–10 днів. Загальний вихід становив 11–12% (Jana et al., 2017).

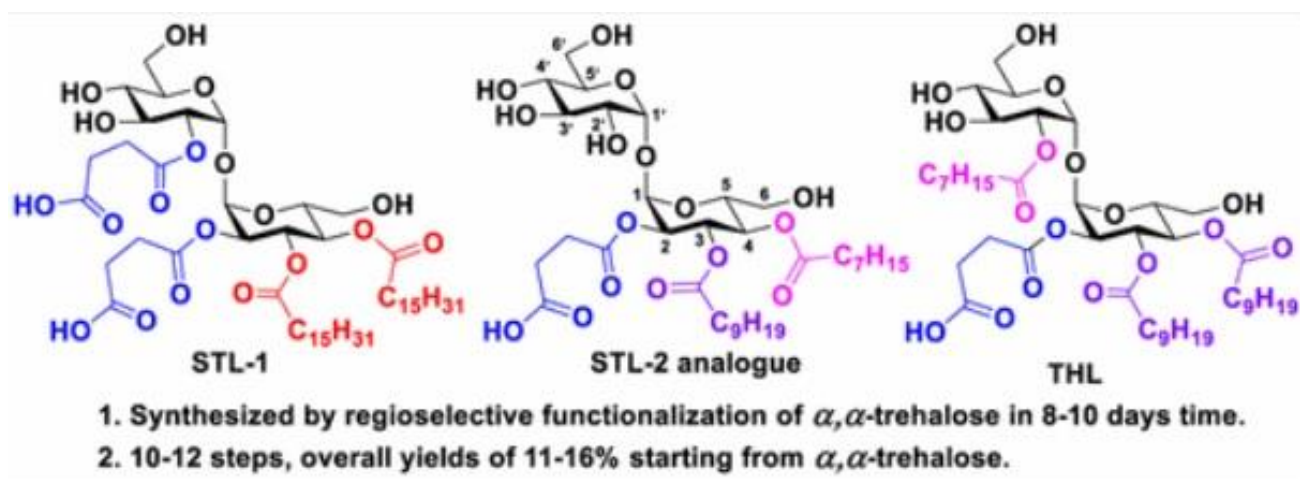


Рисунок 1.4. Хімічний синтез сукциноїл трегалозоліпідів з трегалози (Jana et al. 2017).

Вибір джерел вуглецю для синтезу ТПАР. Бактерії роду *Rhodococcus* здатні деградувати широкий спектр хімічних речовин, проте для синтезу біосурфактантів, як правило, використовують водонерозчинні сполуки.

Штам *R. erythropolis* DSM 43215 при культивуванні на поживному середовищі з н-алканами (C_{12} - C_{18}) синтезував до $2,1 \text{ г/дм}^3$ трегалозоліпідних ПАР (Krechmer & Wagner, 1983; Rapp et al., 1977). Під час вирощування штаму *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з н-гексадеканом кількість синтезованих ПАР була у 4 рази вищою у порівнянні з етанолом, а внесення прекурсорів – фумарату (0,2 %) і цитрату (0,1 %) підвищувало синтез ТПАР у 1,3 - 1,6 рази (Пирог та ін., 2010). Під час росту штаму *Rhodococcus* sp. Х5 на н-гексадекані встановлено, що основними позаклітинними біосурфактантами є сукциноїлтетраефіри трегалози. Ці біоПАР володіли низьким значенням поверхневого натягу (27 мН/м), а критична концентрація міцелоутворення становила $4,1 \cdot 10^{-5} \text{ моль/дм}^3$ (Льонг и др., 2017). Іншою групою вчених досліджувалися біоПАР бактерій штаму *R. qingshengii* FF (Wang et al., 2019): вихід біосурфактантів на сечовині та суміші н-гексадекану і олеїнової кислоти (m:m = 1:1) становив $7,97 \text{ г/дм}^3$, а синтезовані ПАР були ідентифіковані як суміш триестерів та тетраестерів трегалози.

Актуальним питанням є використання відходів промисловості для культивування продуцентів ПАР. Зокрема, показано можливість застосування крохмалевмісних, лігніноцелюлозних субстратів, відходів цукрової, молочної, олійножирової промисловості, олій після смаження тощо (Makkar et al., 2011; Пирог та ін., 2014b). Встановлено, що штам *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 ефективно синтезує ПАР при рості на середовищах із парафінами, олієвмісними субстратами, мелясою, технічним гліцерином (Пирог та ін., 2014b). Досліджена здатність штаму асимілювати ароматичні сполуки (фенол, нафталін, толуол, гексахлорбензол, бензойна і N-фенілантранінова кислота) із одночасним синтезом позаклітинних метаболітів з поверхнево-активними властивостями (Пирог и др., 2017).

Вибір раціонального вуглецевого субстрату для культивування штаму – продуцента ПАР є важливою складовою вартості цільового продукту та впливає на вихід, склад та властивості отриманих ТПАР.

Виділення та очищення ТПАР. Процеси виділення та очистки цільових продуктів, як правило, становлять до 50-80% від загальної собівартості виробництва (Okoliegbe & Agarry, 2012). Важливим питанням є чистота біосурфактантів, оскільки вартість цільових продуктів можна суттєво знизити, якщо замість очищених трегалозоліпідів використовувати малоочищені трегалозоліпідні ПАР або супернатант культуральної рідини, який є найбільш технологічно та економічно доступним. Отже, залежно від сфери застосування вартість і форма цільових продуктів буде відрізнятись.

Відомо, що трегалозоліпідні ПАР – метаболіти бактерій, як правило, є клітинно-зв'язаними. Тільки невелика кількість продуцентів здатна до синтезу ТПАР у СКР (позаклітинні ТПАР), проте їм не приділяють належної уваги через високу вартість процесу виділення та низький вихід продукту.

Найбільш поширеним методом отримання ТПАР є відділення біомаси з подальшою екстракцією біосурфактантів. Як правило, як екстрагент використовують суміш Фолча (хлороформ-метанол 2:1) (Rapp et al., 1979; Smyth et al., 2010). Також високу ефективність показали метил-трет-бутиловий

ефір (МТБЕ) (Kuyukina et al., 2001) та суміш хлороформ-ізопропанол 2:1 (Пристай, 2012). Ультразвукова обробка екстракційної суміші підвищувала вміст полярних ліпідів у складі ТПАР, в результаті чого покращувались поверхнево-активні властивості (Kujukina et al., 2001). Методом екстракції отримують сирий екстракт трегалозоліпідних ПАР. Для застосування в галузях з вимогами високої чистоти (медична, косметологія, фармація, тощо), отримані ТПАР необхідно очистити методом колонкової хроматографії (Smyth et al., 2010).

Позаклітинні сукциноіл трегалозоліпіди, які синтезуються бактеріями *Rhodococcus*, виділяють наступним чином: 1) центрифугування культуральної рідини; 2) підкислення СКР до рН 3, в результаті чого сукциноіл трегалозоліпіди у всьому об'ємі СКР набувають гелеподібного вигляду; 3) повторне центрифугування з подальшою екстракцією ТПАР етилацетатом; 4) отримані сукциноіл трегалозоліпідні ПАР перерозчиняють у суміші хлороформ-метанол 1:1 та очищають на силікагелі методом колонкової хроматографії (Tokumoto et al., 2009).

Для кількісного визначення ТПАР, як правило, застосовують гравіметричний метод. Проте Patil та Pratar (2018) розробили простий та ефективний метод рідинної хроматографії для ідентифікації та кількісного визначення трегалозоліпідів. Він ґрунтується на використанні колонки з рухомою фазою вода/ацетонітрил (80:20) при швидкості потоку $1 \text{ см}^3/\text{хв}$ та УФ-детектуванні при 208 нм. Цей метод дозволяє виявляти мінімум $3,2 \text{ мкг}/\text{см}^3$ і кількісно визначати мінімум $9,2 \text{ мкг}/\text{см}^3$ трегалозоліпідів. Стандарти для методу були розроблені з використанням культуральної рідини *R. erythropolis* та очищеного трегалозо-6,6'-диміколату бактерій *Mycobacterium bovis*, що має такий же час утримування – 2,0 хв.

Таким чином, розроблення раціональних методів виділення біосурфактантів є важливим фактором впровадження промислового виробництва трегалозоліпідних ПАР.

1.5. Синтез інших практично цінних метаболітів бактеріями роду *Rhodococcus*

Полісахариди відіграють важливу роль у здатності бактерій роду *Rhodococcus* деградувати широкий спектр різних речовин, зокрема вуглеводнів. За допомогою ЯМР спектроскопії досліджено склад полісахаридного комплексу, який синтезується штамом *R. erythropolis* PR4. Визначено, що до його складу входять D-галактоза, D-глюкоза, D-маноза, D-глюкуронова кислота та піровиноградна кислота при мольному співвідношенні 1:1:1:1:1, а також 2,9% (мас./мас.) стеаринової кислоти та 4,3% (мас./мас.) пальмітинової кислоти, які приєднані ефірними зв'язками, рис.1.5 (Urai et al., 2007a).

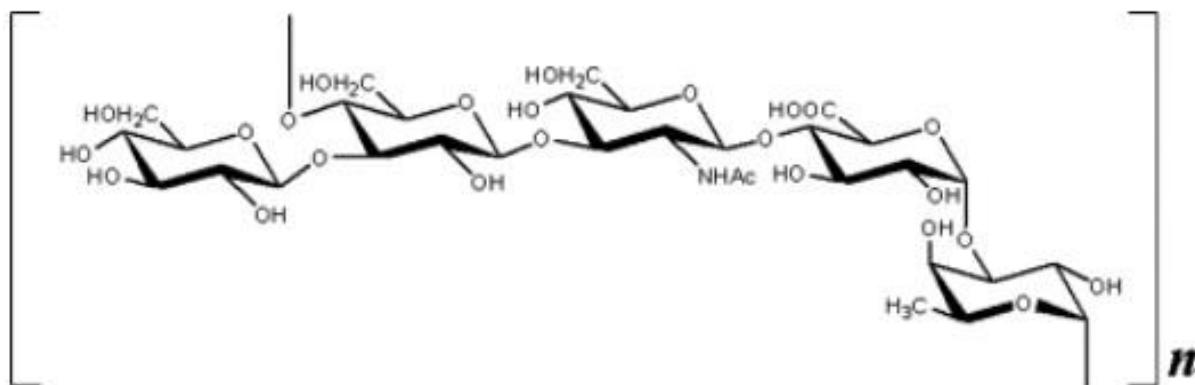


Рис. 1.5. Будова екзополісахаридного комплексу штаму *R. erythropolis* PR4 (Urai та ін., 2007b), Ас – кислота.

У бактерій штаму *R. rhodochrous* S-2 виділено екзополісахарид, до складу якого входять D-галактоза, D-маноза, D-глюкоза, and D-глюкуронова кислота в мольному співвідношенні 1:1:1:1. Визначено також незначні домішки октадеканової (0,8% мас.) і гексадеканової кислот (2,7% мас.) (Urai et al., 2006).

Екзополісахариди володіють емульгувальною активністю, низько токсичні та біодеградабельні. Вони знаходять своє застосування у харчовій (як емульгатори, загущувачі, стабілізатори), фармацевтичній (як протипухлинні, антиоксидантні препарати (Hu et al., 2020), лакофарбній (як емульгатори (Mishra & Jha, 2013) промисловостях, для біоремедіації (Casillo et al, 2018), у

сільському господарстві (для покращення властивостей ґрунту, підвищення посухо- і хворобостійкості рослин та їх урожайності (Shraddha et al., 2017).

Таким чином, екзополісахариди бактерій роду *Rhodococcus* становлять значний інтерес для біотехнології.

Полігідроксиалканоати накопичуються всередині клітин бактерій, особливо при рості їх на незбалансованих середовищах, і є необхідними для акумуляції енергії клітинами (Гудзь та ін., 2014; Sudesh et al., 2000). ПГА – це біополімер, що складається з 600 до 35000 мономерних одиниць гідроксиалканової та 4-гідроксиалканової кислот (Shah et al. 2008). Кожна мономерна одиниця містить групу бічних ланцюгів R, які зазвичай являють собою насичену алкільну групу (рис.1.6) (Khanna & Srivastava, 2005).

<i>R</i> group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C ₄	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C ₅	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C ₆	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C ₇	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C ₈	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C ₉	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C ₁₀	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C ₁₁	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C ₁₂	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C ₁₃	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C ₁₄	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C ₁₅	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C ₁₆	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

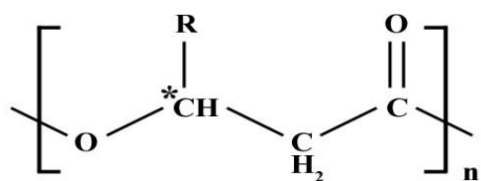


Рис. 1.6. Хімічна структура полігідроксиалканоатів (Khanna & Srivastava, 2005).

ПГА є нерозчинними у воді, відносно стійкими до гідролітичної деградації, володіють низькою токсичністю, біосумісністю та біодеградабельністю (Bugnicourt et al., 2014). Завдяки цим властивостям вони мають широке коло потенційних застосувань (Volova et al., 2003; Braunegg et al., 2004). Показано, що їх доцільно використовувати у медицині як імплантати, нитки для перев'язування та зашивання ран (Chen and Wu, 2005), носії лікарських засобів (Shishatskaya et al., 2008; Chen & Wu, 2005); у косметології – як косметичні плівки (Sudesh et al., 2007); у сільському господарстві – як біодеградабельні плівки у тепличних господарствах, для інкапсуляції насіння та

добрив (Verlinden et al., 2007; Yogesh et al., 2012); у харчовій промисловості – як пакувальний матеріал (Bugnicourt et al., 2014).

Відомо, що бактерії роду *Rhodococcus* мають здатність продукувати ПГА (Lu et al., 2009), зокрема полігідроксибутирати (ПГБ). Відомо, що до синтезу ПГБ здатні *R. fascians*, *R. erythropolis* і *R. opacus* (Alvarez et al., 1997; Fuchtenbusch & Steinbuchel, 1999; Castro et al., 2016), *R. rubber* (Williams et al., 1994), *R. equi* (Altaee et al., 2016). Молекулярна маса ПГБ відрізняється в залежності від організму, умов росту продуцента і способу вилучення, і може варіювати від 50 000 до мільйона. Цей полімер має відносну температуру плавлення 170-180°C і температуру склування 0-5°C (Ha & Cho, 2002), здатний до біодеградації (Dawes, 1988).

Оскільки полігідроксиалканоати є перспективними біодеградабельними полімерами, вони належать до практично цінних метаболітів бактерій роду *Rhodococcus*.

Фітогормони. Різні види бактерій здатні до синтезу фітогормонів. Як правило, це мікроорганізми-фітопатогени, які продукують ці сполуки для порушення гормонального балансу рослин з метою полегшення колонізації можливих господарів. Зокрема, *R. fascians* синтезує цитокініни (Radhika et al., 2015; Jameson et al., 2019). Фітогормони є невід’ємною складовою взаємодії між рослинами і асоційованими з ними мікроорганізмами. Так, наприклад, *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* продукують цитокініни, а більшість представників роду *Rhizobium* синтезують ауксин – індолілоцтову кислоту (Glick, 2012). Досліджуючи біосинтетичні властивості бактерій ряду *Actinomycetales*, Тістечок та ін. встановили, що серед 108 штамів 17,8% продукували індоліл-3-оцтову кислоту (Тістечок та ін., 2019). Також є дані про синтез фітогормонів: ауксинів, цитокінінів, абсцизової кислоти штамми *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 и *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 (Пирог и др., 2016).

Висновки до розділу 1

Беручи до уваги наведені вище дані, бактерії роду *Rhodococcus* мають значні перспективи для широкого застосування у промисловості та сільському господарстві. В першу чергу, завдяки мультифункціональним продуктам їхнього синтезу, а також завдяки унікальній метаболічній активності – здатності деградувати чи трансформувати хімічні речовини різної природи. Проте, обмежувачим фактором для широкого використання метаболітів бактерій роду *Rhodococcus* є висока їхня вартість. Однак цей недолік можна компенсувати тим, що препарати, зокрема, біоПАР, є ефективними за низьких концентрацій, а також потреби значної частини промисловості можна забезпечити, використовуючи неочищені препарати.

Застосування біоПАР у рослинництві ще не вивчено на належному рівні, а використання їх як інгібіторів корозії пропонується чи не вперше. До того ж пріоритетна увага в галузях промисловості та сільського господарства приділяється рамноліпідам. Таким чином, вивчення біотехнології трегалозоліпідних ПАР, дослідження їх властивостей та перспектив застосування, зокрема у рослинництві чи для антикорозійного захисту металів, є дійсно актуальним завданням.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти досліджень

У роботі використано актинобактерії *Rhodococcus erythropolis*, фітопатогенні бактерії (*Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*) з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології (ІМВ) ім. Д.К. Заболотного НАН України; фітопатогенні гриби (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia cerealis*) – з ДП «Ензим». У роботі досліджували рослини – пшеницю озиму (*T. aestivum* L.) сорту Золотоколоса та сою (*Glycine max var slavonica* Kov. et Pinz) сорту Іванка; використовували препарати фітогормонів – ауксини (індоліл-3-оцтова кислота), магнітні багат шарові композити типу «ядро-оболонка» (надалі – композити) на основі оксидів перехідних металів, синтезовані у Відділі ХОП Відділення ФХГК ІнФОВ, а також біоциди – етилтіосульфанілат (ЕТС) й алілтіосульфанілат (АТС), синтезовані на кафедрі ТБСФБ НУ «Львівська політехніка».

2.2. Мікробіологічні методи

Умови культивування бактерій. Культивування бактерій родів *Rhodococcus* та *Gordonia* здійснювали на рідкому поживному середовищі Гудвіна (Донец, 1970) в нашій модифікації, (г/дм³): NaNO₃ – 3,0; K₂HPO₄ – 2,0; KH₂PO₄ – 2,0; MgSO₄×7H₂O – 0,5; Na₃C₆H₅O₇×2H₂O – 1,0; дріжджовий екстракт – 1,0; джерело вуглецю – 20,0; дистильована вода – до 1 дм³. Культивування проводили у колбах Ерленмейєра (0,75 дм³) зі 0,15 дм³ поживного середовища на качалці (220 об/хв) за температури 30°C.

Як джерела вуглецю використовували (в еквімолярних за вуглецем концентраціях, 17 г/дм³): гексадекан, тетрадекан, сахарозу, гліцерин, вазелінову

оливу, відходи промисловості (ріпаковий і соєвий фосфатидні концентрати (ФК), соняшниковий та оливковий фузи, відпрацьовану (пересмажену) соняшкову олію, технічний гліцерин). При вивченні впливу природи джерела азоту на синтез ПАР було застосовано: NaNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, пептон, дріжджовий екстракт в еквімолярних за азотом концентраціях ($\text{N}=0,49$ г/дм³).

Як інокулянт використовували 48-год культуру, вирощену на середовищі Гудвіна із сахарозою (30 г/дм³). Посівний матеріал брали в кількості 10% від об'єму поживного середовища, титр клітин становив 5×10^8 КУО/см³.

Умови культивування штаму у лабораторному ферментері. Культивування штаму проводили в лабораторному скляному ферментері об'ємом 5 дм³ (SIMAX, Czech Republic) на відповідному поживному середовищі. Стерилізацію ферментера проводили разом з поживним середовищем впродовж 40 хв. за температури 132°C. Коефіцієнт заповнення становив 0,8. У процесі ферментації контролювали рН середовища, температуру, концентрацію розчиненого кисню в культуральній рідині. Значення цих параметрів визначали за допомогою відповідних електродів автоматичним аналізатором "Експерт-001-4.0.1"(ООО "Эконикс-Эксперт", Росія) в режимі реального часу. Аерацію середовища здійснювали за допомогою компресора (SERA air550R, "Sera", Germany) в кількості 0,5 м³/м³·хв., що контролювалася лабораторним ротаметром. Концентрацію розчиненого кисню в середовищі підтримували на рівні 20-30% від насичення. Культивування проводили при рН 7, контроль рН здійснювали додаванням 1н НСІ. Температура ферментації (30°C) підтримувалася термостатуванням в оболонці реактора. Перемішування проводили за допомогою двохлопатевої турбінної мішалки з нижнім приводом за швидкості 450-500 об./хв (Пристаї, 2012; Єрохін, 2015).

Визначення біомаси бактерій. Біомасу клітин визначали гравіметричним методом (Герхардт, 1983): культуральну рідину центрифугували при 6000 об/хв впродовж 15 хв. Отриманий осад клітин промивали дистильованою водою,

якщо бактерії вирощували на водорозчинних субстратах, та гексаном для видалення залишкових вуглеводнів та жирних кислот (для водонерозчинних субстратів). Промитий осад клітин сушили за температури 102°C до постійної маси.

Визначення антимікробної активності. Оцінку дії ТПАР на антимікробну активність біоцидів ЕТС та АТС проводили на культурах фітопатогенних бактерій: *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027[†], *Clavibacter michiganensis* УКМ АС-630[†], *Agrobacterium tumefaciens* УКМ В-1000, *Erwinia carotovora* УКМ В-1104 та *Xanthomonas campestris* УКМ В-1049 з Української колекції мікроорганізмів ІМВ НАНУ. Бактерії вирощували на картопляно-глюкозному середовищі (Сеги, 1983). Стерильне поживне середовище вносили у пластикові планшети (Sarstedt, США) з об'ємом лунок 250,0 мкл з додаванням відповідних концентрацій ЕТС, ТПАР та їх композицій. 1-добову тест-культуру мікроорганізмів-фітопатогенів (1×10^9 КУО/см³) у кількості 0,1 см³ вносили в кожну лунку. Тест-культури вирощували протягом 1 доби, 30±2°C (Sotirova et al., 2010). Мінімальна концентрація препарату, яка давала повну видиму затримку росту культури (прозорий бульйон) відповідала МІК даного препарату щодо тестових штамів, що визначало ступінь їх чутливості. Для визначення ступеня бактерицидної дії препарату із останніх прозорих лунок проводили висів на універсальне агаризоване середовище. За МБК дослідних препаратів приймали найменшу їх концентрацію у лунці, висів із якої після інкубації не давав росту на твердому середовищі (Wiegand et al., 2008).

Визначення фунгіцидної активності ТПАР та їхніх композицій з тіосульфонатами щодо тест-культур грибів *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia cerealis* (з колекції мікроорганізмів ДП «Ензим») проводили методом паперових дисків (Сеги, 1983) за зонами затримки росту на агаризованому середовищі Сабуро. Чашки Петрі витримували 12 год в холодильнику для дифузії досліджуваних препаратів у середовище, термостатували 3 доби при 28°C, далі вимірювали зони затримки росту грибів.

2.3. Методи виділення продуктів

СКР отримували після сепарації клітин бактерій шляхом центрифугування (6000 об/хв., 15 хв).

Екстракція клітинно-зв'язаних ліпідів. Біомасу бактерій додатково відмивали гексаном від залишкових гідрофобних джерел вуглицю. Ліпіди отримували шляхом одноразової екстракції з клітинної маси сумішшю Фолча (хлороформ:метанол – 2:1) (Folch et al., 1957) з подальшим випарюванням у вакуумі до постійної маси (з розрахунку на 1г АСБ – 20 мл екстрагенту). Кількість ліпідів визначали гравіметричним методом. Для підбору розчинників для екстракції клітинно-зв'язаних ТПАР використовували етилацетат, етанол, гексан, хлороформ, суміш хлороформ:ізопропанол.

Виділення позаклітинних ТПАР з використанням натрій альгінату. До 50 мл СКР додавали 1 мл 10% розчину NaCl та 10 мл 1,5% водного розчину натрій альгінату, перемішували 10 хв. Підкислювали 10% HCl до рН 2 і залишали на 12 год. Центрифугували осад (6 000 об/хв., 15 хв), з якого екстрагували етанолом ТПАР.

Виділення ТПАР композитними адсорбентами на основі оксидів перехідних металів. Композитні адсорбенти – це багат шарові структури типу «ядро-оболонка», де ядром є синтезований ферит Со з яскраво вираженими магнітними властивостями, покритий для стабілізації шаром SiO₂, на який синтезовано оксиди перехідних металів – CuO, CoO, MnO. До 50 см³ СКР додавали 0,5 г композитів перемішували 10 хв. Отриманий осад відділяли під дією зовнішнього магнітного поля та проводили екстракцію ТПАР етанолом.

Для екстракції ТПАР з постферментаційної культуральної рідини використовували 13 розчинників різної природи: гексан, н-октан, бензол, толуол, 1,2-дихлоретан, хлороформ, тетрахлорметан, т-бутанол, ізобутанол, пентанол-2, етилацетат, н-бутилацетат, діетиловий ефір. БіоПАР виділяли шляхом одноразової екстракції 25 мл культуральної рідини (попередньо підкисленої 10%-им розчином HCl до рН 3.0) відповідним екстрагентом у

кількості 25 мл при струшуванні протягом 2 хв з подальшим випарюванням екстракту у вакуумі (3 мм рт. ст.) до постійної маси. Кількість отриманих біоПАР визначали гравіметричним методом. Отримані результати використовували для розрахунку оптимальних екстрагентів методом лінійних багатопараметрових рівнянь (Makitra R. et al., 2004).

Одержання екзополісахаридного комплексу. Екзополісахаридний комплекс осаджували із супернатанту КР двома об'ємами 96%-ного етанолу, витримували за температури 4°C протягом 12 год. (Williams & Wimpenny, 1977). Осад відділяли центрифугуванням (5000 об/хв, 30 хв) Очистку продукту переосадженням з дистильованої води проводили двічі. Отриманий ЕПК сушили за температури 80°C, його масу визначали гравіметрично.

Виділення полігідроксиалконоатів з біомаси. Відпрацьовані клітини бактерій (після екстракції клітинно-зв'язаних ТПАР) дезінтегрували, використовуючи етанол (100 об/хв, 2 год, 35°C). Центрифугували (15 хв, 6000 об/хв), осад переносили в екстрактор Soxhlet, де проводили екстракцію хлороформом протягом 5 циклів екстракції. Розчинник випаровували під вакуумом до отримання твердого залишку. Для очищення полімер розчиняли в певному об'ємі хлороформу і осаджували його холодним етанолом. Отриманий осад ПГА декантували та сушили до постійної маси (Semeniuk et al., 2020).

2.4. Аналітичні методи

Тонкошарова хроматографія (ТШХ). Для методу ТШХ використовували пластинки Sorbifil ПТСХ-АФ-А-УФ (ЗАО Сорбполимер, Росія).

Якісний аналіз ліпідів проводили у системах розчинників:

- а) хлороформ-метанол-вода 65:15:2 (ліпіди), (Kretschmer & Wagner, 1983);
- б) гексан-діетиловий ефір 2:1 (неполярні ліпіди) (Виноградова и Храпунов, 1983).

Ідентифікацію ліпідів проводили шляхом візуалізації пластинок за допомогою специфічних реагентів (Виноградова и Храпунов, 1983; Kretschmer & Wagner, 1983; Smyth et al., 2010):

а) 5%-ого спиртового розчину фосфорномолібденової кислоти (загальні ліпіди);

б) реагенту на основі 4-метоксибензальдегіду: 1 см³ 4-метоксибензальдегіду розчиняли у 9 см³ етанолу, додавали 1 см³ концентрованої сірчаної кислоти та 0,1 см³ льодяної оцтової кислоти - анісовий реагент (гліколіпіди);

в) антронового реагенту: 0,5 г антрону розчиняли у 25 см³ концентрованої сірчаної кислоти та доводили метанолом до 50 см³, охолоджуючи (гліколіпіди);

г) реагенту на основі дифеніламіну: 20 мл 10% розчину дифеніламіну в етанолі змішували з 100 мл концентрованої соляної кислоти та 80 мл льодяної оцтової кислоти (гліколіпіди);

г) 5%-ого спиртового розчину нінгідрину (пептидоліпіди).

Ідентифікацію полігідроксиалканоатів методом ТЛХХ проводили у системі розчинників етилацетат-бензен 1:1, візуалізацію – у йодній камері на водяній бані протягом 5-10 хв; поява жовто-зелених плям з $R_f=0,8$ свідчила про присутність ПГА (Senthilkumar et al., 2016).

Метод колонкової хроматографії використовували для розділення суміші ліпідів. Використовували силікагель 60 (0,06-0,20 мм, ROSS, Бельгія), який активували при 120°C. Завантажували силікагель у колонку розміром 220×15 мм та наповнювали гексаном. Розчиняли 0,5 г проби в 15 см³ суміші Фолча (хлороформ-ізопропанол 2:1) і наносили на силікагель. Для видалення залишкового гексадекану, неполярних ліпідів і пігментів колонку промивали гексаном. Далі елюювали фракції системами розчинників, поступово збільшуючи полярність: хлороформ, хлороформ: метанол (98:2, 90:10, 50:10, 30:10, 20:10, 10:10), метанол (Smyth et al., 2010). Склад кожної фракції контролювали за допомогою тонкошарової хроматографії.

Спектральні дослідження. Для ідентифікації і вивчення структури одержаних ТПАР, ЕПК, ПГА використовували методи ІЧ-спектроскопії, UV-Vis спектроскопії або ЯМР-спектроскопії.

Інфрачервона спектроскопія. ІЧ-спектр реєстрували на інтерференційному Фур'є-спектрофотометрі «Thermo scientific Nicolet iZ10» з використанням алмазних віконців за таких умов:

- діапазон хвильових чисел від 4000 см^{-1} до 525 см^{-1} ;
- роздільна здатність – 4 см^{-1} ;
- відстань між сусідніми точками вимірювання 1 см^{-1} ;
- підсилення 8;
- число сканів – 32.

Одержана в електронному форматі спектрограма оброблялась та ідентифікувалась за допомогою програмного забезпечення спектрофотометра «Thermo scientific Nicolet iZ10».

Ультрафіолетова спектроскопія. UV-Vis – спектр 0,1% розчин ПГА в хлороформі реєстрували на спектрометрі UV mini-1240 Shimadzu. Максимум поглинання хвиль λ у діапазоні від 230 до 240 нм є характерним для ПГА (Sato, 2015).

Ядерний магнітний резонанс. ЯМР-спектри були записані за допомогою спектрометра Bruker Advance 400 NMR (Bruker Biospin Corporation, США), що працює на частоті 100 МГц при температурі 25°C шляхом розчинення полімерного зразка в дейтерованому хлороформі (CDCl_3) за концентрації 25 мг/дм^3 , використовуючи тетраметилсилан ($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$) як внутрішній стандарт.

Методи визначення складу екзополісахаридного комплексу. Визначення кількості вуглеводів у складі ЕПК визначали за методом Дюбуа (Dubois et al., 1956). До $0,5\text{ см}^3$ розчину ЕПК додавали $0,5\text{ см}^3$ 5%-ного розчину фенолу та $2,5\text{ см}^3$ концентрованої сірчаної кислоти (H_2SO_4). Пробі перемішували та залишали на 20-30 хв. Оптичну густину реакційної суміші визначали на фотоелектроколориметрі КФК-2. Вміст загальних вуглеводів розраховували за калібрувальним графіком (глюкоза) при λ 490 нм.

Визначення вмісту білку у складі ЕПК визначали за методом Бредфорд (Bradford, 1976). Спочатку 0,1 г барвника Кумасі діамантовий синій G-250 розчиняли в 50 см³ 95%-ного етанолу. До цього розчину додавали 100 см³ 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 0,1-0,5 г/дм³. У пробірки, що містили 0,1 см³ досліджуваного розчину білка, додавали 5 см³ реагенту. Як контроль використовували відповідний буфер. Через 5-7 хв вимірювали оптичну густину зразків при 595 нм на спектрометрі UVmini – 1240 (Shimadzu, Japan). Вміст білку обчислювали за калібрувальним графіком (г/дм³). Для побудови калібрувальної кривої як стандарт використовували альбумін сироватковий ВРХ.

Визначення ліпідів у складі ЕПК проводили шляхом екстракції сумішшю Фолча з подальшим випарюванням у вакуумі до постійної маси (Folch, 1957).

Ідентифікація ауксинів. Здатність штаму *R. erythropolis* Au-1 до синтезу фітогормонів ауксинової природи визначали за допомогою якісної реакції з використанням реактиву Сальковського (50 см³ 35% HClO₄+1 см³ 0,5М FeCl₃*6H₂O) за появою малинового забарвлення СКР (Кефели и др., 1973).

2.5. Фізико-хімічні методи

Визначення поверхневого натягу. Поверхневий натяг супернатантів КР і розчинів ПАР визначали методом Дю-Нуї за допомогою платинового кільця (Абрамзон и др., 1988) на тензіометрі KRÜSS K6 ("KRÜSS" GmbH, Germany). Метод базується на визначенні сили втягування платинового кільця, яка обумовлена поверхневим натягом рідини.

Визначення ККМ. Готували серію розведень біоПАР відомої концентрації і вимірювали поверхневий натяг при кожному розведенні, будували графік залежності ПН від натурального логарифму концентрації ПАР.

Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає точці ККМ (мг/дм³) (Абрамзон и др., 1988).

Визначення емульгувальних властивостей. Емульгувальну активність препаратів визначали за методом Gutnick (Gutnick & Minas, 1957) у нашій модифікації: 10 см³ водного розчину ПАР або супернатанту перемішували з 10 см³ вазелінової оливи впродовж 2 хв на гомогенізаторі “Ми-2”. Отриману суміш переносили у вимірювальну пробірку NS-14 із внутрішнім діаметром 12 мм. Індекс емульгування (E₂₄) визначали через 24 год як відношення висоти емульсійного шару до загальної висоти рідини у пробірці (у %). Для оцінки стабільності емульсії індекс емульгування визначали у динаміці до повного розшарування емульсій.

Визначення термічної стабільності. Термічний аналіз проводили на дериватографі Q-1500D системи “Паулік - Паулік–Ердей”, з’єданого з персональним комп’ютером в інтервалі температур 20-1000°C при вільному доступі повітря в піч. Швидкість підвищення температури складала 5°C за хвилину. Маса зразків становила в середньому 80 мг, еталонною речовиною слугував алюміній оксид (Semeniuk et al., 2019).

Крайові кути змочування розчинами біоПАР поверхонь різних матеріалів визначали на катетометрі КМ-8.

2.6. Математичні методи

Метод багатопараметрових рівнянь дозволяє визначати оптимальні екстрагенти для виділення ТПАР, встановивши кількісний зв’язок між властивостями екстрагента і виходом біоПАР. Розрахунок проводили за модифікованим рівнянням Коппеля-Пальма (Koppel & Palm, 1974):

$$\lg P = a_0 + a_1 f(n^2) + a_2 f(\varepsilon) + a_3 B + a_4 E_T + a_5 \delta^2 + a_6 V_M, \quad (2.1)$$

У рівнянні: n – показник заломлення та ε – діелектрична проникність органічного розчинника, які визначають його поляризованість і полярність, таким чином характеризують здатність розчинника до неспецифічної

сольватації. B – основність за Пальмом (Koppel & Palm, 1972) та E_T – електрофільність за Райхардтом (Reichardt, 2003) визначають здатність розчинників до специфічної сольватації. Квадрат параметра розчинності Гільдебрандта δ , який пропорційний енергії когезії розчинника, та мольний об'єм розчинника V_M (Makitra et al., 2004) характеризують структурні особливості екстрагента. Адекватність отриманого рівняння перевіряли у відповідності з критерієм Фішера при степені достовірності $\alpha=0,95$ і визначали значимість окремих його членів згідно з рекомендаціями Секції по кореляційному аналізу в хімії при IUPAC (Recommendations, 1985). Відповідні характеристики розчинників брали із оглядів (Макитра та ін, 1986; Abboud & Notario, 1999). Враховуючи, що ТПАР – це складна суміш речовин з різною молекулярною масою, то для розрахунків використовували значення маси біоПАР в грамах (P), які переходять із водної фази в 1 моль екстрагента. Згідно з принципом лінійності вільних енергій між зміною P та змінами макропараметрів системи, спостерігається логарифмічна залежність, тому експериментальні дані логарифмувались і розрахунки проводили з використанням значень $\lg P$.

2.7. Методи визначення біологічної активності

Проникність клітинних мембран мікроорганізмів за дії ТПАР визначали за методом (Vasileva-Tonkova & Gesheva, 2005). Зміну проникності фіксували по виходу позаклітинного білка, концентрацію якого визначали за методом Бредфорд (Bradford, 1976). Для дослідження використовували тестові мікроорганізми: *Agrobacterium tumefaciens* та *Pseudomonas syringae*. Бактерії 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 ТПАР 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 (Сеги, 1983).

Вплив ТПАР на проникність клітин рослин (на поглинання мінеральних елементів проростками рослин). Насіння пшениці та сої замочували протягом 3 годин у розчинах ТПАР (0,01, 0,05, 0,10 г/дм³), контроль – в дистильованій воді. Повторність дослідів 4-х кратна (по 50 насінин). Потім насіння пророщували на вологому фільтрувальному папері за стандартною методикою (ДСТУ 4138-2002, 20030. Через 7 днів паростки поміщали в посудини ($V = 0,5$ дм³, по 10 паростків) з рідким середовищем Гельрігеля (г/дм³): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 - 0,492$; $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0,025$; $\text{KCl} - 0,075$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,136$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,123$ (Гродзинский и Гродзинский, 1973). Залишковий вміст іонів K^+ і Ca^{2+} у поживному середовищі вимірювали на полум'яному фотометрі ПФМ-ЗОМЗ через 48, 96, 240 годин. Розчини CaCO_3 (0,5 г/дм³) і KCl (0,5 г/дм³) були використані як стандарти. Кількість мінеральних елементів, адсорбованих рослинами, оцінювали як різницю між початковим та залишковим вмістом іонів у поживному середовищі (López-Arredondo et al., 2013).

Вплив ТПАР на активність індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) визначали у біотестах на відрізках колеоптилів пшениці, оцінюючи приріст їх довжини за 24 год у розчинах ТПАР та 2% розчині сахарози (контроль) (Кефели и др., 1973).

Вплив ТПАР на ріст бактерій оцінювали за зміною кількості АСБ, біоПАР та ЕПК штаму *R. erythropolis* Au-1, вирощеного на поживних середовищах з внесенням ТПАР (0,01 г/дм³) та без нього (контроль).

Цитотоксичність ПАР досліджено на фібробластоподібних клітинах мишей L929 (АТСС ССЛ-1) та клітинах аденокарциноми легень А549 (АТСС ССЛ 185). Оцінювали цитотоксичну дозу (ТССД₅₀) – мінімальну концентрацію, яка приводить до загибелі 50% клітин через 72 години контакту ПАР з клітинами.

2.8. Методи дослідження впливу на рослини

Допосівне оброблення насіння проводилось шляхом замочування в досліджуваних розчинах протягом 3 год. Контроль – дистильована вода.

Лабораторні дослід. Насіння пшениці чи сої за допосівного оброблення досліджуваними розчинами розкладали на фільтрувальний папір у чашки Петрі або лотки. Схожість насіння визначали на 3 добу згідно ДСТУ 4138-2002, (2003). Морфометричні параметри рослин – на 7-му добу. Визначення надземної та кореневої маси проростків проводили ваговим методом після висушування на повітрі при кімнатній температурі. Повторність дослідів 4-х кратна (по 50 насінин).

Оброблення насіння шляхом обприскування проводили для порівняння ефективності способів допосівного оброблення насіння. Зерна пшениці обприскували розчином ТПАР (в розрахунку 0,05 г ТПАР на 1 кг насіння). Контроль – насіння, обприскане дистильованою водою. Оброблене насіння витримували 1 год і розкладали у лотки на вологий фільтрувальний папір. На 7 добу визначали схожість насіння та морфометричні параметри проростків.

Вегетаційні дослід. Попередньо оброблене насіння пшениці та сої висаджували в посудини з ґрунтом або вирощували на середовищі Гельрїгеля (Гродзинский и Гродзинский, 1973) в умовах піщаної культури. Об'єм посудин – 900 см³. Облік надземної та кореневої маси (на 30-35 добу для пшениці та на 50-60 добу для сої після сходів насіння) проводили ваговим методом після висушування на повітрі при кімнатній температурі. Повторність дослідів 4-х кратна.

Дрібноділянкові дослід. Насіння пшениці та сої попередньо замочували в розчині ТПАР (0,05 г/дм³) протягом 3 год (контроль – дистильована вода) і висаджували у ґрунт на ділянки площею 10 м². Рослини вирощували впродовж 3-х місяців або до стадії збору урожаю. Проводили визначення морфометричних параметрів рослин, маси 1000 зернин (бобів) та врожайності культур (Доспехов, 1985; Трибель та ін., 2001; ДСТУ ISO 520:2015).

Визначення пігментів фотосинтезу. Зважували 0,5 г зеленої маси пшениці (листя) , розтирали у фарфоровій ступці з 10 мл ацетону. Настоявали 10-15 хв і фільтрували через скляний фільтр Шота №2 в колбу Бунзена. Далі вимірювали вміст пігментів на фотоколориметрі КФК-3 при довжинах хвиль 662, 644 та 440,5 нм. Визначення вмісту пігментів фотосинтезу проводили за формулами Венштейна, у мг/г (Шлык, 1971).

Виробничі дослід проводили на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України. Насіння пшениці та сої попередньо замочували в розчині ТПАР (0,05 г/дм³) протягом 3 год, контроль – дистильована вода, і висаджували у ґрунт. Площа дослідних ділянок – 1 га. Рослини вирощували до стадії збору урожаю. Визначали масу 1000 зернин (бобів). Облік урожайності визначали збиранням врожаю з усієї ділянки. При проведенні польових досліджень та їхнього аналізу дотримувалися загальноприйнятих методик (Доспехов, 1985; Трибель та ін., 2001; ДСТУ ISO 520:2015).

2.9. Методи визначення корозійної стійкості

Гравіметричний метод. Інгібування корозії сталі Ст3 вивчали за кімнатної температури за наступною методикою (Слободян та ін., 2012). Зважені сталеві пластини повністю занурювали у мірні стакани з підготованими композиціями або водою (контроль) у кількості 200 см³ та витримували упродовж 7 діб. Потім пластинки промивали, очищували та підсушували. Швидкість корозії визначали гравіметрично та розраховували за формулою 2.2:

$$K_m = (m_1 - m_2) / S \cdot \tau, \quad (2.2)$$

де: m_1 – початкова вага зразка, г; m_2 – вага зразка після експозиції в корозивному середовищі та усуненні продуктів корозії, г; S – загальна площа зразка, см²; τ – час експозиції зразка в корозійному середовищі, год.

Захисний ефект інгібітора (ступінь захисту Z) розраховували за формулою 2.3:

$$Z, \% = (K_m - K_i / K_m) \cdot 100\%, \quad (2.3)$$

де: K_m і K_i – швидкість корозії в неінгібованому та інгібованому середовищі відповідно.

Глибинний показник Π швидкості корозії розраховували за формулою 2.4:

$$\Pi = (K_m / \rho) 10^{-3}, \quad (2.4)$$

де: K_m – швидкість корозії, $\text{г/м}^2 \text{ год}$, ρ – густина металу, г/см^2

Метод потенціодинамічної поляризації. Інгібування корозії сталі Ст3 вивчали на потенціостаті Gill за умов кімнатної температури, швидкість розгортки потенціалу – 2 мВ/с. Вимірювання здійснювали за триелектродною схемою: робочий електрод — сплав Д16Т, електрод порівняння — хлоридсрібний насичений типу ЭВЛ-1М1, допоміжний — платиновий (Pokhmurs'kyi et al., 2014). Густина струмів корозії металу визначали екстраполяцією тафелівських ділянок поляризаційних кривих за допомогою комп'ютерної програми ACM Analysisv4. Поверхню зразків сталі після витримки в корозивних середовищах вивчали на оптичному стереомікроскопі Carl Zeiss Stemi 2000.

Метод визначення електронної та геометричної структури молекул. Електронну та геометричну структури оптимізованої молекули трегалозо-6-моноацилату розраховували із використанням квантово-хімічної програми ORCA 2.8.9 (Neese, 2012) за допомогою методу теорії функціоналу густини (DFT) в узагальненому градієнтному наближенні (GGA) для обмінно-кореляційного функціоналу B3LYP (Becke, 1993) і базисного набору 6-31G для атомів кисню, водню та вуглецю. У результаті розрахунку отримували повну енергію молекули E , її теплоту утворення H , енергії вищої зайнятої E_{HOMO} та нижчої вільної E_{LUMO} молекулярних орбіталей, значення енергетичної щільності $\Delta = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$, потенціал іонізації кластера, розподіл атомних зарядів за схемою Маллікена, дипольний момент та інші похідні характеристики.

Розроблення інгібіторних композицій:

1) До СКР штаму *R. erythropolis* Au-1 (вміст ТПАР 1 г/дм³) додавали порошок цинк фосфату Actirox 106 (виробник – Nubiola Pigmentos, S.L., Іспанія) при такому співвідношенні компонентів (мас. %):

ТПАР 86,0 – 94,0

Цинк фосфат 6,0 – 14,0

Після чого отриману суміш завантажували в кульовий млин РМ 100 (Retsch) та здійснювали диспергування фосфату цинку з частотою обертання циліндра 100 об/хв протягом 1 години. Після перемелювання одержували суспензію фосфату цинку у 0,1%-ному водному розчині ТПАР, яку відстоювали протягом 2 годин і декантацією відділяли її колоїдний розчин. У корозивне середовище інгібіторні композиції вносили з розрахунку 0,3 г/дм³. Захист сталі від корозії інгібіторною композицією та прототипом оцінювали гравіметричним методом при температурі 20°C, 40°C та 60°C у модельній пластовій воді на дискових зразках із вуглецевої сталі 20.

2) До водного розчину ТПАР (0,25 г/дм³) додавали порошок цинк фосфату, готували суспензію як зазначено в п.1. Захист сталі від корозії інгібіторною композицією оцінювали потенціометричним методом у синтетичному кислому дощі на дискових зразках із сталі Ст3.

Корозивні середовища:

- 1) модельна пластова вода (г/дм³): NaCl – 163; CaCl₂ – 34; MgCl₂ – 17; Na₂SO₄·10H₂O – 0,32;
- 2) середовище, яке імітує кислі дощові опади (г/дм³): H₂SO₄ – 3,18; (NH₄)₂SO₄ – 4,62; Na₂SO₄ – 3,20; HNO₃ – 1,58; NaNO₃ – 2,13; NaCl – 8,48, pH = 4,5.
- 3) 0,1% розчин NaCl.

2.10. Статистичний аналіз

Повторність всіх мікробіологічних досліджень 3-х кратна. У дослідах з рослинами – 4-х кратна. Статистичний аналіз достовірності експериментальних даних проводили методами варіаційної статистики (Лакин, 1990) та обробку

даних програмою Microsoft Excel 2010. Планування і проведення польових дослідів, статистичну обробку даних проводили згідно (Доспехов, 1985).

РОЗДІЛ 3

СИНТЕЗ МЕТАБОЛІТІВ ШТАМУ *R. ERYTHROPOLIS* Au-13.1. Скринінг бактерій виду *Rhodococcus erythropolis* як продуцентів ПАР

У роботі представлено результати скринінгу 9 штамів актинобактерій *Rhodococcus erythropolis* за здатністю до синтезу ПАР. Бактрії культивували на поживному середовищі із гексадеканом як джерелом вуглецю. Показано, що 5 штамів (*R. erythropolis* К, УКМ Ас-77, УКМ Ас-44, Au-1 (УКМ 603), УКМ Ас-63 (IEGM-20)) активно ростуть (АСБ в межах 7,5 – 10,3 г/дм³) і синтезують клітинно-зв'язані (вихід – 1,8-3,4 г/дм³) та позаклітинні ПАР (0,2 – 1,0 г/дм³) за досліджуваних умов. Низький поверхневий натяг СКР цих штамів (37,0-45,2 мН/м) вказує також на синтез позаклітинних біоПАР.

Таблиця. 3.1.

Скринінг штамів *Rhodococcus erythropolis* як продуцентів ПАР

Штам бактерій	АСБ, г/дм ³	Клітинно- зв'язані ТПАР, г/дм ³	Позаклітинні ТПАР, г/дм ³	ПН, мН/м
<i>R. erythropolis</i> УКМ Ас-77	7,5±0,3	1,8±0,2	0,22±0,01	45,2±0,5
<i>R. erythropolis</i> УКМ Ас-44	9,0±0,5	2,5±0,2	0,82±0,04	39,1±0,6
<i>R. erythropolis</i> УКМ Ас-68	4,2±0,2	1,1±0,1	0,13±0,006	50,0±0,6
<i>R. erythropolis</i> УКМ Ас-50	6,6±0,3	1,7±0,1	0,20±0,01	47,2±0,4
<i>R. erythropolis</i> УКМ Ас-23	3,8±0,2	0,9±0,1	0,01±0,005	52,0±0,6
<i>R. erythropolis</i> Au-1 (УКМ 603)	10,3±0,5	3,4±0,2	1,00±0,05	37,0±0,5
<i>R. erythropolis</i> К	8,7±0,5	2,2±0,2	0,75±0,03	40,0±0,5
<i>R. erythropolis</i> УКМ Ас-63 (IEGM-20)	7,8±0,4	2,1±0,2	0,56±0,02	44,0±0,5
<i>R. erythropolis</i> ІМВ В-7012	5,6±0,5	1,7±0,2	0,21±0,01	47,0±0,6

Примітка: результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Отже, перспективними продуцентами ПАР можна вважати 5 штамів *R. erythropolis* із 9, які було досліджено. Для подальших експериментів було обрано найбільш активний продуцент – штам *R. erythropolis* Au-1 (УКМ 603), який синтезує 3,4 г/дм³ клітино-зв'язаних ПАР, а АСБ становить 10,3 г/дм³.

3.2. Характеристика метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1

Бактерії штаму *R. erythropolis* Au-1 на твердому універсальному середовищі утворюють колонії світлокремового кольору, який з часом стає більш насиченим (рис.3.1).

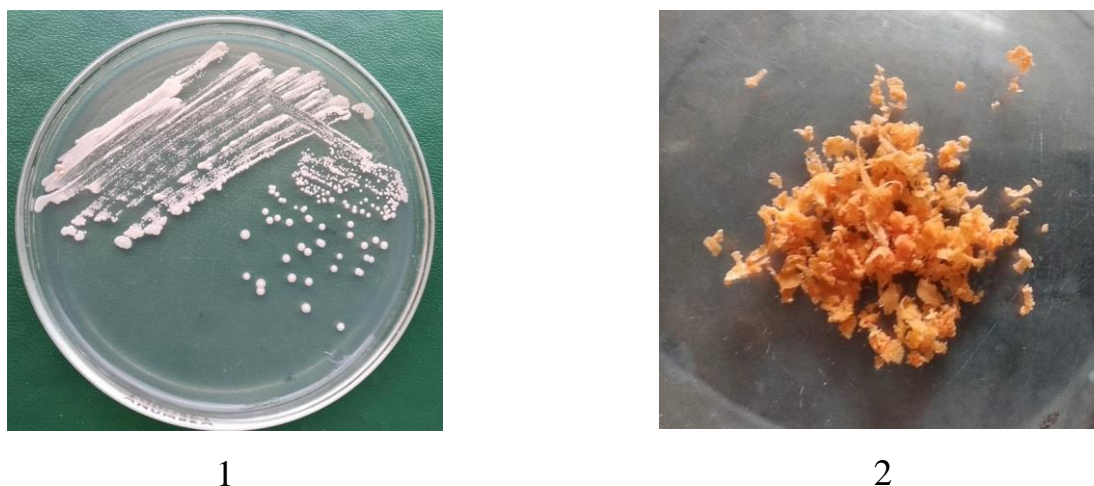


Рис. 3.1. Бактерії штаму *R. erythropolis* Au-1: 1 – ріст на твердому універсальному середовищі; 2 – біомаса.

Результати проведених досліджень показують, що штам *R. erythropolis* Au-1 синтезує клітинно-зв'язані та позаклітинні ПАР трегалозоліпідної природи (ТПАР), позаклітинний емульгатор полісахаридної природи (ЕПК), клітинні полімери (ПГА), а також фітогормони ауксинової природи.

Клітинно-зв'язані ТПАР – це комплекс поверхнево-активних речовин, який продукують бактерії штаму *R. erythropolis* Au-1, локалізовані на поверхні клітин. Методом ТШХ визначено, що до клітинно-зв'язаних ТПАР входять: гліколіпіди, а саме трегалозоліпіди (трегалозо-6-міколати, трегалозо-6,6'-диміколати, трегалозо-6-ацилати, трегалозо-6,6'-диацилати), пептидоліпіди, а

також неполярні ліпіди (жирні кислоти і вищі спирти: цетиловий спирт, пальмітинова кислота, тригліцериди), (рис.3.2).

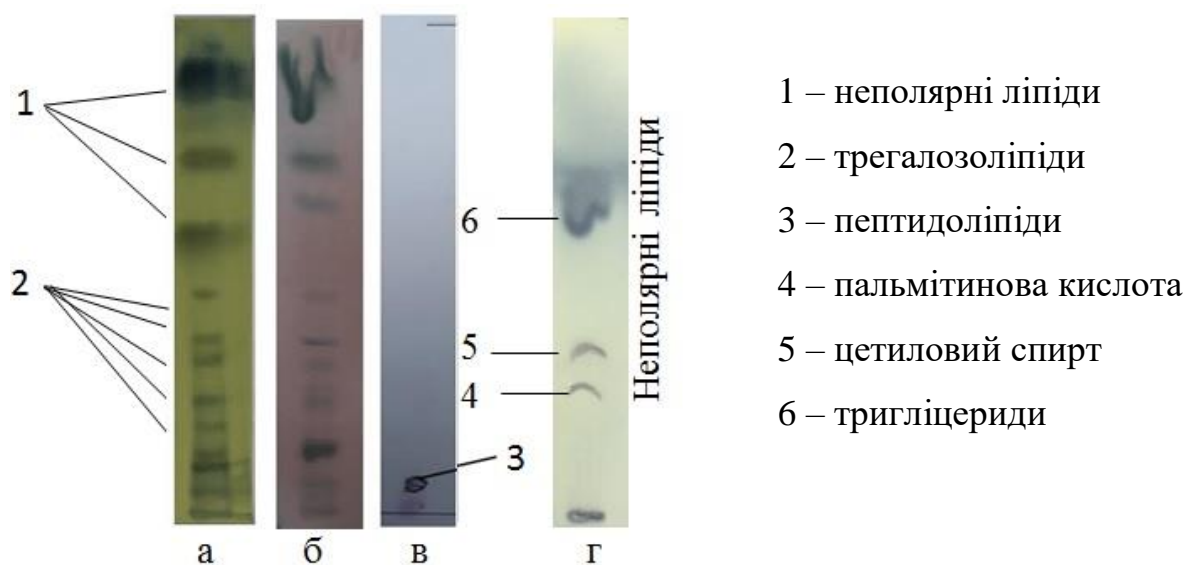


Рис. 3.2. ТШХ ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1. Візуалізація розчином фосфорномолібденової кислоти (а, г), анісовим реагентом (б), нінгідрином (в). Рухома фаза хлороформ-метанол-вода 65:15:2; г – неполярні ліпіди, рухома фаза – петролейний ефір-діетиловий ефір 2:1.

Отриманий екстракт ліпідів було розділено на фракції з використанням методу адсорбційної хроматографії на колонці з силікагелем. Отримано 8 фракцій, для їх розчинів визначено: поверхневий натяг, значення R_f у рухомій фазі хлороформ: метанол: вода (65:15:2). Для фракцій записано спектри у видимій області у розчинах хлороформу (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

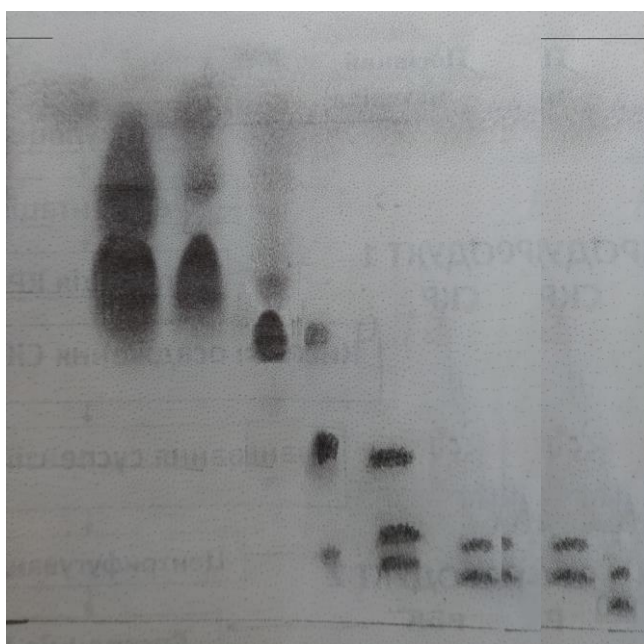
**Склад та характеристика фракцій клітино-зв'язаних ПАР
штаму *R. erythropolis* Au-1**

№ фракції	Елюент	Поверхневий натяг, мН/м	R_f	$\lambda_{max},^*$ нм
1	2	3	4	5
1	Хлороформ	52,0±0,4	0,81; 0,7	452,5; 306,5

2	Хлоро- форм: мета- нол	98:2	49,5±0,4	0,81; 0,7	452,5; 306,5
3		90:10	40,2±0,4	0,7; 0,62	306,5; 295,5
4		50:10	37,5±0,5	0,62; 0,25; 0,12	306,5; 295,5; 537,8
5		30:10	32,0±0,5	0,25; 0,14; 0,10	453,4; 365,0; 306,5; 295,5
6		20:10	31,7±0,4	0,14; 0,10	-
7		10:10	30,5±0,3	0,14; 0,10	-
8		Метанол	30,8±0,3	0,10; 0,05	452,5; 295,5; 306,5

Примітка: поверхневий натяг визначали для розчинів ліпідів (0,5 г/дм³).

Встановлено, що фракції (№1, 2) містять неполярні ліпиди, характеризуються незначною поверхневою активністю (49,5-52,0 мН/м), рис.3.3.



Хлороформ
98:2
90:10
50:10
30:10
20:10
10:10
Метанол
Хлороформ:метанол

Рис. 3.3. ТШХ фракції ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 з використанням методу адсорбційної хроматографії: рухома фаза хлороформ: метанол: вода (85:15:2), візуалізація реагентом на основі 4-метоксибензальдегіду.

Неполярні ліпіди та трегалозодиміколати присутні у фракції №3 (поверхневий натяг 43,2 мН/м). Трегалозомономіколати виявлено у фракціях № 4 та 5 (поверхневий натяг 32,0 – 37,5 мН/м). Фракції 6-8 містять трегалозоацилати та пептидоліпіди та характеризуються достатньо низьким поверхневим натягом: 30,5 – 31,7 мН/м (рис. 3.3). Отже, показано, що найбільш ефективними ПАР є фракції трегалозоліпідів: поверхневий натяг їхніх розчинів становив 30,5-43 мН/м.

Отриману фракцію №3 (елюент хлороформ:метанол 90:10) ідентифікували методом ІЧ-спектронетрії (рис.3.4).

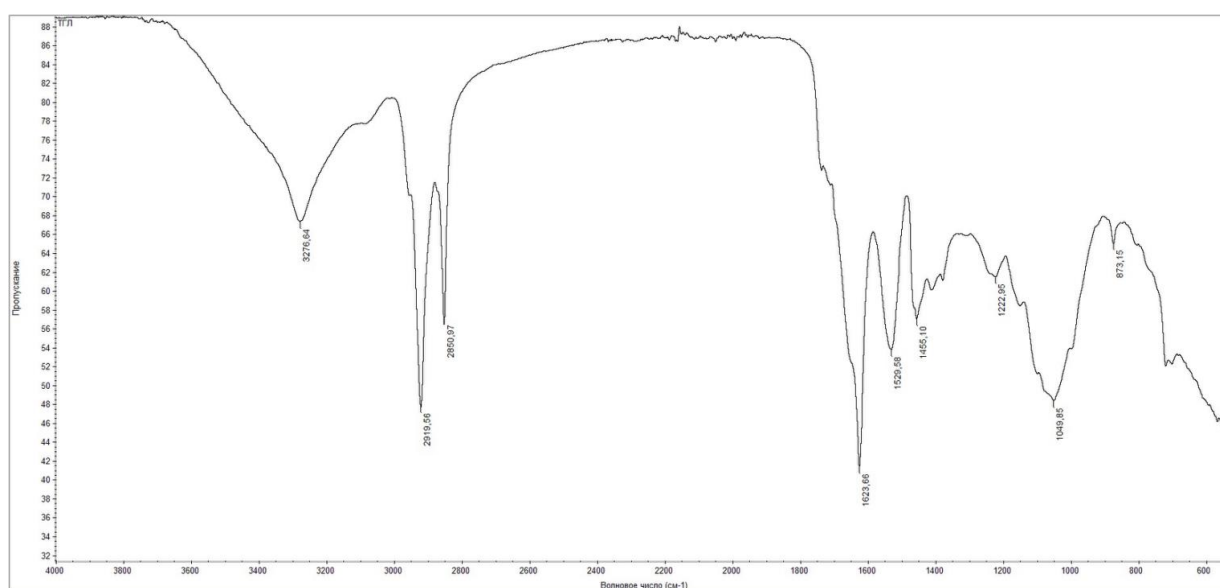


Рис. 3.4. ІЧ-спектр фракції ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1.

Аналіз отриманих даних вказує, що в спектрі:

- 1) широка смуга в області $3500 - 3200 \text{ см}^{-1}$ узгоджується з літературними даними для зв'язаних водневими зв'язками $-\text{OH}$ груп;
- 2) сильні піки абсорбції в області $2960 - 2800 \text{ см}^{-1}$ вказують на валентні коливання (CH) груп;
- 3) наявні піки в області $1200 - 1000 \text{ см}^{-1}$ відповідають валентним коливанням простих ефірних груп $(\text{C}-\text{O}-\text{C})$;
- 4) наявність слабого сигналу в області 1700 см^{-1} може вказувати на малий вміст карбонільних груп $(\text{C}=\text{O})$;
- 5) відсутні смуги $-\text{OH}$ групи первинного спирту $(-\text{CH}_2-\text{OH}, 3635 \text{ см}^{-1})$.

Отже, підтверджено синтез трегалозо-6,6'-диміколатів штамом *R. erythropolis* Au-1.

Позаклітинні ТПАР – це комплекс поверхнево-активних речовин, який продукують бактерії штаму *R. erythropolis* Au-1, локалізовані у супернатанті культуральної рідини. Залежно від джерела вуглецю вміст позаклітинних ліпідів знаходиться в межах від 0,13 г/л (сахароза) до 2,54 г/л (ріпаковий ФК) (табл.3.1.). Визначено, що їхній склад практично аналогічний клітинно-зв'язаним ТПАР, проте пептидоліпідів не виявлено (рис.3.5).

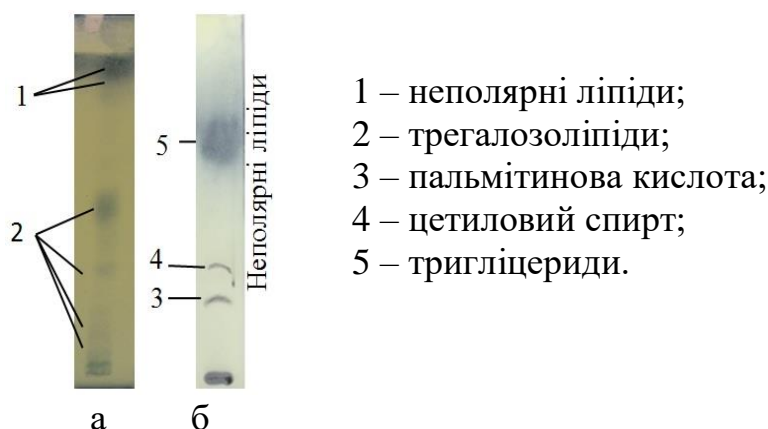


Рис. 3.5. ТШХ позаклітинних ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1: візуалізація розчином фосфорномолібденової кислоти; а – рухома фаза хлороформ-метанол-вода 65:15:2; б – неполярні ліпіди, рухома фаза петролейний ефір-діетиловий ефір 2:1.

Позаклітинні ТПАР складніше, ніж клітинно-зв'язані, очистити від залишків поживного середовища для вирощування бактерій-продуцентів. Тому компоненти поживного середовища присутні в значних кількостях у складі позаклітинних ТПАР.

Екзополісахаридний комплекс (ЕПК) – позаклітинний метаболіт штаму *R. erythropolis* Au-1, порошкоподібна речовина білого кольору (рис. 3.6), володіє емульгуювальними властивостями.



Рис. 3.6. Зразок екзополісахаридного комплексу штаму *R. erythropolis* Au-1.

Встановлено, що до складу ЕПК входять полісахариди (90,2%), ліпіди (9,3%) та білки (0,5%). ЕПК також ідентифікували методом ІЧ-спектроскопії (рис.3.7.).

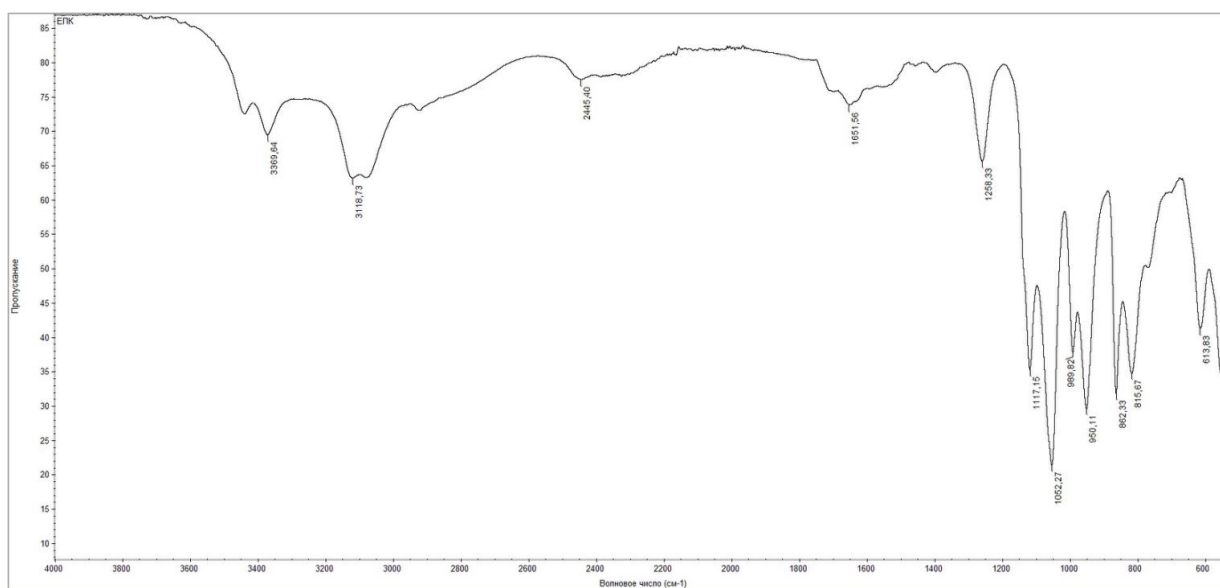


Рис. 3.7. ІЧ-спектр екзополісахаридного комплексу штаму *R. erythropolis* Au-1.

Аналіз отриманого ІЧ-спектру ЕПК:

- 1) смуга 3610 см^{-1} вказує на валентні коливання -ОН групи в радикалі (CH₂-ОН);

- 2) смуга 3360 см^{-1} вказує на валентні коливання -ОН груп глікозидного кільця;
- 3) коливання в області $2900\text{-}2800\text{ см}^{-1}$ вказують на валентні коливання (СН) груп;
- 4) смуга 1700 см^{-1} вказує на валентні коливання карбонільної групи (С=О);
- 5) смуга 1600 см^{-1} вказує на асиметричні деформаційні коливання групи (NH⁺);
- 6) смуга 1117 см^{-1} вказує на валентні коливання ефірної групи (С-О-С) глікозидного мостика;
- 7) смуга 1052 см^{-1} вказує на валентні коливання ефірної групи (С-О-С) глікозидного кільця;
- 8) коливання в області $900\text{-}650\text{ см}^{-1}$ вказують на деформаційні коливання (NH) групи.

Отже, підтверджено полісахаридну структуру емульгатора, а також наявність у його складі (NH) груп (рис.3.7.). Отримані результати узгоджуються літературними даними (Urai, 2007).

Встановлено, що ЕПК володіє високою емульгувальною активністю (індекси емульгування розчинів ЕПК $1\text{-}10\text{ г/дм}^3$ становлять $42\text{-}58\%$), а отримані емульсії з вазеліною оливою є стабільними у часі протягом 3 тижнів (рис.3.8).

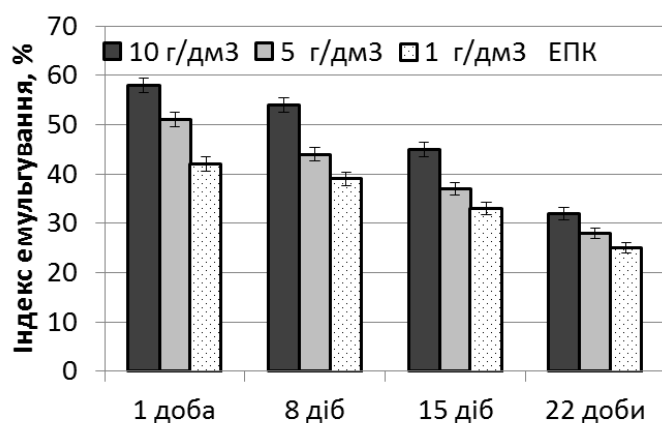


Рис. 3.8. Стійкість емульсій розчинів екзополісахаридного комплексу та вазелінової оливи.

Отже, ЕПК є ефективним емульгатором.

Полігідроксиалканоати. З бактерій штаму *R. erythropolis* Au-1 вперше отримано клітинні полімери. Вони характерного світло кремового кольору, здатні утворювати плівку, яка є відносно крихкою (рис.3.9).



Рис. 3.9. Зразки полігідроксиалканоатів штаму *R. erythropolis* Au-1.

Одержання ПГА підтверджено такими методами:

- 1) ТШХ (характерна жовто-коричнева плями $R_f=0,8$, (Senthilkumar, 2016), (рис.3.10 а);
- 2) UV-Vis спектроскопії (максимум поглинання при довжині хвилі 239 нм (Sato, 2015), рис.3.10 б);
- 3) ІЧ-спектроскопії, рис.3.11.
- 4) ЯМР – спектроскопії, рис.3.12.

Аналіз отриманого ІЧ-спектру клітинного полімеру:

- 1) набір смуг в області $2960-2800\text{ см}^{-1}$ відповідають симетричним та асиметричним валентним коливанням груп (CH), (CH₂), (CH₃);
- 2) смуга 1740 см^{-1} вказує на валентні коливання карбонільної групи (C=O); широка слабка смуга в області $3600-3100\text{ см}^{-1}$ відповідає валентним коливанням кінцевих груп (-OH);
- 3) смуга 1238 см^{-1} відповідає валентним асиметричним коливанням складноєфірних груп (C-O-C);

4) смуги в області $1463\text{-}1300\text{ см}^{-1}$ відповідають деформаційним коливанням груп (CH_2) , (CH_3) .

Отже, ІЧ-спектр підтверджує структуру полігідроксиалканоату.

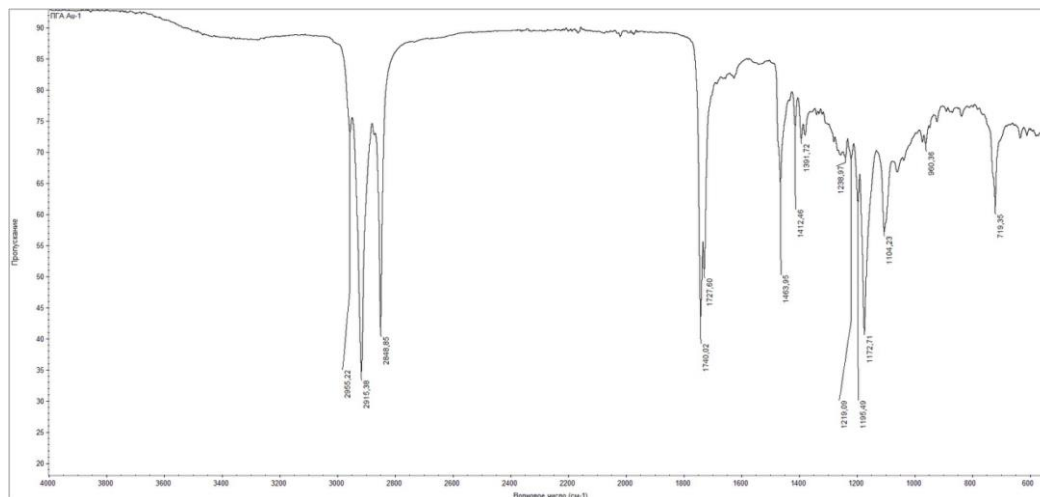


Рис. 3.11. ІЧ-спектр клітинного полімеру штаму *R. erythropolis* Au-1.

Методом ^1H -ЯМР-спектроскопії визначено структуру одержаного полімеру (рис.3.12).

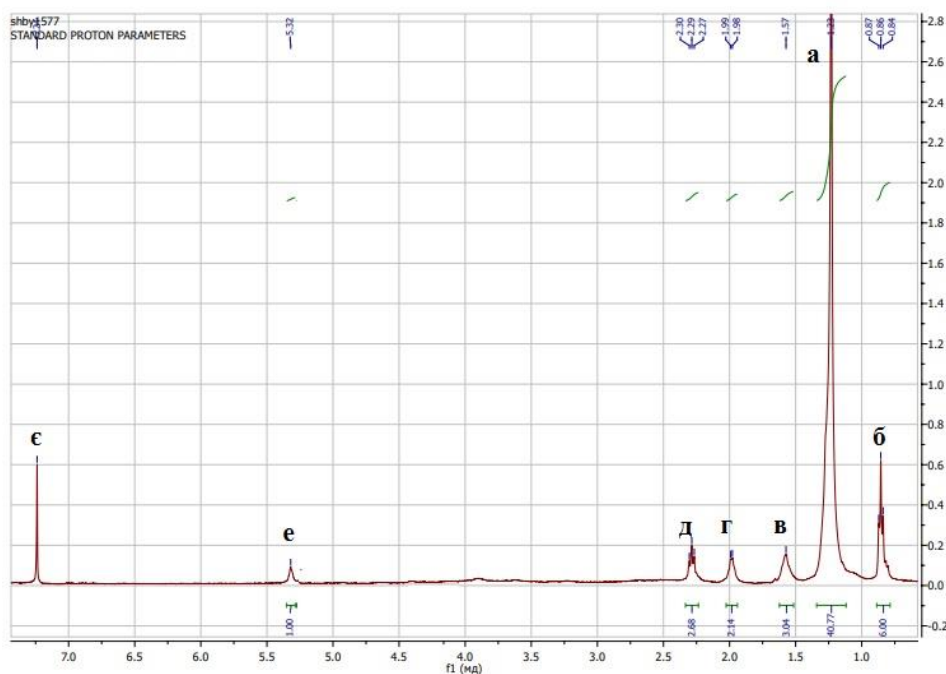


Рис. 3.12. ^1H -ЯМР спектр клітинного полімеру штаму *R. erythropolis* Au-1.

а) мультиплет при 1,38- 1,18 м.ч. відповідає $-(\text{CH}_2)_{20}$ фрагментам; б) триплет при 0,86 м.ч свідчить про наявність протонів у складі двох кінцевих метильних

груп- $(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$; в) мультиплет при 1,49-1,65 м.ч можна віднести до протону метинового фрагменту в складі бічного алкільного ланцюга- $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})_2$; г) дублет при 1,99-1,98 м.ч. відповідає протонам мітленового фрагменту бокового алкільного ланцюга $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})_2$; д) мультиплет при 2,30-2,27 м.ч. відповідає $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ полімерного ланцюга; е) синглет при 5,28 м.ч. свідчить про наявність протону $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ полімерного ланцюга.

Аналіз даних ^1H -ЯМР-спектру підтверджує, що одержаний біополімер належить до полігідроксиалканоатів, його боковий алкільний ланцюг має розгалужену структуру. Отримані результати узгоджуються з літературними даними (Khanna & Srivastava, 2005).

Отриманий вихід ПГА становить 10% від біомаси.

Досліджено, що температура плавлення біополімеру становить 42°C , термічна стійкість зберігається до 175°C (рис. 3.13).

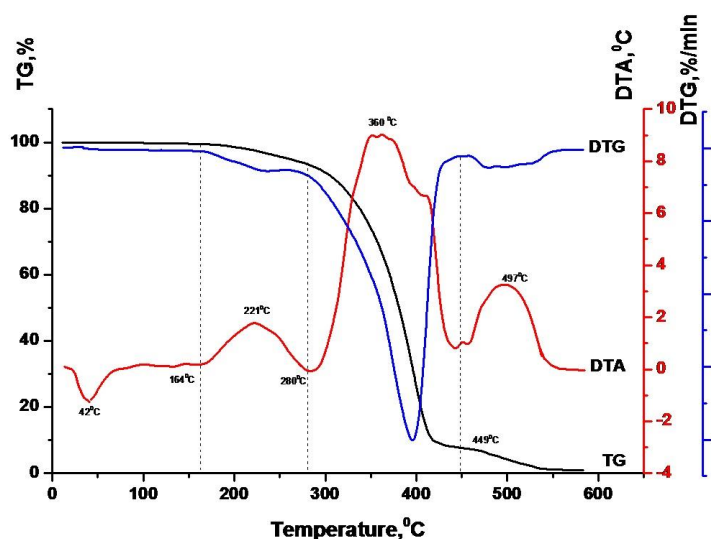


Рис.3.13. Термограма зразку клітинного полімеру штаму *R. erythropolis* Au-1: TG – термогравіметрична крива; DTA – крива диференційного термічного аналізу; DTG – диференціальна термогравіметрична крива.

Отже, з клітин бактерій штаму *R. erythropolis* Au-1 вперше виділено клітинний полімер, досліджено його структуру та ідентифіковано як полігідроксиалканоат. Значний вихід від АСБ та властивості одержаного ПГА дозволяють віднести його до практично цінних метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1.

Супернатант культуральної рідини – це найбільш економічно доступний продукт штаму *R. erythropolis* Au-1, оскільки його технологія складається із

найменшої кількості технологічних стадій, порівняно із іншими метаболітами. До складу СКР входять позаклітинні ТПАР, ЕПК. Також за допомогою якісної реакції на вміст індоліл-3-оцтової кислоти (фітогормон фуксинової природи) вперше встановлено, що у складі СКР штаму *R. erythropolis* Au-1 містяться фітогормони ауксинової природи (малинове забарвлення СКР у специфічній реакції Сальковського, рис.3.14).

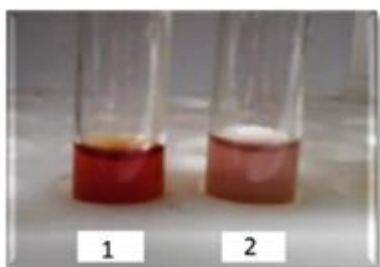


Рис.3.14. Якісна реакція Сальковського на наявність індолілоцтової кислоти (ІОК): 1 – розчин ІОК 10 мг/дм³; 2 – СКР штаму *R. erythropolis* Au-1.

Отже, СКР, що містить позаклітинні ТПАР, ЕПК, фітогормони, неутілізовані компоненти поживного середовища, що визначає його активність та потенційні сфери використання СКР.

3.3. Раціональні умови синтезу ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1

Одним із важливих чинників для отримання цільових продуктів є вибір джерел вуглецю та азоту для культивування бактерій-продуцентів.

Підбір джерел вуглецю для синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1.

Бактерії вирощували на поживному середовищі з гідрофобними або гідрофільними субстратами (в еквімолярних за вуглецем концентраціях, 17 г/дм³), табл.3.3.

Таблиця 3.3.

Вплив джерел вуглецю на синтез ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1

Джерела вуглецю	АСБ, г/дм ³	Трегалозоліпідні ПАР, г/дм ³		Екзополісахаридний комплекс, г/дм ³	Поверхневий натяг СКР, мН/м
		Клітинно-зв'язані	Позаклітинні		

Сахароза	6,2±0,3	0,50±0,02	0,45±0,02	5,04±0,23	53,0±2,1
Гліцерин	5,8±0,3	0,42±0,02	0,81±0,04	4,52±0,21	50,5±2,0
Вазелінова олива	8,5±0,4	2,53±0,12	1,50±0,07	3,00±0,14	45,4±1,9
Тетрадекан	11,5±0, 6	2,71±0,13	1,05±0,05	1,94±0,10	37,1±1,5
Гексадекан	10,3±0, 5	3,40*±0,16	1,00±0,05	2,20±0,11	37,0±1,5

Примітки: джерела вуглецю використовували у еквімолярних концентраціях за С – 17 г/дм³; джерело азоту – натрій нітрат (3 г/дм³); АСБ – абсолютно суха біомаса; ЕПК – екзополісахаридний комплекс; результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Встановлено, що для синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 доцільно використовувати гідрофобні джерела вуглецю (вихід клітинно-зв'язаних ТПАР – 2,5-3,4 г/дм³, позаклітинних – 1,0-1,5 г/дм³), при чому найвищий вихід ТПАР спостерігався за концентрації гексадекану 20 г/дм³ (за більших концентрацій гексадекану підвищення параметрів росту бактерій не спостерігали, а концентрація 10 г/дм³ дозволяє отримати на 25% менше біомаси та біоПАР). Для отримання позаклітинного емульгатора доцільніше використовувати гліцерин або сахарозу як вуглецевий субстрат. За таких умов вихід ЕПК є вдвічі більшим, ніж за використання гексадекану (4,5 – 5,0 г/дм³ відповідно).

Підбір джерел азоту для синтезу ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1. Наступним кроком був підбір джерел азоту. Їх використовували в еквімолярних за азотом концентраціях (0,49 г/дм³), (табл.3.4).

Таблиця 3.4.

Вплив джерел азоту на синтез ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1

Джерело азоту	АСБ, г/дм ³	Трегалозоліпідні ПАР, г/дм ³		ЕПК, г/дм ³	Поверхневий натяг СКР, мН/м
		Клітинно-зв'язані	Позаклітинні		

NaNO ₃	10,3±0,5	3,40*±0,16	1,00±0,05	2,20±0,11	37,0±1,5
CO(NH ₂) ₂	8,8±0,4	2,81±0,14	1,10±0,06	1,91±0,10	37,5±1,5
NH ₄ NO ₃	9,1±0,5	2,72±0,14	1,00±0,05	2,01±0,10	37,5±1,6
пептон	5,7±0,3	0,81±0,04	0,32±0,02	0,92±0,04	38,5±1,4
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5±0,2	0,50±0,02	0,21±0,01	0,81±0,04	39,0±1,7
Дріжджовий екстракт	12,4±0,6	3,02±0,15	1,12±0,06	2,42±0,12	38,5±1,6

Примітки: джерела азоту використовували у еквімолярних концентраціях за N – 0,49 г/дм³; джерело вуглецю – гексадекан (20 г/дм³); АСБ – абсолютно суха біомаса; ЕПК – екзополісахаридний комплекс; результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Показано, що для синтезу ТПАР штамом *R. erythropolis* Au-1 можна використовувати натрій нітрат, амоній нітрат, дріжджовий екстракт і сечовину. Для визначення найбільш доцільного джерела азоту враховували наступні чинники:

1) через високу вартість дріжджового екстракту його застосування є недоцільним, незважаючи на значний вихід біомаси (12,4 г/ дм³);

2) вміст азоту у натрій нітраті, амоній нітраті та сечовині становить відповідно 16,5%, 35% та 46% (за майже однакової ціни), тому доцільно було б використовувати сечовину;

3) відомо, що процеси виділення більш затратні, ніж біосинтез, і становлять, як правило, 60-80% вартості виробництва біоПАР (Okoliegbe, 2012), визначальним є склад поживного середовища, за якого спостерігається максимальний синтез цільового продукту. Оскільки вихід ТПАР є найбільшим за використання натрій нітрату (вищий на 18-20%, ніж за амоній нітрату або сечовини), доцільно застосовувати натрій нітрат як джерело азоту для синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1.

Отже, обґрунтовано, що натрій нітрат – найбільш перспективне джерело азоту для синтезу метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1.

3.4. Апробація біосинтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 при культивуванні у ферментері

Важливим завданням є масштабування технології трегалозоліпідних ПАР від лабораторного до виробничого процесу, зокрема апробування мікробного синтезу з використанням біореактора (Пирог и Игнатенко, 2011). Вивчено динаміку синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 у біореакторі з вихровою системою аерації на розробленому поживному середовищі (рис.3.14). Ефективність такого біореактора визначено у попередніх експериментах (Карпенко та ін., 2012).

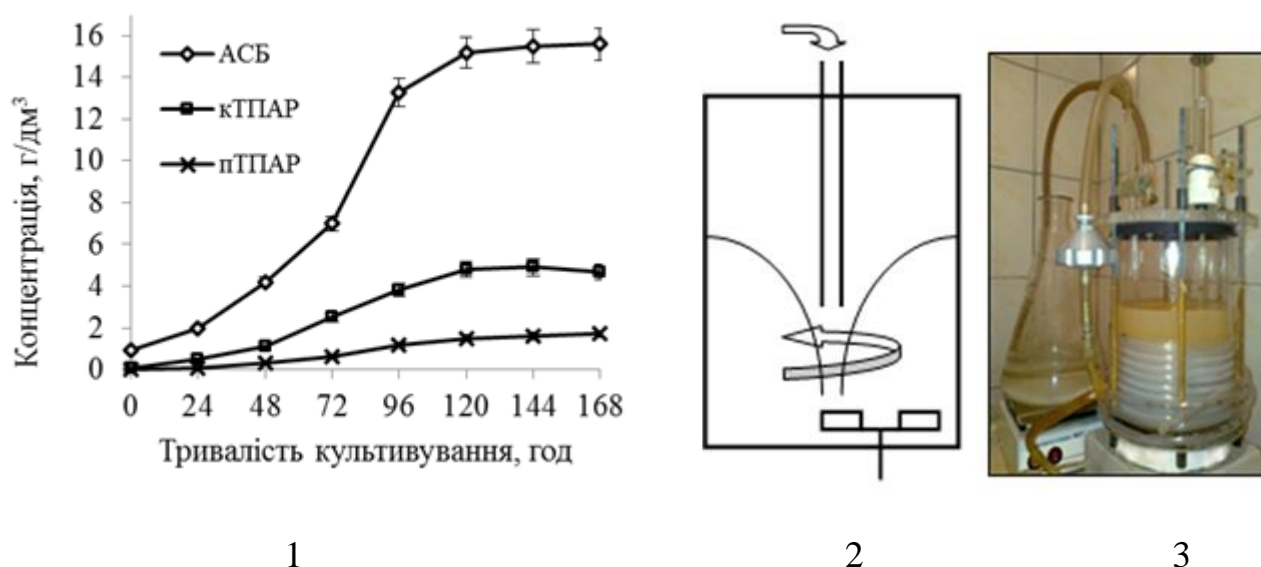


Рис.3.14. Динаміка синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 у біореакторі (1), принципова схема біореактора з вихровою системою аерації (2), культивування бактерій штаму *R. erythropolis* Au-1 в біореакторі: кТПАР – клітинно-зв'язані ТПАР, пТПАР – позаклітинні ТПАР.

Після 120 год ферментації отримано 15,2 г/дм³ АСБ, 4,8 г/дм³ клітинно-зв'язаних та 1,5 г/дм³ позаклітинних ТПАР, що на 41-50% перевищує вихід цільових продуктів порівняно із культивуванням у колбах.

Отже, біореактор з вихровою системою аерації є ефективним для застосування у біотехнології для отримання метаболітів ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1.

3.5. Відходи промисловості для отримання продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1

Для здешевлення біотехнології отримання метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 досліджено ефективність культивування продуцента на поживних середовищах з відходами промисловості: соєвого, ріпакового ФК, соняшникового, оливкового фузу, відпрацьованої (пересмаженої) соняшникової олії, технічного гліцерину (табл.3.5).

Таблиця 3.5.

Синтез ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 на відходах промисловості

Джерело азоту	АСБ, г/дм ³	Трегалозоліпідні ПАР, г/дм ³		ЕПК, г/дм ³	Поверхневий натяг СКР, мН/м
		Клітинно-зв'язані	Позаклітинні		
NaNO ₃	10,3±0,5	3,40*±0,16	1,00±0,05	2,20±0,11	37,0±1,5
CO(NH ₂) ₂	8,8±0,4	2,81±0,14	1,10±0,06	1,91±0,10	37,5±1,5
NH ₄ NO ₃	9,1±0,5	2,72±0,14	1,00±0,05	2,01±0,10	37,5±1,6
пептон	5,7±0,3	0,81±0,04	0,32±0,02	0,92±0,04	38,5±1,4
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5±0,2	0,50±0,02	0,21±0,01	0,81±0,04	39,0±1,7
дріжджовий екстракт	12,4±0,6	3,02±0,15	1,12±0,06	2,42±0,12	38,5±1,6

Примітки: АСБ – абсолютно суха біомаса; ЕПК – екзополісахаридний комплекс; ФК – фосфатидний концентрат; кТПАР – клітинно-зв'язані ТПАР; пТПАР – позаклітинні ТПАР; Пн – поверхневий натяг; E₂₄ – емульгувальна активність супернатанту культуральної рідини; результати достовірні за p≤0,05.

Показано, що всі досліджені субстрати дозволяють отримати високі виходи трегалозоліпідних ПАР (1,4-2,6 г/дм³) та ЕПК (2,9-9,5 г/дм³) штаму *R. erythropolis* Au-1. Виняток становить технічний гліцерин, що містить у

своєму складі сліди метанолу, який може бути причиною інгібування росту мікроорганізмів. При використанні відходів олійної промисловості отримані продукти складно очистити від залишків субстратів і, відповідно, достовірно визначити параметри росту бактерій.

На прикладі ріпакового ФК оцінено зміни в складі ТПАР, отриманих на різних вуглецевих субстратах: гексадекані та ріпаковому ФК (рис.3.15).

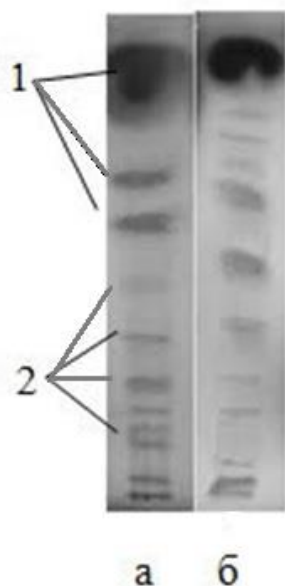


Рис. 3.15. ТШХ клітинно-зв'язаних ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1: джерело вуглецю – гексадекан (а) і ріпаковий фосфатидний концентрат (б); 1 – неполярні ліпіди; 2 – трегалозоліпіди.

Показано, що трегалозоліпідні ПАР, отримані на ріпаковому ФК, містять більше фосфатидів та жирних кислот. Це певною мірою впливає на вихід та властивості трегалозоліпідних ПАР (табл. 3.6.).

Таблиця 3.6.

Особливості синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 на ріпаковому фосфатидному концентраті

Джерело вуглецю	Трегалозоліпідні ПАР		
	Позаклітинні	Клітинно-зв'язані	
	Вихід, г/дм ³	Вихід, г/дм ³	Пн (розчин 0,5 г/дм ³), мН/м
Ріпаковий ФК	2,5±0,1	1,4±0,1	39,0±1,9
Гексадекан	1,0±0,1	3,4±0,2	35,0±1,7

Примітки: ФК – фосфатидний концентрат; Пн – поверхневий натяг; результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Показано, що вихід позаклітинних ТПАР зростає у 2,5 рази, а поверхневий натяг розчину ТПАР ($0,5 \text{ г/дм}^3$) – з 35 до 39 мН/м.

За використання ріпакового фосфатидного концентрату спостерігалось збільшення виходу ЕПК практично вдвічі. Аналіз його складу показав, що змінюється співвідношення вмісту вуглеводів, ліпідів та білків (табл.3.7).

Таблиця 3.7.

Особливості синтезу ЕПК штаму *R. erythropolis* Au-1 на ріпаковому ФК

Джерело вуглецю	Екзополісахаридний комплекс					
	Вихід, г/дм^3	Склад, %			Е ₂₄ (ЕПК 1 г/дм^3), %	Е ₂₄ СКР, %
		Вуглеводи	Ліпіди	Білки		
Сахароза	$5,0 \pm 0,2$	90,2	9,3	0,5	$42,0 \pm 0,5$	$48,0 \pm 0,5$
Ріпаковий ФК	$9,5 \pm 0,6$	70,9	26,6	2,5	$46,0 \pm 0,5$	$60,6 \pm 0,6$

Примітка: ЕПК – екзополісахаридний комплекс; ФК – фосфатидний концентрат; результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Як наслідок, індекс емульгування розчинів ЕПК (1 г/дм^3) досягав 46%, а емульгувальна активність СКР підвищувалась на 12% (табл. 3.7, рис. 3.16). При чому стійкість емульсій СКР з вазеліною оливою практично не змінювалась (рис.5.3).

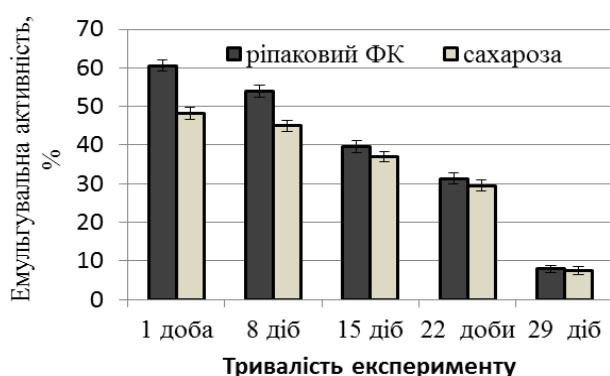


Рис. 3.16. Стійкість емульсій вазелінової оливи з супернатантом культуральної рідини штаму *R. erythropolis* Au-1.

Отже, при застосуванні відходів олійної промисловості показано на прикладі ріпакового ФК, що зростає вихід, змінюється склад та властивості ЕПК і трегалозоліпідних ПАР в порівнянні з використанням сахарози чи

гексадекану. У подальших експериментах було встановлено, що такі малоочищені продукти мають практичну цінність та є ефективними для рослинництва.

3.6. Способи виділення ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1

Важливою технологічною стадією, яка визначає собівартість цільових продуктів, є їх виділення та очистка. При розробленні біотехнології ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 практично цінними продуктами є як клітинно-зв'язані, так і позаклітинні ТПАР.

Оптимізація виділення ТПАР методом лінійних багатопараметрових рівнянь дала змогу кількісно пов'язати розчинність ТПАР із властивостями розчинників. Для цього проведено узагальнення отриманих експериментальних даних щодо екстракції трегалозоліпідних ПАР за допомогою модифікованого рівняння Коппеля-Пальма (3.1):

$$\lg P = a_0 + a_1 f(n^2) + a_2 f(\varepsilon) + a_3 B + a_4 E_T + a_5 \delta^2 + a_6 V_M \quad (3.1)$$

У таблиці 3.8 наведено отримані при екстракції кількості ТПАР, експериментальні і розраховані за рівнянням (3.4) значення логарифмів $\lg P$ та їх відхилень від експерименту – $\Delta \lg P$.

Таблиця 3.8.

Експериментальні та розраховані кількості ТПАР при екстракції різними розчинниками

№ п/п	Екстрагент	P, г/дм ³	P, г/моль	lg P		
				експеримент	розрахунок	Δ
1	Гексан*	0,8656±0,0403	0,1130	-0,9469	-0,0823	0,8646
2	н-Октан	1,1448±0,0521	0,1860	-0,7305	-0,6882	0,0423
3	Бензол	2,0423±0,0985	0,1820	-0,7399	-0,7149	0,0250
4	Толуол	1,2312±0,0602	0,1310	-0,8827	-0,9944	-0,1117
5	1,2-Дихлоретан	1,2029±0,0598	0,0950	-1,0223	-0,9662	0,0561
6	Хлороформ	2,7081±0,1255	0,2180	-0,6615	-0,6663	-0,0048

7	Тетрахлорметан	2,0609±0,1125	0,1990	-0,7011	-0,6451	0,0560
8	Ізобутанол	4,8991±0,2145	0,4530	-0,3439	-0,3656	-0,0217
9	т-Бутанол	2,0638±0,1052	0,2340	-0,6308	-0,5931	0,0377
10	Пентанол-2	2,5573±0,1156	0,1980	-0,7033	-0,7216	-0,0183
11	Етилацетат*	1,7608±0,0801	0,1720	-0,7645	-0,4967	0,2678
12	н-Бутилацетат*	2,0938±0,0985	0,2760	-0,5591	-0,9025	-0,3434
13	Діетиловий ефір	4,3986±0,2005	0,4570	-0,3401	-0,4008	-0,0607

Примітки: P – маса ТПАР; * - розчинники, які виключені із розрахунків.

При виділенні трегалозоліпідних ПАР розчинниками різної природи показано, що найбільший вихід біосурфактантів отримано за екстракції ізобутанолом (4,9 г/дм³) та діетиловим ефіром (4,4 г/дм³) (табл.3.6).

Узагальнення даних вищенаведеної таблиці для всіх 13 розчинників привело до рівняння з досить низьким коефіцієнтом множинної кореляції ($R = 0,7482$). Проте, виключення із розрахунків даних для трьох розчинників, а саме гексану, н-бутилацетату і етилацетату дозволяє отримати рівняння з вищим коефіцієнтом кореляції:

$$\lg P = 2,8367 - (13,1373 \pm 1,2215)f(n^2) - (7,1152 \pm 0,6173)f(\varepsilon) + \\ + (0,0007 \pm 0,0002)V + (0,0989 \pm 0,0149)E_T - (0,0014 \pm 0,0006)\delta^2 - \\ -(0,0108 \pm 0,0010)V_M \quad (3.2)$$

$$R = 0,9877; s \pm 0,0328.$$

Досить висока величина множинного коефіцієнту кореляції вказує на адекватність одержаного рівняння. Знаки при окремих членах рівняння свідчать, що тільки основність і електрофільність розчинника сприяють процесу переходу біоПАР в органічну фазу.

Згідно з (Makitra, 2004), проведено перевірку значимості членів рівняння шляхом їх почергового виключення з обчислень. Встановлено, що член, який відповідає квадрату параметра розчинності Гільдебрандта δ , є незначимим, тож після його виключення одержано п'ятипараметрове рівняння (3.3):

$$\lg P = 3,6429 - (14,3265 \pm 1,4964)f(n^2) - (6,2932 \pm 0,7001)f(\varepsilon) +$$

$$+ (0,0005 \pm 0,0002)B + (0,0648 \pm 0,0091)E_T - (0,0105 \pm 0,0013)V_M \quad (3.3)$$

$$R = 0,9784; s \pm 0,0434.$$

Основність розчинників сприяє процесу переходу біоПАР в органічну фазу, але цей вплив є незначним, тому виключення з розрахунків члена, що характеризує вищезгадану властивість розчинників, приводить до чотиріпараметрового рівняння (3.4) з $R = 0,9652; s \pm 0,0549$.

$$\begin{aligned} \lg P = 4,1684 - (16,3173 \pm 1,5481)f(n^2) - (6,5706 \pm 0,8716)f(\varepsilon) + \\ + (0,0707 \pm 0,0110)E_T - (0,0114 \pm 0,0015)V_M \end{aligned} \quad (3.4)$$

Як видно, множинний коефіцієнт кореляції знижується не суттєво. Незначимість цих членів можна пояснити розривом відповідних асоціативних зв'язків. Після подальшого виключення із розрахунків членів $f(\varepsilon)$, E_T , V_M коефіцієнт кореляції одержаних рівнянь різко зменшується: R 0,70-0,79. Ще більше впливає виключення поляризованості, R знижується до 0,2971, що підтверджує визначальний вплив на екстракцію неспецифічної сольватації.

Показано, що між обчисленими за рівнянням (3.4) та експериментальними значеннями $\lg P$ є лінійна залежність, більшість точок вкладається у коридор помилок $s \pm 0,0434$, значимі відхилення спостерігаються для толуолу (рис.3.17).

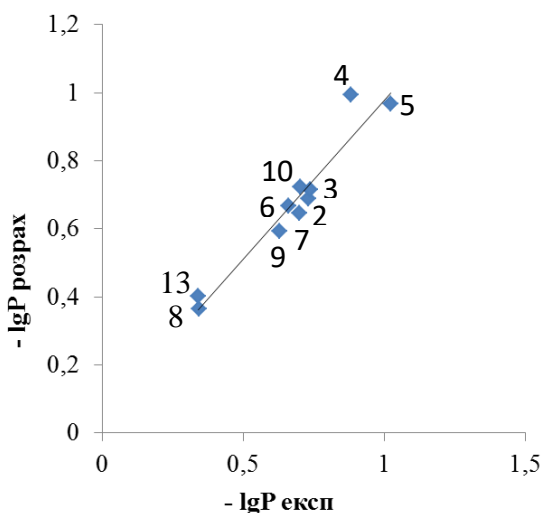


Рис. 3.17. Залежність між обчисленими та експериментальними значеннями $\lg P$: P - маса трегалозоліпідних ПАР.

На основі експериментальних даних показано, що кращими екстрагентами для трегалозоліпідних ПАР є розчинники, які проявляють високу поляризовуючу здатність, а саме ізобутанол, у молекулі якого є ОН-група, і діетиловий ефір

(завдяки наявності неподіленої електронної пари кисню), незважаючи на відносно низьку молекулярну масу цих екстрагентів. Це повністю підтверджується розрахунками, адже збільшення мольного об'єму за рівнянням (3.4) не впливає на перехід речовини в органічну фазу. Разом з тим, можна передбачати, що найкращими розчинниками для екстрагування біоПАР були б третинні аміни за рахунок наявності неподіленої електронної пари, але із-за можливого екранування її радикалами, це припущення потребує подальших експериментальних досліджень.

Таким чином, на основі експериментальних даних з екстракції трегалозоліпідних ПАР та їх оброблення за допомогою лінійних багатопараметрових рівнянь встановлено, що оптимальними екстрагентами є розчинники з високою поляризуючою здатністю щодо молекул біоПАР (діетиловий ефір, ізобутанол). Беручи до уваги високу температуру кипіння ізобутанолу (107,89°C), високу вогне- та вибухонебезпечність діетилового ефіру, використання цих розчинників для виділення позаклітинних та клітинно-зв'язаних ТПАР з культуральної рідин є не доцільним.

Спосіб виділення біосурфактантів шляхом екстракції із загального об'єму культуральної рідини є не практичним, оскільки вимагає застосування значних об'ємів розчинників. Опрацьовано раціональні способи виділення ТПАР:

- сепарація біомаси з наступною екстракцією клітинно-зв'язаних ТПАР розчинниками;

- сорбція на носіях позаклітинних ТПАР та їх подальша екстракція.

Екстракцію клітинно-зв'язаних ТПАР проводили із відсепарованої біомаси штаму *R. erythropolis* Au-1 різними розчинниками (табл. 3.9).

Таблиця 3.9.

Екстракція клітинно-зв'язаних ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1

Розчинники	Трегалозоліпідні ПАР, г/г АСБ
метанол	0,20±0,01
етанол	0,29±0,02

хлороформ	0,24±0,01
ізопропанол	0,23±0,01
етилацетат	0,19±0,01
гексан	0,21±0,01
хлороформ-ізопропанол 2:1	0,31±0,02
хлороформ-метанол 2:1	0,33±0,02

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

Так, найбільшу кількість клітинно-зв'язаних ТПАР отримано при екстракції сумішами хлороформ-ізопропанол 2:1 або хлороформ-метанол 2:1 (0,31-0,33 г ТПАР з 1 г АСБ відповідно). Ефективним є застосування етанолу, що дозволяє отримати 0,29 г ТПАР/1 г АСБ, що є на 17-34% більше, ніж при використанні інших досліджуваних розчинників (не беручи до уваги суміші). Встановлено, що в складі ТПАР, виділених етанолом, присутні незначні кількості жирних кислот та вищих спиртів, порівняно із використанням інших екстрагентів (рис.3.18).

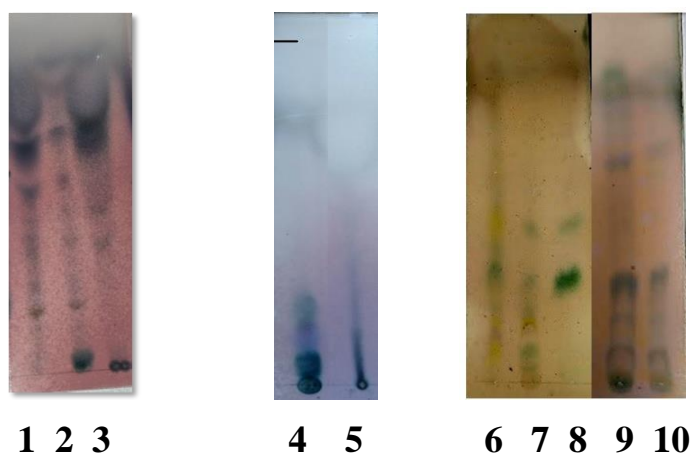


Рис .3.18. ТШХ клітинно-зв'язаних трегалозоліпідних ПАР, отриманих екстракцією 1 – сумішшю Фолча (хлороформ-метанол 2:1), 2 – етанолом, 3 – етилацетатом, 4 – метанолом, 5 – ізопропанолом; ТШХ позаклітинних ТПАР, отриманих екстракцією сумішшю Фолча (6); сорбцією натрій альгінатом (7), композитними адсорбентами на основі CuO (8), MnO (9), CoO (10).

Отже, перевагами етанолу як екстрагента ТПАР є:

- висока ефективність екстракції (0,29 г ТПАР з 1 г АСБ, в складі отриманих біоПАР відзначається незначний вміст неполярних ліпідів);
- вартість на 30-45% нижча, ніж альтернативних сумішей хлороформ-метанол (2:1) або хлороформ-ізопропанол (2:1);
- безпечність у використанні.

Таким чином, обґрунтовано застосування етанолу як економічно доступного і безпечного екстрагента ТПАР.

Сорбція позаклітинних ТПАР. Розроблено нові способи виділення позаклітинних ТПАР за використання біополімеру натрій альгінату або магніточутливих багат шарових композитних адсорбентів типу «ядро-оболонка» на основі оксидів перехідних металів (CuO, CoO, MnO). Запропоновані підходи дозволяють сконцентрувати ТПАР, а потім виділити їх шляхом екстракції етанолом.

Показано, що композитні адсорбенти на основі оксидів металів дозволяють селективно виділити трегалозоліпіди. Так, при використанні композиту з CuO отримано 0,88 г/дм³ позаклітинних ТПАР (рис.3.19), методом ТШХ визначено, що до їх складу входять трегалозоліпіди без домішок інших речовин (рис.3.18).

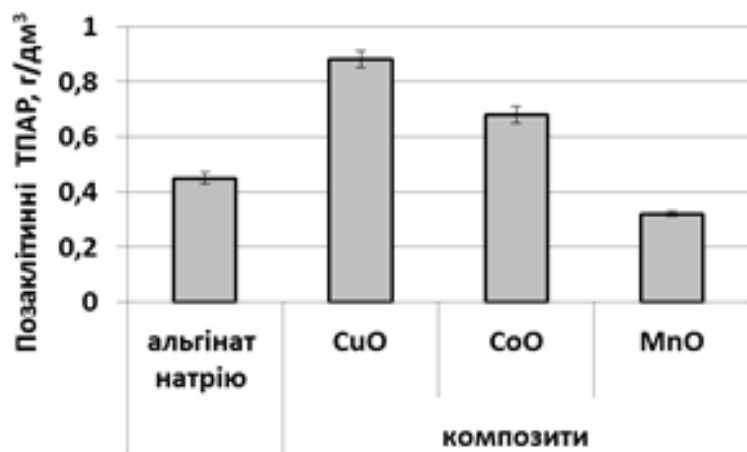


Рис. 3.19. Ефективність методів виділення ТПАР з СКР штаму *R. erythropolis* Au-1.

Перевагами використання композитних адсорбентів є:

1. заміна енергозатратного процесу сепарації шляхом центрифугування на осадження за допомогою зовнішнього магнітного поля;
2. можливість їх багаторазового використання, оскільки після екстракції ТПАР отримуємо вихідні композити.

Біополімер натрій альгінат володіє меншою ефективністю: кількість виділених з СКР позаклітинних ТПАР становила 0,45 г/дм³.

Отже, ефективними методами виділення ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 є екстракція клітинно-зв'язаних ТПАР з біомаси клітин, а позаклітинних – їх сорбція композитами з CuO з подальшою екстракцією. Обґрунтовано використання етанолу як ефективного екстрагенту.

Висновки до розділу 3

У результаті скринінгу штамів актинобактерій виду *Rhodococcus erythropolis* за здатністю до синтезу ПАР відібрано штам *R. erythropolis* Au-1, який синтезує позаклітинні та клітинно-зв'язані ТПАР, екзополісахаридний комплекс, а також клітинний біополімер – полігідроксиалканоат.

Охарактеризовано практично цінні метаболіти штаму *R. erythropolis* Au-1: трегалозоліпідні ПАР, ЕПК, ПГА та супернатант культуральної рідини.

Підібрано раціональний склад ферментаційного поживного середовища цього штаму та вивчено динаміку росту на обраному середовищі у біореакторі з вихровою системою аерації. Встановлено доцільність застосування відходів виробництв, зокрема рослинних фосфатидних концентратів, фузів або пересмаженої олії, для синтезу ПАР бактеріями *R. erythropolis* Au-1. При цьому вихід АСБ становив 10,1-11,7 г/дм³, клітинно-зв'язаних ТПАР – 1,4-1,7 г/дм³ та позаклітинних – 2,4-2,6 г/дм³.

Вперше, використовуючи метод лінійних багатопараметрових рівнянь, кількісно пов'язано розчинність ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 із властивостями розчинників. Показано, що оптимальними екстрагентами є розчинники з підвищеною поляризуючою здатністю щодо молекул біоПАР (діетиловий ефір, ізобутанол).

Обґрунтовано використання етанолу як ефективного, безпечного та економічно доступного екстрагента клітинно-зв'язаних ТПАР (вихід ТПАР – 0,29 г з 1 г АСБ). Розроблено нові підходи для виділення позаклітинних ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 з використанням натрій альгінату (вихід ТПАР – 0,45

г/дм³) або багатошарових композитів на основі оксидів металів (0,32-0,88 г/дм³ ТПАР). Визначено, що найбільш перспективними є композити на основі CuO, які дозволяють отриманти 0,88 г/дм³ ТПАР без домішків неполярних ліпідів.

Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:

1. Koretska, N.I.; Prystay, M.V.; Karpenko, E.V. Rape phosphatide concentrate in the technologies of surfactants production by the *Actinobacteria*. *Ukrainian food journal*, **2014**, 3 (3), pp. 429-436.

2. Корецька, Н.І.; Пристай, М.В.; Карпенко, О.В. Біосинтез та властивості поверхнево-активних речовин штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1. *Вісник НУ «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2014, 787, с.258-263.

3. Корецька, Н.І.; Мідяна, Г.Г.; Карпенко, О.В. Оптимізація екстракції трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1. *Innovative biosystems and bioengineering*. 2018. 2 (4), с. 246–251. <https://doi.org/10.20535/ibb.2018.2.4.148935>.

РОЗДІЛ 4

ТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ПАР ШТАМУ *R.erythropolis* Au-1

4.1. Принципова технологічна й апаратурно-технологічна схеми процесу отримання продуктів штаму *R.erythropolis* Au-1

Результати проведених досліджень стали підґрунтям для розроблення технології виробництва цільових продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1. Новизною біотехнології є одержання 5 товарних форм: супернатант культуральної рідини (1), клітинно-зв'язані ТПАР (2), позаклітинні ТПАР (3), екзополісахаридний комплекс (4), полігідроксиалканоати (5). Таке виробництво може бути реалізоване з використанням стандартного біотехнологічного обладнання. Особливістю цієї технології є використання ферментера з вихровою системою аерації. Даний ферментер можна легко сконструювати з ферментера з нижньопривідною мішалкою. Ця конструкція є ефективною при малотонажному виробництві, оскільки коефіцієнт масопереносу за киснем є у кілька разів вищий, ніж за барботажною аерацією, і це зменшує витрату кисню для забезпечення необхідного рівня аерації і, відповідно, енергозатрати (Карпенко та ін., 2012; Пристай, 2012; Єрохін, 2015; Покинсьброда, 2018). Основний технологічний процес (ТП) включає лабораторну та виробничу стадії отримання посівного матеріалу, виробничу ферментацію та стадії виділення продуктів (Сидоров та ін., 2008). Тому основні етапи одержання ТПАР складаються із приготування посівного матеріалу, культивування у ферментері, сепарації біомаси з культуральної рідини, осадженні та екстракції, сушінні позаклітинних ТПАР з СКР, екстракції, сушінні клітинно-зв'язаних ТПАР, осадженні та сушінні ЕПК, виділенні ПГА з відпрацьованої біомаси. Допоміжні роботи включають: санітарну підготовку виробництва (приміщень та обладнання, мийних і дезинфікувальних розчинів), стерилізацію апаратів, технологічного повітря, поживних середовищ,

регенерацію розчинників. Апаратурно-технологічну схему процесу отримання продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1 наведено на рис. 4.1.

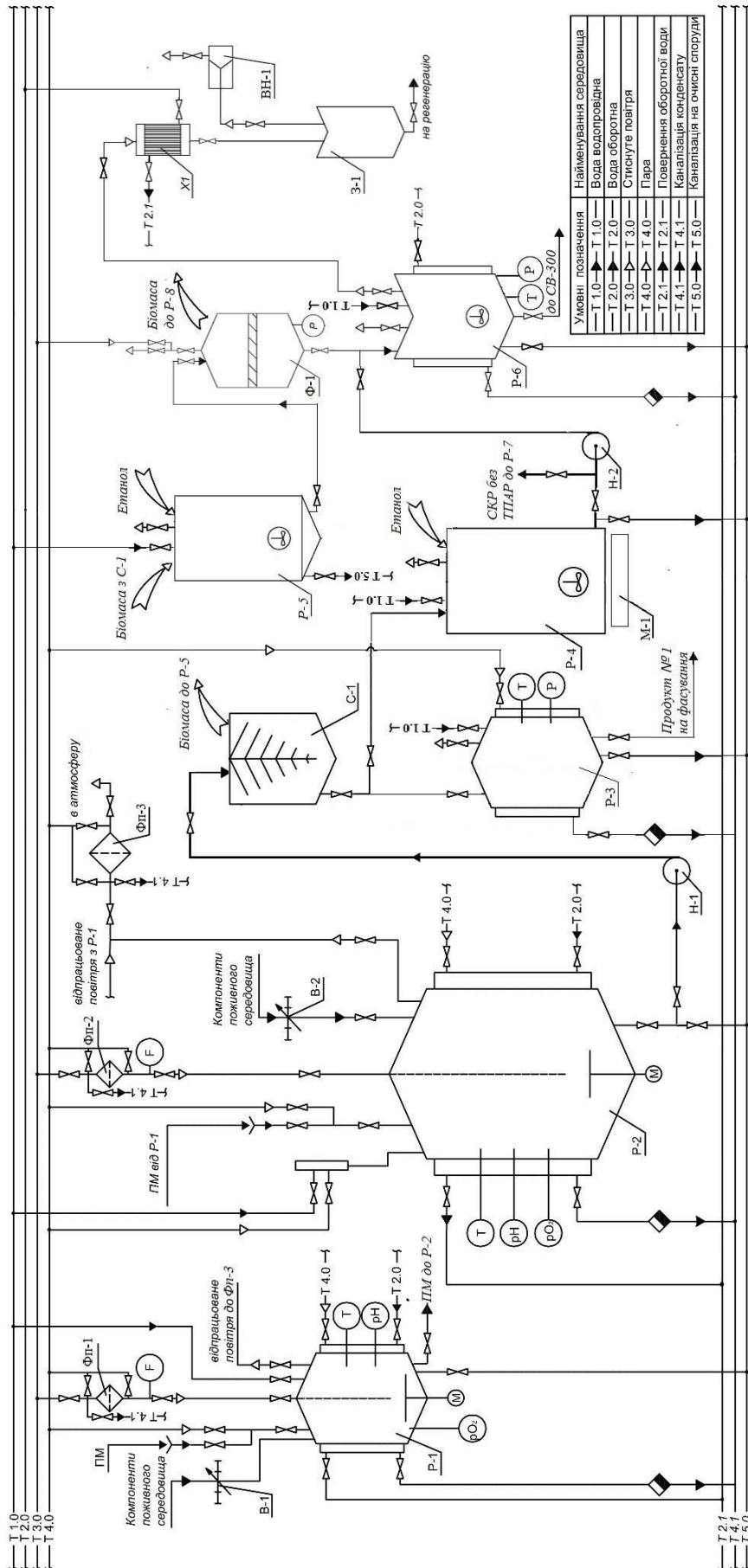


Рис. 4.1 – Апаратурно-технологічна схема одержання продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1: Фл-1,2 – фільтри для стерилізації повітря; Фл-3 – фільтр відпрацьованого повітря; В-1,2 – ваги; Р-1 – інокулятор; Р-2 – виробничий ферментер; Н-1,2 – відцентрові насоси; С-1 – сепаратор; Р-3 – ємність для стерилізації СКР; Р-4 – реактор для виділення позаклітинних ТПАР; М-1 – магніт; Р-5 – реактор для екстракції клітинно-зв'язаних ТПАР; Ф-1 – фільтр; Р-6 – реактор для упарювання екстракту; Х-1 – холодильник; 3-2 – збірник для розчинника;

Розроблено технологічну схему одержання продуктів штаму *R.erythropolis* Au-1 (рис.4.2).

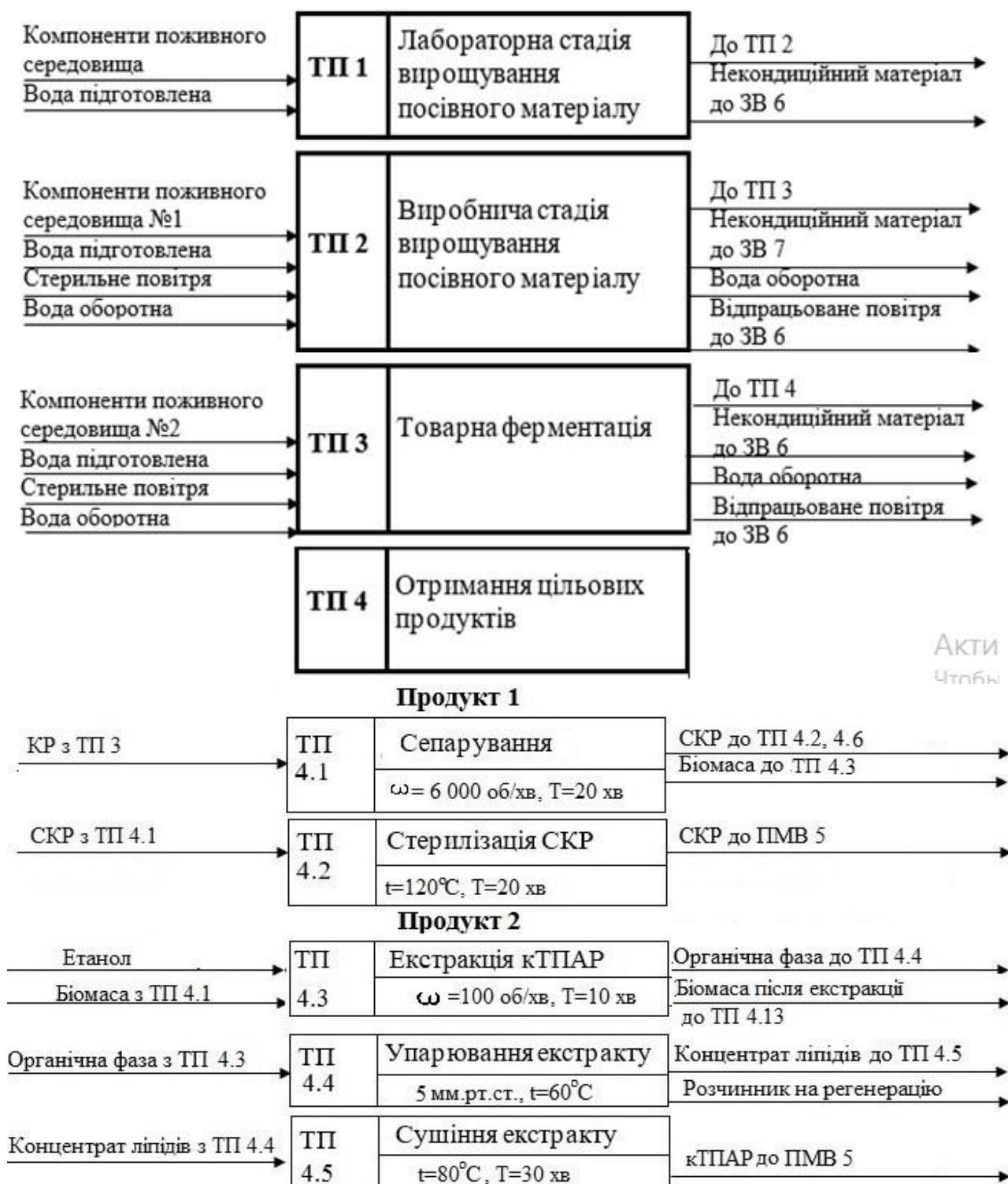


Рис. 4.2. Принципова технологічна схема одержання продуктів штаму *R.erythropolis* Au-1: кТПАР – клітинно-зв'язані трегалозоліпідні ПАР; СКР – супернатант культуральної рідини.

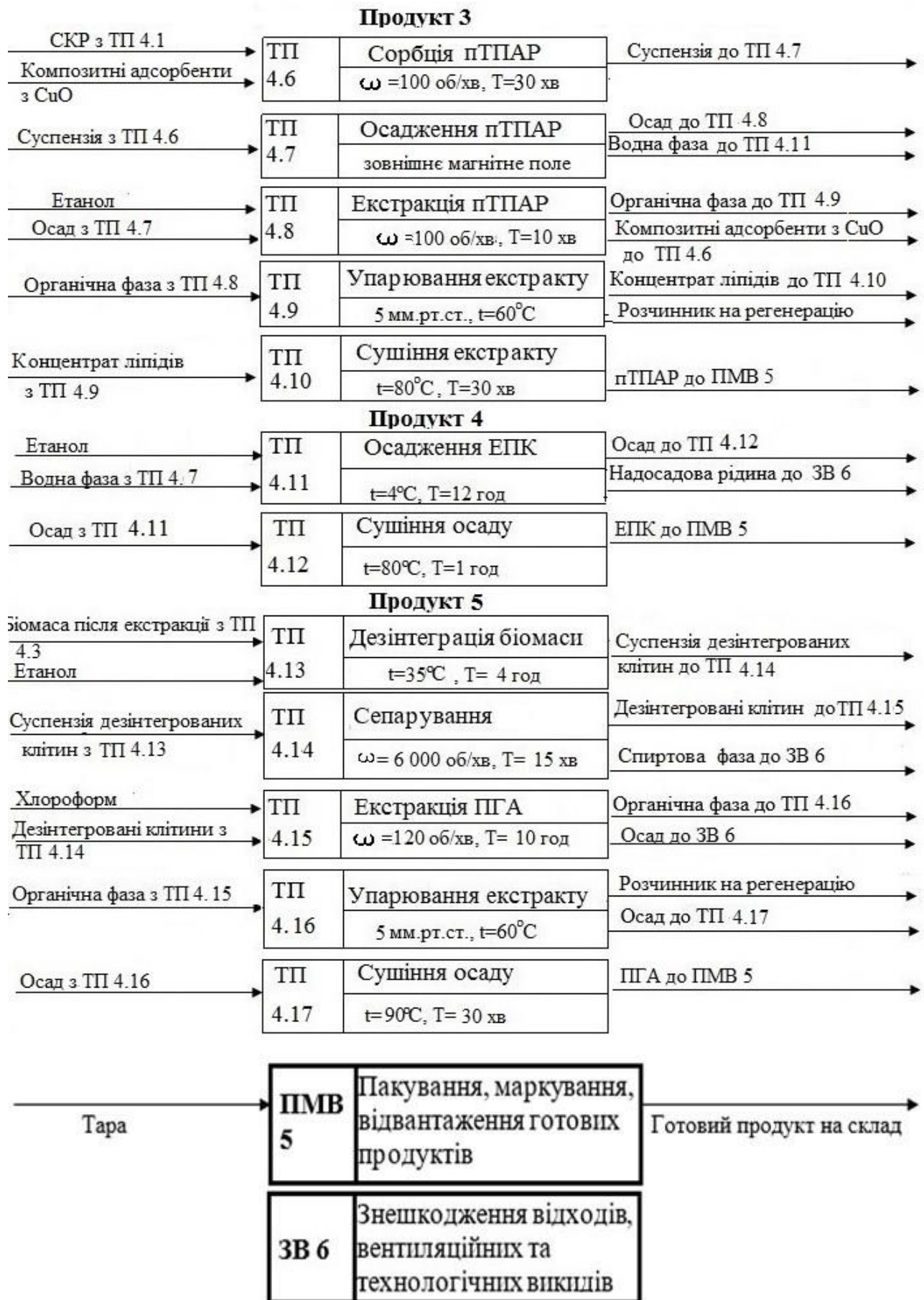


Рис. 4.2. Принципова технологічна схема одержання продуктів штаму *R.erythropolis* Au-1 (продовження).

4.2.Опис технологічного процесу одержання продуктів *R.erythropolis* Au-1

ТП 1. Лабораторна стадія вирощування посівного матеріалу

ТП 1.1. Підтримання музейної культури

Музейну культуру *R. erythropolis* Au-1 зберігають у пробірках з агаризованим поживним середовищем під мінеральною оливою. Для підтримання активності культуру пересівають у пробірки зі свіжим середовищем 1 раз на рік. Всі роботи з музейною культурою проводяться в строго асептичних умовах (Герхардт, 1983).

ТП 1.2. Підготування середовища для лабораторної стадії вирощування посівного матеріалу

Для культивування бактерій штаму *R. erythropolis* Au-1 у колбах на ротаційній качалці використовують поживне середовище наступного складу (г/дм³): K₂HPO₄ – 2,0; KH₂PO₄ – 2,0; NaNO₃ – 3,0; MgSO₄×7H₂O – 0,1; Na₃C₆H₅O₇ ×2H₂O – 1,0; дріжджовий екстракт - 1,0; сахароза – 30; вода – до 1дм³. Поживне середовище стерилізують в автоклаві за температури 132 °С впродовж 20 хв та охолоджують.

ТП 1.3. Культивування продуцента в колбах на качалках. Для вирощування рідкого посівного матеріалу першої генерації у колбах відбирають 8 дм³ стерильного середовища (див. ТП 1.2) і розливають у стерильні колби об'ємом 2 дм³ по 0,4 дм³.

У пробірки з робочою культурою *R.erythropolis* Au-1 вносять по 5 см³ фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колби з рідким поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки (Гудзь та ін., 2014). Колби ставлять на качалкову установку з частотою обертання 220 об/хв на 48 год за температури 28-30°C. Одержаний посівний матеріал перевіряють на відсутність контамінантної мікрофлори розсівом на поживний агар і мікроскопіюванням. Посівний матеріал в колбах може зберігатися не більше 8-12 год в холодильній камері.

Перевірений посівний матеріал використовується для засіву інокулятора (Р-1).

ТП 2. Виробнича стадія культивування посівного матеріалу (в інокуляторі)

Інокулятор Р1 – це ємність об'ємом 0,1 м³ з мішалкою, обладнана датчиками температури, рН і концентрації розчиненого кисню (рО₂). Для вирощування рідкого посівного матеріалу другої генерації поживне середовище стерилізують у інокуляторі Р-1. Для стерилізації поживного середовища в інокулятор завантажують водопровідну воду, компоненти поживного середовища. В оболонку апарата подають глуху пару. При закритому повітрянику суміш, перемішуючи, нагрівають до 120-125°С. З метою стерилізації витримують її впродовж 20 хв. В оболонку подають зворотну воду, за рахунок чого стерильне поживне середовище охолоджується до температури ферментації. Після досягнення температури 100°С апарат з'єднують з атмосферою через індивідуальний фільтр (Сидоров, 2008).

Посівний матеріал, вирощений у качалочних колбах, переносять в апарат Р-1, створюючи кільцеву зону полум'я навколо посівного штуцера. Для засіву інокулятора Р-1 в апарат вносять 8 дм³ посівного матеріалу (10 % від об'єму, що засівається). Тривалість культивування посівного матеріалу в інокуляторі становить 48 год.

Проводять мікробіологічний контроль одержаного посівного матеріалу (мікроскопіювання та висів на поживний агар). Допускається, але не рекомендується, зберігання посівного матеріалу упродовж 6-8 год в інокуляторі в охолодженому стані (12-15°С), далі передають на посів у ферментер Р-2.

ТП 3. Виробнича ферментація

ТП 3.1. Приготування і стерилізація компонентів поживного середовища для виробничого біосинтезу. Для вирощування штаму *R. erythropolis* Au-1 у виробничому ферментері Р-2 об'ємом 1 м³ з робочим об'ємом 0,8 м³ використовують поживні середовища наступного складу (г/дм³): К₂НРО₄ – 2,0; КН₂РО₄ – 2,0; NaNO₃ – 3,0; MgSO₄×7H₂O – 0,1; Na₃C₆ H₅O₇

$\times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; дріжджовий екстракт - 1,0; гексадекан – 20; вода – до 1дм^3 . Доводять рН середовища до 6,5–7,0 стерильним розчином HCl або NaOH . Поживне середовище для культивування готують безпосередньо у ферментері Р-2, далі його стерилізують, охолоджують до 30°C і встановлюють тиск $0,04\pm 0,01$ МПа.

ТП 3.2 Культивування продуцента у ферментері. Засів ферментера Р-2 проводять посівним матеріалом, вирощеним в інокуляторі Р-1. Кількість посівного матеріалу складає 10 % від об'єму поживного середовища. Засів проводять по посівній лінії, яку стерилізують гострою парою (1 год, $p=0,18\text{--}0,20$ МПа). Включають перемішувальний пристрій на 3-5 хв (150-200 об/хв) і слідкують за показниками датчика $p\text{O}_2$. При зниженні показника до 20 % встановлюють мінімальні витрати повітря і мінімальні оберти мішалки. Процес здійснюють за показниками датчика $p\text{O}_2$, (30-40 % від насичення повітрям). Концентрацію розчиненого кисню підтримують на заданому рівні при одночасному збільшенні як витрат повітря так і швидкості перемішування (Єрохін, 2015). У процесі культивування кожні 5 год здійснюють мікробіологічний контроль (розсів на поживний агар та мікроскопіювання), визначають кількість синтезованих ТПАР ваговим методом. Тривалість культивування складає 120 год.

Одержана культуральна рідина повинна відповідати наступним параметрам: АСБ – $14,5\text{--}16$ г/дм³, клітинно-зв'язаних ТПАР – $4,5\text{--}5,1$ г/дм³; позаклітинних ТПАР – $1,4\text{--}1,6$ г/дм³.

ТП 4 Отримання цільових продуктів

Продукт № 1 Супернатант культуральної рідини

ТП 4.1. Сепарування. Постферментаційну культуральну рідину з ферментера Р-2 подають у сепаратор С-1. Після сепарування СКР подають у реактор Р-3 (продукт – СКР) або Р-4 (для отримання продуктів № 3 та 4), а біомасу – у реактор Р-5.

ТП 4.2. Стерилізація СКР. В оболонку реактора Р-3 подають глуху пару і нагрівають СКР до 120-125°C, витримують упродовж 20 хв., охолоджують і подають на стадію фасування.

Продукт № 2. Клітинно-зв'язані трегалозоліпідні ПАР

ТП4.3. Екстракція ТПАР. У збірнику Р-3 біомасу перемішують з етанолом (10 хв, 100 об/хв) і залишають для розділення фаз. Органічну фазу через фільтр Ф-1 відбирають у реактор Р-6, а біомасу подають у реактор Р-8 для виділення продукту № 5.

ТП4.4. Упарювання (концентрування) екстракту. В сорочку реактора Р-6 подають гарячу воду і нагрівають екстракт до 60°C, за допомогою вакуумного насосу ВН-1 створюють розрідження і концентрують екстракт. Розчинник через теплообмінник з холодоагентом Х-1 попадає в ресивер З-1, з якого подається на регенерацію.

ТП4.5 Сушіння екстракту. Концентрат ліпідів з реактора Р-6 переносять у вакуум-сушильну шафу СВ-300 (80°C, 30 хв). Висушений продукт №2 (клітинно-зв'язані ТПАР) передають на фасування.

Продукт № 3. Позаклітинні трегалозоліпідні ПАР

ТП4.6. Сорбція позаклітинних ТПАР. СКР після сепаратора С-1 подають у збірник Р-4, в якому є магніточутливі багатошарові композити на основі CuO. Включають мішалку і перемішують 10 хв при 100 об/хв.

ТП 4.7. Осадження позаклітинних ТПАР. Піддають дії магніту М-1 для осадження композитів із сорбованими ТПАР. Водну фазу (СКР без позаклітинних ТПАР) подають у реактор Р-7, а з отриманого осаду екстрагують ТПАР.

ТП4.8. Екстракція позаклітинних ТПАР. У збірник Р-4 подають етанол і включають перемішувальний пристрій на 10 хв при 100 об/хв. Повторно піддають дії магніту М-1. Органічну фазу подають у реактор Р-6, а осад (композити на основі CuO) використовують для наступного виділення позаклітинних ТПАР.

ТП4.9. Упарювання (концентрування) екстракту. У реакторі Р-6 почергово концентрують позаклітинні та клітинно-зв'язані ТПАР. Упарювання позаклітинних ТПАР відбувається аналогічно ТП 4.4.

ТП4.10. Сушіння екстракту. Концентрат ліпідів з реактора Р-6 переносять у вакуум-сушильну шафу СВ-300 (80°C, 30 хв). Висушений продукт №3 (позаклітинні ТПАР) передають на фасування.

Продукт № 4. Екзополісахаридний комплекс

ТП 4.11. Осадження ЕПК. До СКР, який надійшов з Р-4 у реактор Р-7, додають етанол, охолоджують подачею холодоагента у сорочку апарата до 4°C і відстоюють 8-12 год, щоб випав осад ЕПК.

ТП 4.12. Сушіння осаду ЕПК. Отриманий осад подається на фільтр Ф-2, що працює під тиском, для концентрування осаду ЕПК. Концентрат осаду подають у вакуум-сушильну шафу СВ-300 (80°C, 1 год). Висушений продукт №4 (екзополісахаридний комплекс) подається на стадію фасування.

Продукт № 4. Полігідроксиалканоати

ТП 4.13. Дезінтеграція біомаси. Відпрацьовану біомасу (після екстракції клітинно-зв'язаних ТПАР) подають у реактор Р-8, куди подають етанол. У сорочку реактора Р-8 подають гарячу воду і нагрівають при перемішуванні спиртову суміш до 35°C. Дезінтеграція біомаси під дією етанолу проходить при перемішуванні (100 об/хв) протягом 2 год. Спиртова суспензія дезінтегрованих клітин надходить у сепаратор С-2.

ТП 4.14. Сепарування дезінтегрованої біомаси. У сепараторі С-2 дезінтегровані клітини відділяють від спиртової фази при 6000 об/хв протягом 15 хв та направляють на екстракцію у реактор Р-9.

ТП 4.15. Екстракція ПГА. У реакторі Р-9 до дезінтегрованих клітин додають хлороформ. У сорочку реактора Р-9 подають гарячу воду і нагрівають при перемішуванні суміш до 35°C. Екстракція ПГА хлороформом проходить при перемішуванні (120 об/хв, 10 год), тоді через фільтр Ф-3 екстракт направляють в реактор Р-10. Осад відпрацьованих дезінтегрованих клітин передають на утилізацію.

ТП 4.16. Упарювання екстракту. Подачею гарячої води у сорочку реактора Р-10 екстракт нагрівають до 60°C. За допомогою вакуумного насосу ВН-2 створюють розрідження і концентрують продукт. Розчинник через теплообмінник з холодоагентом Х-2 попадає в ресивер З-2, з якого подається на регенерацію.

ТП 4.17. Сушіння осаду ПГА. Концентрат ПГА з реактора Р-10 переносять у вакуум-сушильну шафу СВ-300 (90°C, 0,01 атм, 1 год). Висушений продукт №5 (полігідроксиалканоати) передають на фасування.

ПМВ 5. Фасування, пакування, маркування, відвантаження продукту. Продукт № 1 (супернатант культуральної рідини) фасується у поліетиленові каністри об'ємом 2 дм³. Термін зберігання (за температури не вище 5 °С) – 3 місяці. Продукт № 2 (клітинно-зв'язані ТПАР), № 3 (позаклітинні ТПАР), №4 (екзополісахаридний комплекс) та продукт №5 (полігідроксиалканоати) пакуються у герметичні поліетиленові пакети масою 10г, 50г або 100 г. Термін зберігання (за температури не вище 10 °С) – 2 роки. Маркування виконується державною мовою, за домовленістю – додатково іншою мовою. На кожен пакувальну одиницю наносять наступні дані: назва підприємства-виробника, адреса, товарний знак, назва продукту, склад, номер партії, маса нетто, дата виготовлення, термін придатності до використання.

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 (Сидоров, 2008). Дана стадія забезпечує екологічну безпеку виробництва даних продуктів.

ЗВ 6.1. Нейтралізація та каналізування стоків. 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 (Сидоров, 2008). Розчинники після екстракції ТПАР та ПГА подаються на регенерацію.

ЗВ 6.2. Очистка повітряних викидів. Очистка повітря від механічних домішок здійснюється в циклонах (Сидоров, 2008). Очищене повітря йде в атмосферу, а твердий осад – змішується зі стоками (ЗВ 6.1) і подається на біологічну очистку.

4.3. Розрахунок економічної ефективності розробленої технології отримання ТПАР штаму *R.erythropolis* Au-1

Економічну доцільність технології нового продукту оцінюють за її собівартістю, яка є грошовим виразом витрат підприємства на виробництво і реалізацію цієї продукції (Посилкіна та ін., 2016). У промисловості найчастіше застосовуються 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.

Економічну ефективність розраховували по статтях витрат, які були оптимізовані у роботі: витрати на сировину та матеріали і витрати на електроенергію. Щоб визначити їх вплив на загальний економічний ефект технології (Посилкіна і Сагайдак, 2004), проаналізовано економічні показники для одержання 1 кг ТПАР у різних умовах:

- 1) у колбах;

2) у ферментері з вихровою системою аерації.

Витрати на сировину і матеріали, які використовуються для отримання ТПАР, розраховуються за формулою:

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

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

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

У даному випадку в якості сировини виступають компоненти поживного середовища та розчинники для екстракції ТПАР (ціни з каталогів реактивів <https://sfera.com.ua>, <https://www.systopt.com.ua>, <https://www.covalent.com.ua>, <https://www.metab.com.ua> за 2020 рік). При розрахунку брали до уваги, що у колбах з 1 дм³ поживного середовища отримували 10,3 г АСБ та 4,4 г/ дм³ ТПАР (3,4 г/дм³ клітинно-зв'язаних ТПАР і 1,0 г/дм³ позаклітинних ТПАР), необхідна кількість розчинника для виділення клітинно-зв'язаних ТПАР: 25 см³ на 1 г АСБ, що в перерахунку становить 75,76 см³ екстрагента на 1 г клітинно-зв'язаних ТПАР (для суміші Фолча: хлороформ – 50,51 см³, метанол – 25,25 см³); для позаклітинних ТПАР: 1 дм³ екстрагента на 1г ТПАР.

Після культивування штаму *R.erythropolis* Au-1 у ферментері з вихровою системою аерації вихід АСБ становив 15,2 г/дм³, клітинно-зв'язаних ТПАР – 4,8 г/дм³, позаклітинних – 1,5 г/дм³. Необхідно врахувати раціоналізацію методів виділення ТПАР:

1) використання магніточутливих багатошарових композитів на основі CuO для одержання позаклітинних ТПАР забезпечує вихід позаклітинних трегалозоліпідів – 88% від початкового; необхідна кількість екстрагента зменшується з 1 дм³ до 250 см³ для обробки 1 дм³ СКР (тоді при вирощуванні продуцента у ферментері потрібно 189 см³ розчинника (етанолу) на 1 г виділених позаклітинних ТПАР). Оскільки композити можна використовувати багаторазово і практично без втрат, вони не належать до статті витрат «сировина і матеріали» (їх варто віднести до основних фондів виробництва);

2) застосування етанолу на заміну суміші Фолча забезпечує вихід клітинно-зв'язаних ТПАР – 88% від початкового.

Отже, при культивуванні штаму *R.erythropolis* Au-1 у ферментері з вихровою системою аерації та за використання етанолу як екстрагента вихід ТПАР становить 5,54 г/дм³ (4,22 г/дм³ клітинно-зв'язаних і 1,32 г/дм³ позаклітинних ТПАР). Вартість реактивів, необхідних для отримання ТПАР за таких умов, наведена в таблиці 4.1 та 4.2.

Таблиця 4.1

Вартість реактивів, необхідних для одержання ТПАР
штаму *R.erythropolis* Au-1

Компонент поживного середовища	Витрачено на 1 дм ³ ПС, г	Вартість, грн/кг (грн/дм ³)	Вартість грн/дм ³ ПС	Вартість на 1 г ТПАР, грн/г	
				Колби	Ферментер
NaNO ₃	3	24,5	0,0735	0,0167	0,0133
KH ₂ PO ₄	2	48,0	0,0960	0,0218	0,0173
K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	2	119,5	0,2384	0,0542	0,0430
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	10,1	0,0051	0,0012	0,0009
Натрій цитрат	1	60,0	0,0600	0,0136	0,0108
Дріжджовий екстракт	1	1632,0	1,6320	0,3709	0,2946
Гексадекан	20	880,0	17,6000	4,0000	3,1769
Разом			19,7050	4,4784	3,5568

Примітка: ПС – поживне середовище.

За культивування штаму *R.erythropolis* Au-1 у ферментері витрати на компоненти поживного середовища для отримання 1 г ТПАР вдалося зменшити на 30,5% в порівнянні з вирощуванням у колбах.

Таблиця 4.2

Вартість реактивів, необхідних для одержання ТПАР
штаму *R.erythropolis* Au-1

Розчинники	Вартість реактиву, грн/дм ³	Вартість реактиву на 1 г ТПАР, грн/г		
		Клітинно-зв'язані	Позаклітинні	
			Колби	Ферментер
Хлороформ	130,0	6,5663	86,6667	-
Метанол	49,1	0,4157	16,3667	-
Разом:		6,9820	103,0334	-
Етанол*	20	1,5152	-	2,2680

Примітка: * – у виробництві доцільним є регенерація розчинників після їх використання. Беручи до уваги літературні дані (Сидоров та ін., 2008), прийmemo вартість регенованого етанолу 30% від ринкової його вартості (60 грн/дм³).

Таким чином, використання етанолу дозволяє знизити витрати на розчинники для екстракції 1г клітинно-зв'язаних ТПАР з 6,98 грн до 4,55 грн, а застосування регенованого етанолу – до 1,52 грн, що становить 22% від вихідних витрат.

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. (середня вартість електроенергії для промисловості (2 клас напруги) з 01.04.20р становить 2,44 грн./кВт·год (https://lez.com.ua/taryfy_jur)).

Для отримання 1 г ТПАР при культивування у колбах нам потрібно 0,23 дм³ культуральної рідини (КР). За один цикл роботи лабораторної качалки можна отримати 4,5 дм³ КР, а отже 4,5/0,23=19,57 г ТПАР. Для отримання 1 г

ТПАР у лабораторному ферментері нам необхідно $0,18 \text{ дм}^3$ КР. За один цикл роботи ферментера (загальний об'єм 1 м^3 , коефіцієнт завантаження ферментера – 0,8) можна отримати $800/0,18=4\ 444,44$ г ТПАР. Відповідно до цих даних розраховуємо витрати на електроенергію (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Вартість електроенергії, затраченої на одержання ТПАР
штаму *R.erythropolis* Au-1

Умови культивування	Назва обладнання	Потужність, кВт/год	Час роботи, год.	Сума витрат на 1 г ТПАР, грн.	Сума витрат на 1 дм^3 СКР
У колбах	Стерилізатор паровий ВК-50	4,0	4	1,99	3,56
	Качалка лабораторна	0,9	120	13,47	24,00
	Термостат	2,0	120	29,92	53,33
Разом:				45,38	80,89
У ферментері	Мотор перемішувального пристрою	3,0	120	0,20	0,45
	Компресор повітря	3,0	120	0,20	0,45
	Термостат	3,0	120	0,20	0,45
	Парогенератор	10,0	1	0,01	0,01
Разом:				0,61	1,36

Примітка: СКР – супернатант культуральної рідини.

Отже, культивування штаму у ферментері з вихровою системою аерації дозволило зменшити витрати на електроенергію для отримання 1 г ТПАР у 75 разів.

Результати підрахунку собівартості продукції наведено в таблиці 4.4. Враховано, що розрахунок економічної ефективності проводили тільки по перших двох статтях витрат, що становить приблизно 20 % повної собівартості продукції; а також прийнято, що рентабельність виробництва становитиме 40%.

Таблиця 4.4

Розрахунок вартості ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1

Складові ціни	Вартість, грн./1г ТПАР				Вартість СКР (ГД), грн./дм ³	
	Клітинно-зв'язані		Позаклітинні		Колби	Ферментер
	Колби	Ферментер	Колби	Ферментер		
Компоненти ПС	4,48	3,56	4,48	3,56	19,71	19,71
Розчинники	6,98	1,52	103,03	2,27	-	-
Електроенергія	45,38	0,61	45,38	0,61	80,89	1,36
Разом:	56,84	5,69	152,89	6,44	100,6	21,07
Повна собівартість	284,2	28,45	764,45	32,20	503	105,35
Відпускна ціна	397,88	39,83	1070,23	45,08	704,2	147,49

Примітки: СКР (ГД) – супернатант культуральної рідини, отриманий за використання гексадекану як джерела вуглецю.

Таким чином, розроблена технологія ТПАР дозволяє отримати клітинно-зв'язані, позаклітинні ТПАР та СКР вартістю 1423\$/кг, 1610\$/кг та 5,3\$/дм³ відповідно. На даний час у світі не виробляються трегалозоліпідні ПАР в промислових масштабах, проте ринкова ціна на подібну продукцію іноземних виробників, а саме: рамноліпідні ПАР (Biofilon, AGAE Technologies), становить 15 – 1600 \$/кг (420 – 44 800 грн/кг) залежно від концентрації та форми випуску. Це свідчить про економічну ефективність та ринкову конкурентоспроможність

розробленої технології. Особливу увагу варто звернути, що трегалозоліпідні ПАР менш токсичні, ніж рамноліпідні, тому мають відмінні перспективи у застосуванні.

4.4. SWOT-аналіз трегалозоліпідних ПАР

SWOT-аналіз застосовують при стратегічному плануванні, а саме при впровадженні нових продуктів чи технологій. Чинники, котрі впливають, розділяють на чотири категорії (https://en.wikipedia.org/wiki/SWOT_analysis):

Сильні сторони (переваги) біосурфактантів у порівнянні з синтетичними – біодеградабельність, активність за низьких концентрацій, різних рН і вмісті солей, низька токсичність, термостійкість. Вони можуть бути синтезовані на поновлюваній сировині, у тому числі й відходах сільського господарства й промисловості. Трегалозоліпідні ПАР ефективно емульгують олії, оливи, вуглеводні та здатні до регуляції транспорту біологічно активних речовин у клітини, є біосумісними.

Слабкими сторонами технологій ПАР є особливості біотехнологій, а саме, значні витрати на впровадження та вдосконалення технологій, а також обмеженість ринкових досліджень.

Можливості, що відкриваються при реалізації даної технології: поєднуючи фізико-хімічні та біологічні властивості та низьку токсичність біоПАР забезпечать потреби сучасного ринку у продуктах нового покоління, ефективних й екологічно безпечних на заміну синтетичних ПАР та інших застосувань.

Недостатній досвід виробництва (виробництво трегалозоліпідів на даний час не налагоджено) і застосування біоПАР, а також, низький рівень інформованості споживачів про їх властивості, галузі застосування, переваги біоПАР, можливості заміни синтетичних ПАР у сучасних технологіях становлять **загрози**, пов'язані з здійсненням даної технології.

Висновки до розділу 4.

Одержані результати стали підґрунтям для розроблення технології виробництва цільових продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1. Новизною біотехнології є одержання 5 товарних форм: супернатанту культуральної рідини, клітинно-зв'язаних ТПАР, позаклітинних ТПАР, екзополісахаридного комплексу, клітинного полігідроксиалканоату. Запропоновано апаратурно-технологічні схеми отримання продуктів. Розроблена технологія є підґрунтям для маловідходного виробництва продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1, оскільки дозволяє максимально використовувати компоненти постферментативної культуральної рідини, а відтак мінімізувати негативний вплив виробництва на довкілля та підвищити конкурентоспроможність ТПАР. Проведено SWOT-аналіз технології отримання біоПАР та економічний розрахунок орієнтовної ціни різних форм трегалозоліпідних ПАР

Розділ 5
Фізико-хімічні та біологічні властивості ПАР
штаму *R. erythropolis* Au-1

5.1. Фізико-хімічні властивості

Встановлено, що трегалозоліпідні ПАР є ефективними поверхнево-активними речовинами. Так, поверхневий натяг розчинів клітинно-зв'язаних ТПАР (0,5 г/дм³) становить 35 мН/м, позаклітинних – 36 мН/м; критична концентрація міцелоутворення – 0,317 г/дм³ і 0,521 г/дм³ відповідно. ТПАР та СКР (за вмісту позаклітинних ТПАР 0,05 г/дм³) покращують змочування поверхонь різних матеріалів (табл.5.1).

Визначено здатність ТПАР (клітинно-зв'язаних, позаклітинних), а також СКР (за вмісту позаклітинних ТПАР 0,05 г/дм³) змочувати поверхні різних матеріалів (табл.5.1).

Таблиця 5.1

Кути змочування матеріалів розчинами ПАР штаму *R. erythropolis* Au-1

Досліджені продукти	Кути змочування поверхонь, °		
	Оргскло	Фторопласт	Сталь 20
Вода	71	90	66
СКР*	56	68	50
пТПАР 0,05 г/дм ³	64	80	52
кТПАР 0,05 г/дм ³	60	70	48

Примітки: * - СКР за розведення 1:20 (вміст позаклітинних ТПАР – 0,05 г/дм³), пТПАР – позаклітинні ТПАР, кТПАР – клітинно-зв'язані ТПАР.

Досліджувані біоПАР сприяють зниженню крайових кутів змочування поверхонь на 10 – 27% в порівнянні з водою, що дозволяє охарактеризувати їх як ефективні ПАР.

Вперше здійснено термічний аналіз ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1, що дозволило визначити їх термічну стійкість та охарактеризувати процеси, які проходять при нагріванні (рис.5.1).

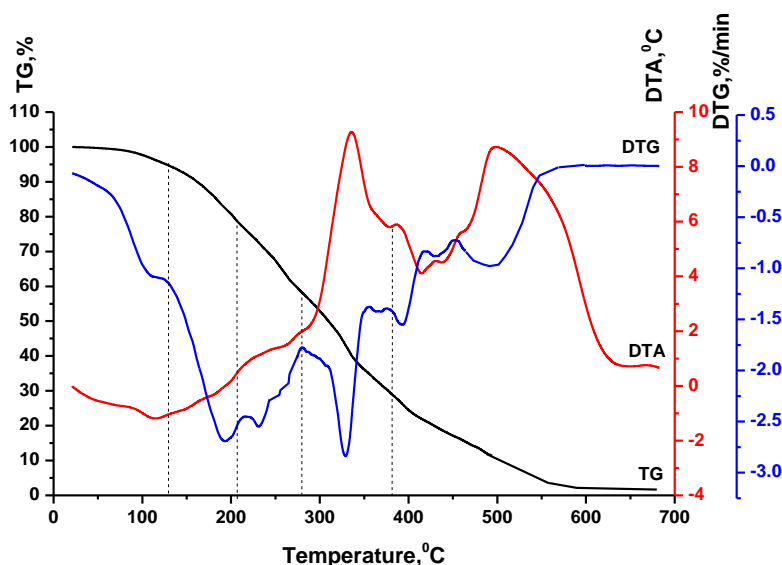


Рис. 5.1. Термограма клітинно-зв'язаних ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1: TG – термогравіметрична крива; DTA – крива диференційного термічного аналізу; DTG – диференційна термогравіметрична крива.

Показано, незначне зменшення маси зразка при 62°C, що може свідчити про вивільнення залишків екстрагенту (хлороформу). Суттєве зменшення маси спостерігається вище 130°C. Отже, клітинно-зв'язані ТПАР є стабільними до цієї температури.

Визначено фізико-хімічні характеристики СКР штаму *R. erythropolis* Au-1, які свідчать, що він належить до ефективних ПАР: залежно від субстрату поверхневий натяг становив 37-50 мН/м, емульгувальна активність – 35-61% (табл. 3.3 – 3.5), крайові кути змочування різних матеріалів зменшувались на 21-24% порівняно з водою (табл.5.1). Такі властивості СКР пояснюються сумісною дією його активних складників – ТПАР і ЕПК.

Отримані результати мають наукове і практичне значення, оскільки дають нову інформацію про властивості біоПАР, а також розширюють можливості їх застосування.

5.2. Біологічні властивості

Вплив ТПАР на проникність клітинних мембран мікроорганізмів і рослин. Однією з важливих біологічних властивостей біоПАР є їх здатність змінювати проникність мікробних клітинних мембран (Sotirova et al., 2009; Kuuyukina et al., 2020). Встановлено, що після оброблення суспендованих клітин бактерій *A. tumefaciens* та *P. syringae* розчинами ТПАР (0,01-0,05 г/дм³) кількість позаклітинного білку зростала на 6-18%, практично не впливаючи на життєздатність клітин.

Таблиця 5.2.

Вплив ТПАР на проникність мембран клітин мікроорганізмів

Культури мікроорганізмів	Концентрація ТПАР, г/дм ³	Вміст позаклітинного білку, %	Чисельність життєздатних мікроорганізмів після обробки ТПАР, КУО/см ³
<i>P. syringae</i>	0	100,0	7×10^{10}
	0,01	102,5	7×10^{10}
	0,05	105,5	6×10^{10}
	0,1	116,2	5×10^{10}
	0,5	117,3	4×10^{10}
<i>A. tumefaciens</i>	0	100,0	8×10^{10}
	0,01	103,4	6×10^{10}
	0,05	118,1	4×10^{10}
	0,1	170,5	4×10^9
	0,5	200,3	3×10^9

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

Також встановлено вплив допосівного оброблення насіння розчинами ТПАР на проникність клітинних мембран рослин – у тестах на поглинання іонів K^+ та Ca^{2+} проростками рослин (за залишковою кількістю цих йонів у рідкому поживному середовищі), оцінено здатність проростків поглинати вказані мінеральні елементи (рис.5.2).

Показано, що ТПАР сприяють кращому поглинанню досліджуваних іонів коріннями проростків сої (на 10-40%, порівняно з контролем) та пшениці – на 16-36%.

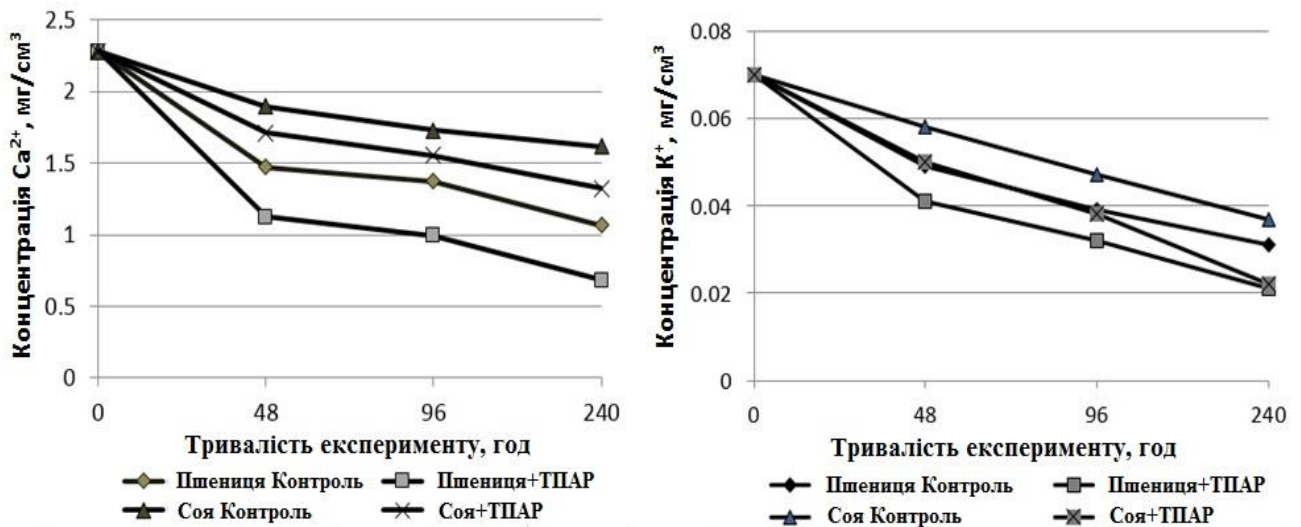


Рис. 5.2. Залишковий вміст іонів K⁺ та Ca²⁺ у середовищі росту рослин: насіння рослин за допосівного оброблення насіння водою (контроль) або розчином 0,05 г/дм³ ТПАР.

Вивчено вплив ТПАР за різних концентрацій (0,01 – 0,1 г/дм³) на поглинання іонів K⁺ та Ca²⁺ рослинами (рис.5.3).

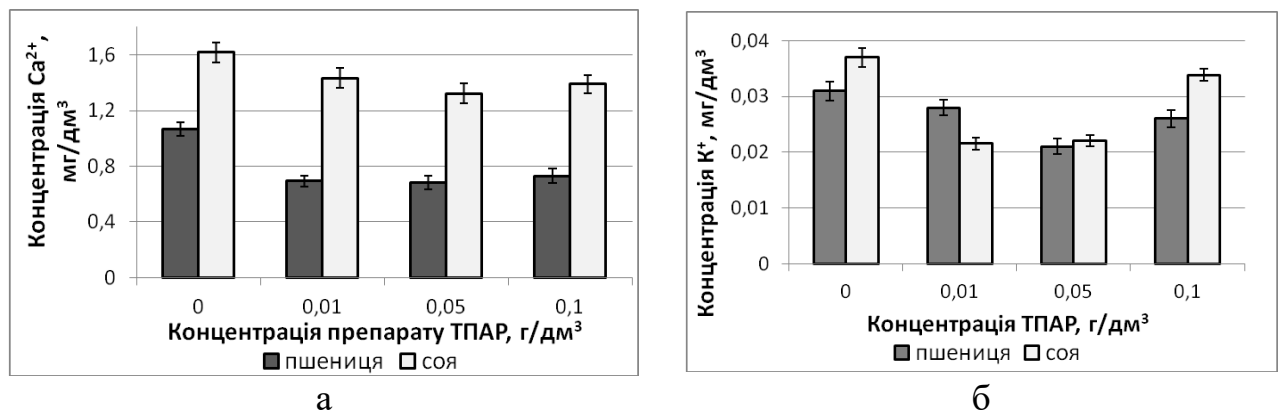


Рис. 5.3. Вплив концентрації ТПАР на залишковий вміст іонів Ca²⁺ (а) та K⁺ (б) у середовищі росту рослин.

Показано, що вплив ТПАР за різних концентрацій на поглинання іонів Ca²⁺ незначно відрізнявся: для пшениці поглинання було більшим на 11-18%, а для сої - на 32-36% порівняно з контролем. Поглинання іонів K⁺ проростками сої було на 40% краще за впливу 0,05-0,1 г/дм³ ТПАР (за впливу 0,01 г/дм³

ТПАР – лише на 8%). Поглинання іонів K^+ проростками пшениці було найефективнішим за дії $0,05 \text{ г/дм}^3$ ТПАР (більше на 32% порівняно з контролем, тоді як для розчинів ТПАР $0,01 \text{ г/дм}^3$ та $0,1 \text{ г/дм}^3$ – лише на 7-10%). Отримані результати дозволили встановити раціональну концентрацію ТПАР ($0,05 \text{ г/дм}^3$), за якої поглинання йонів металів є більшим (до 30%), ніж за інших концентрацій ТПАР.

Встановлений вплив трегалозоліпідних ПАР на клітини мікроорганізмів і рослин може бути поясненням механізму регулювання мембранного транспорту та підсилення дії біологічно активних речовин. Ця властивість є основою для створення ефективних композицій за участі біоПАР.

ТПАР у композиційних препаратах. Результати досліджень біологічних властивостей ТПАР стали підґрунтям для розроблення комплексних препаратів із вмістом ТПАР для захисту та живлення рослин.

Вплив ТПАР на активність тіосульфонатів. Тіосульфонати є слабо розчинними у воді, що лімітує їх біодоступність, отже, й їх використання. Здатність біоПАР до диспергування гідрофобних сполук та регулювання проникності мембран клітин була використана для розроблення композицій ТПАР з біоцидами тіосульфонатної структури (Singh, 2018; Sotirova, 2012). Вивчено антимікробну дію трегалозоліпідних ПАР та їх вплив на активність тіосульфонатних біоцидів. Встановлено, що за концентрацій $0,05\text{--}1,0 \text{ г/дм}^3$ ТПАР не інгібують досліджувані фітопатогенні бактерії та гриби. Проте трегалозоліпідні ПАР ($0,05 \text{ г/дм}^3$) сприяють підвищенню активності тіосульфонатів відносно низки фітопатогенних бактерій (*C. michiganensis*, *A. tumefaciens*, *X. campestris*, *P. syringae* і *E. carotovora*) та грибів (*F. oxysporum* і *R. cerealis*) (рис.5.4а).

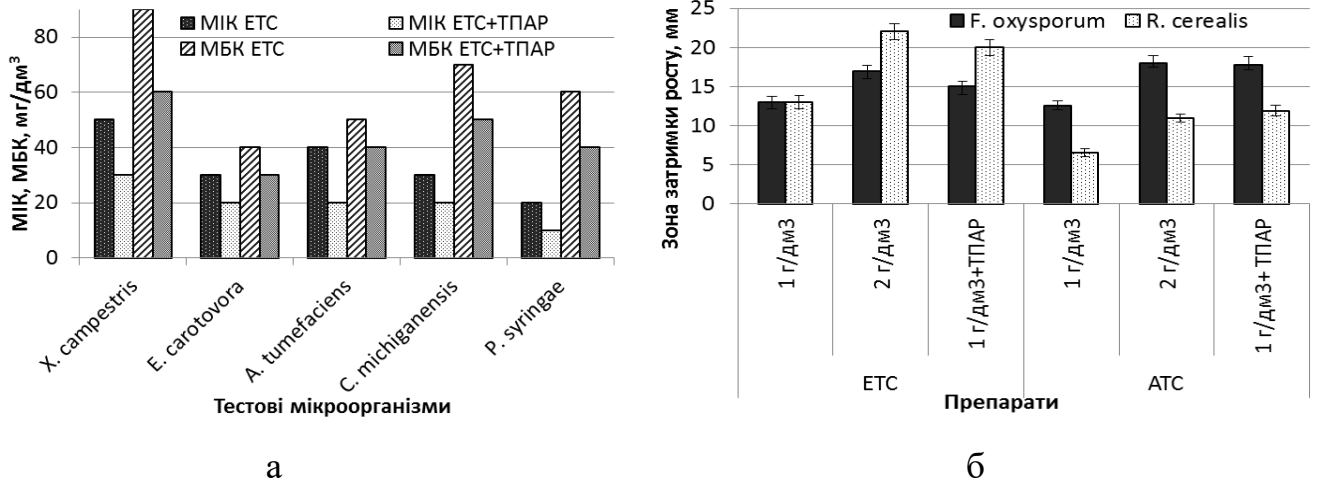


Рис.5.4. Антибактеріальна (а) та фунгіцидна (б) активність композицій ТПАР з тіосульфонатами: ЕТС – етилтіосульфанілат; ТПАР – 0,05 г/дм³; МІК – мінімальна інгібувальна концентрація; МБК – мінімальна бактерицидна концентрація; результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Так, при додаванні ТПАР до біоциду етилтіосульфанілату мінімальні інгібувальна та бактерицидна концентрації ЕТС зменшувались на 20–50% для всіх тестових бактерій.

Для тест-культур грибів під дією композиції ЕТС (1,0 г/дм³) з ТПАР (0,05 г/дм³) діаметр зон інгібування росту збільшувався на 15,4 % (для *F. oxysporum*) і на 53,8 % (*R. cerealis*) порівняно з ЕТС. У суміші з ТПАР (0,05 г/дм³) фунгіцидна активність АТС (1,0 г/ дм³) зростала на 42,4 і 83,1 % (рис. 5.4б, рис.5.5).

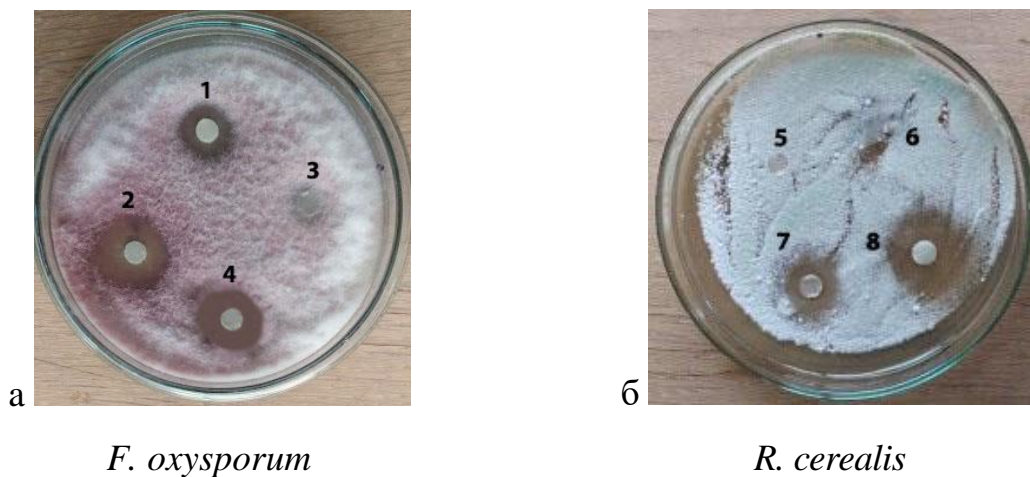


Рис. 5.5. Фунгіцидна дія композицій ТПАР з тіосульфонатами: 1 – АТС 1 г/дм³; 2 – АТС 2 г/дм³; 3 – ТПАР 0,05 г/дм³; 4 – АТС 1,0 г/дм³ +ТПАР 0,05

г/дм³; 5 – контроль (вода); 6 – ТПАР 0,05 г/дм³; 7 – ЕТС 1 г/дм³; 8 – ЕТС 1,0 г/дм³ + ТПАР 0,05 г/дм³.

Отже, поєднання тіосульфатів із біоПАР дає можливість істотно зменшити діючі концентрації біоцидів, що має екологічне й економічне значення.

Вплив ТПАР на активність індоліл-3-оцтової кислоти. Визначено вплив ТПАР на активність індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) – фітогормона ауксинової природи, що є регулятором росту рослин. У біотесті на відрізках колеоптилів пшениці, який використовують для оцінки активності ауксинів, встановлено здатність ТПАР впливати на ріст рослин. За сумісного використання ІОК (10^{-4} М) з ТПАР підвищувалась активність ауксину: приріст відрізків колеоптилів був на 19 % більшим, ніж у варіанті без ТПАР, і наближувався до дії ІОК за концентрації у 10 разів більшої (10^{-5} М) (рис. 5.6).

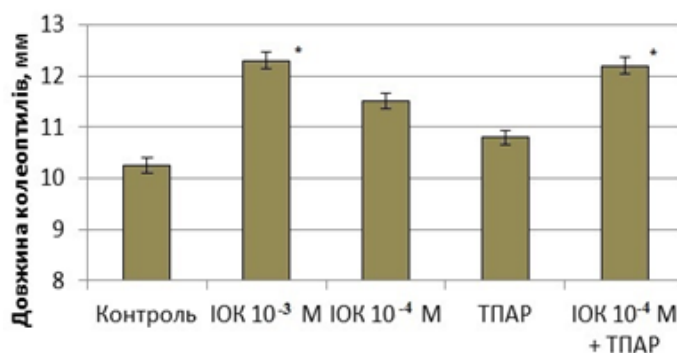


Рис. 5.6. Вплив ТПАР на активність індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) в біотестах на колеоптилях пшениці: 1 – Контроль; 2 – ІОК 10^{-4} М; 3 – ІОК 10^{-4} М+ТПАР 0,05 г/дм³; * - результати достовірні за $p \leq 0,05$ відносно контролю.

Отримані результати свідчать, що в композиції з ТПАР підвищується рістстимулювальна дія ІОК. Такі властивості ТПАР можна використати для збільшення ефективності біологічно активних препаратів, зокрема для сільського господарства.

Вплив ТПАР на синтез метаболітів актинобактеріями. Виявлено, що додавання ТПАР (0,05 г/дм³) до середовища росту бактерій сприяє приросту біомаси та поверхнево-активних метаболітів на 13,9 – 17,0 % та впливає на

емульгувальну активність безклітинної культуральної рідини. (рис.5.7, 5.8). Показано, що стійкість емульсії вазелінової оливи з СКР (через 4 тижні експозиції) є в 4 рази вищою за впливу ТПАР.

Відомо, що ТПАР збільшують біодоступність компонентів поживного середовища, в тому числі за рахунок диспергування гідрофобних сполук (Singh та ін., 2018) чим можна пояснити покращення росту мікроорганізмів. Водночас, у культуральній рідині накопичується більше ПАР та ЕПК, що може бути причиною кращої емульгувальної активності СКР та стійкості таких емульсій.

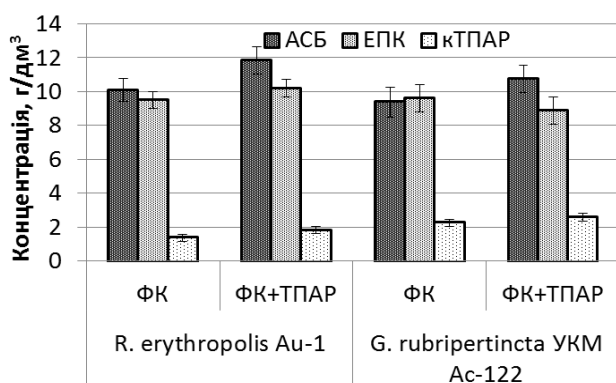


Рис.5.7. Вплив ТПАР на синтез метаболітів актинобактеріями *R. erythropolis* Au-1 та *G. rubripertincta* УКМ-122: джерело вуглецю – ріпаковий фосфатидий концентрат, κТПАР – клітинно-зв'язані ТПАР; ЕПК – екзополісахаридний комплекс; АСБ – абсолютно суха біомаса.

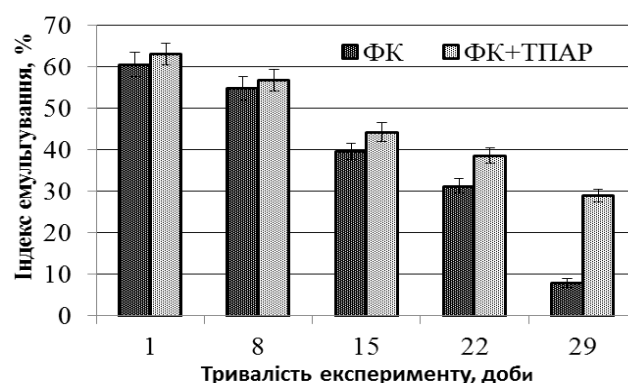


Рис. 5.8. Стійкість емульсій вазелінової оливи з СКР *R. erythropolis* Au-1 за впливу ТПАР: ФК – СКР за використання ріпакового фосфатидного концентрату (ФК); ФК+ТПАР – СКР за використання ріпакового ФК та ТПАР (0,01 г/ дм³).

Токсичність ТПАР. При створенні технологій застосування ТПАР необхідно визначити діапазон концентрацій, за яких вони є не шкідливими. Тож, оцінено цитотоксичність отриманих клітинно-зв'язаних ТПАР (табл.5.3.).

Таблиця 5.3

Максимальні нетоксичні дози ПАР щодо тестових культур клітин

Культури	Концентрація, г/дм³
----------	---------------------

клітин	ТПАР	РЛ	ДДС
A549	0,477±0,018	0,013±0,001	0,008±0,001
L929	0,541±0,019	0,014±0,002	0,010±0,001

Примітки: кТПАР – клітинно-зв'язані ТПАР, РЛ – рамноліпіди; РБК – рамноліпідний біокомплекс; ДДС – натрій додецилсульфат; A549 –культури клітин аденокарциноми легень; L929 – фібробластоподібні клітини мишей.

Встановлено, що токсичність ТПАР щодо тестових культур клітин є меншою, ніж токсичність синтетичного сурфактанту натрій додецилсульфату або рамноліпідних ПАР. Отже, трегалозоліпідні ПАР є низько токсичними сполуками.

Прогнозування біологічної активності за структурою трегалозоліпідів (за використання комп'ютерної програми PASS) дозволило теоретично визначити їх як біологічно активні сполуки, перспективні для застосування у фармації, ветеринарії та рослинництві. Виявлено, що трегалозоліпіди повинні володіти імуностимулюючою, противірусною, антимікробною, протипухлинною, вазопротекторною та гепатопротекторною активністю, бути регуляторами проникності мембран. Їх перспективи пов'язані також з детергентною дією і низькою токсичністю. Отже, ґрунтуючись на одержаних результатах, можна рекомендувати трегалозоліпідні ПАР для розроблення ефективних та безпечних препаратів для застосування у фармації та сільському господарстві. Значна частина цих прогнозів узгоджується з літературними даними (Janek et al., 2018; Nikolova et al., 2020; Singh et al., 2018), деякі з них ми підтвердили експериментально.

Висновки до розділу 5

Встановлено, що трегалозоліпідні ПАР є ефективними поверхнево-активними речовинами: поверхневий натяг ТПАР (1 г/дм³) становить 35 мН/м та 36 мН/м, ККМ – 0,317 г/дм³ та 0,521 г/дм³ відповідно для клітинно-зв'язаних та позаклітинних біоПАР; крайові кути змочування оргскла, фторопласту, сталі на

10–27% менші, ніж води. Клітинно-зв’язані ТПАР є стабільними до 130°C. СКР штаму *R. erythropolis* Au-1 є ефективним ПАР: поверхневий натяг – 37-53 мН/м, E_{24} =35-61%, крайові кути змочування для різних матеріалів на 21-24% менші порівняно з водою.

Визначено біологічні властивості ТПАР: підвищують проникність клітинних мембран бактерій (на 6-18%), поглинання мінеральних елементів рослинами (на 27-48 %), стимулюють метаболізм бактерій (приріст біомаси і метаболітів на 13-17%) та ріст рослин (приріст на 20-36%). Показано, що ТПАР *R. erythropolis* Au-1 підсилюють дію інших біологічно-активних речовин, зокрема, біоцидів-тіосульфатів (на 20-50%) та фітогормонів – індоліл-оцтової кислоти (практично у 10 разів). Встановлено, що трегалозоліпідні ПАР є менш токсичними речовинами порівняно з синтетичними та деякими біогенними ПАР.

Отже, встановлено ефективність метаболітів *R. erythropolis* Au-1 як екологічно безпечних продуктів, перспективних на заміну синтетичним ПАР. Також отримані результати вказують на значні перспективи використання ТПАР при створенні безпечних препаратів підвищеної ефективності для рослинництва.

Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:

Корецька, Н.І.; Карпенко, О.В.; Баранов, В.І.; Лубенець, В.І.; Ногіна, Т.М. Біологічні властивості поверхнево-активних метаболітів *Rhodococcus erythropolis* Au-1 та їх перспективи для рослинництва. *Innov Biosyst Bioeng*, 2019, 3 (2), pp 144–148. [doi:10.20535/ibb.2019.3.1.165165](https://doi.org/10.20535/ibb.2019.3.1.165165).

Розділ 6

Практичне застосування трегалозоліпідних ПАР

6.1. Продукти штаму *R. erythropolis* Au-1 для рослинництва

Результати експериментів, проведених у лабораторних та польових умовах, показують, що допосівне оброблення насіння отриманими препаратами стимулює ріст пшениці та сої, сприяє приросту врожайності.

Експерименти у лабораторних умовах дозволили визначити:

- ефективність різних способів оброблення насіння (морфометричні параметри росту пшениці за допосівного замочування або обприскування насіння практично не відрізняються), табл.6.1.;
- найбільш дієву концентрацію ТПАР для використання у рослинництві (0,05 г/дм³), табл.6.3;
- перспективність ЕПК як регулятора росту рослин: низька ефективність порівняно із застосуванням ТПАР або СКР (табл.6.2, 6.3);
- доцільність використання СКР як препарату для рослинництва та ефективні його концентрації (табл.6.2).

Таблиця 6.1

Ефективність різних способів допосівного оброблення насіння трегалозоліпідними ПАР на ріст проростків пшениці

Способи оброблення насіння	Схожість, %	Маса кореня		Маса пагона	
		мг	%	мг	%
Контроль	87,5	44,9±0,3	100,0	56,1±0,3	100,0
Замочування	97,5	58,8±3,5	130,9	68,9±4,1	122,7
Обприскування	97,0	56,6 ±3,2	126,1	66,2±4,0	118,0

Примітки: оброблення насіння пшениці шляхом замочування проводили розчином ТПАР (0,05 г/дм³); обприскування – розчином ТПАР (в розрахунку 0,05 г ТПАР/кг насіння).

Встановлено, що як замочування, так і обприскування є ефективними способами оброблення насіння трегалозоліпідними ПАР: схожість пшениці зростала на 10%, маса пагона і кореня – в середньому на 120,4% та 128,5% (отримані дані відрізняються в межах похибки). Отже, в наступних експериментах з рослинами обробляли насіння шляхом замочування, що є більш зручним при роботі з малими кількостями матеріалу. Виняток становлять виробничі досліді.

Показано, що найбільш ефективним є допосівне оброблення насіння розчином СКР: надземна маса рослин є на 15% і 28% більшою, ніж за впливу ТПАР або ЕПК, а коренева – на 26% і 50% відповідно (рис.6.1, табл. 6.2, 6.3).

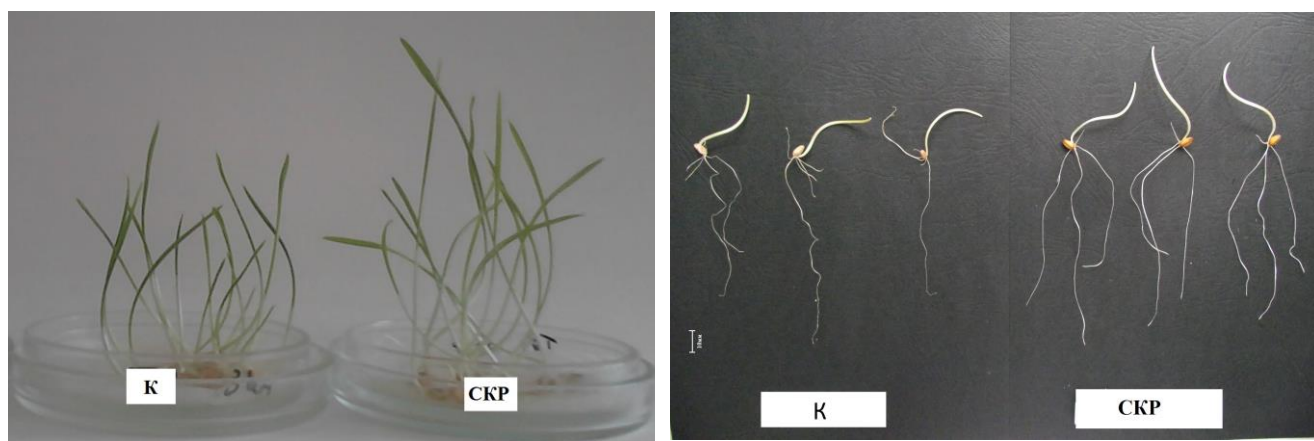


Рис.6.1. Вплив допосівного оброблення насіння СКР (1:10) на ріст проростків пшениці: К – контроль (вода); 2 – СКР на сахарозі за розведення 1:10.

Такі результати можна пояснити синергічною дією біологічно активних речовин, що входять до складу СКР, зокрема, ТПАР, ЕПК, фітогормонів ауксинової природи. Встановлено, що дія СКР на рослини певною мірою залежить від джерела вуглецю, використаного при вирощуванні бактерій: допосівне оброблення насіння різними препаратами СКР сприяє зростанню маси кореня на 30-58%, пагона – на 18-38% у порівнянні з контролем (табл.6.2).

Таблиця 6.2

Вплив метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 на ріст пшениці

Досліджувані метаболіти	Розведення	Схожість насіння, %	Корінь				Пагін				
			Довжина		Маса		Довжина		Маса		
			мм	%	мг	%	мм	%	мг	%	
Контроль (вода)		87,5	92,4±4,6	100,0	44,9±0,3	100,0	48,7±1,0	100,0	56,1±0,3	100,0	
СКР на різних субстратах	Гексадекан	1:10	87,5	100,5±6,0	108,8	60,9±3,7	135,7	56,7±3,4	116,4	63,3±3,8	112,8
		1:20	98,0	107,6±6,5	116,5	63,1*±3,8	140,6	60,7±3,6	124,7	68,5±4,1	122,1
		1:50	90,0	103,7±6,2	112,2	62,4±3,5	139,0	58,5±3,5	120,3	66,1±4,0	117,8
	Гліцерин	1:10	90,0	101,0±6,0	109,3	63,7±3,8	141,9	57,9±1,3	118,9	66,2±4,0	118,0
		1:20	90,0	102,0±6,1	110,4	66,*5±4,0	148,1	58,0±3,5	119,1	66,7±4,1	118,9
		1:50	90,0	95,4±5,7	103,2	63,1±3,8	140,6	56,8±3,4	116,6	66,0±3,9	117,7
	Сахароза	1:10	97,5	114,5±6,9	123,9	70,9*±4,2	157,9	60,9±3,7	125,1	77,3±4,6	137,7
		1:20	95,0	106,9±6,4	115,7	65,8±3,9	146,5	60,1±3,6	123,4	72,8±4,4	129,8
		1:50	95,0	94,9±4,8	102,7	61,8±3,7	137,7	59,1±3,5	121,3	67,3±4,4	119,9
	Ріпаковий ФК	1:10	90,0	109,3±6,6	118,2	56,2±3,4	125,1	65,3±3,9	124,7	65,9±3,9	117,5
		1:20	92,0	112,3±6,7	121,6	58,6±3,5	130,5	63,1±3,7	129,7	68,1±4,0	121,4
		1:50	92,5	115,8±6,9	125,4	59,5*±3,6	132,4	60,7±3,3	134,4	69,1±4,2	123,7

Примітки: СКР – супернатант культуральної рідини; ФК – фосфатидний концентрат; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$

Таблиця 6.2 (продовження)

Вплив метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 на ріст пшениці

Досліджувані метаболіти	Концентрація, мг/дм ³	Схожість насіння, %	Корінь				Пагін			
			Довжина		Маса		Довжина		Маса	
			мм	%	мг	%	мм	%	мг	%
Контроль (вода)		87,5	92,4±4,6	100,0	44,9±0,3	100,0	48,7±1,0	100,0	56,1±0,3	100,0
Трегалозоліпідні ПАР	0,10	97,0	99,8±5,9	108,0	53,0±3,2	118,0	52,4±3,1	107,7	58,7±3,5	104,6
	0,05	97,5	125,3±7,5	135,6*	58,8±3,5	130,9	62,8±3,7	128,9	68,9±4,1	122,7
	0,01	97,0	109,8±5,8	118,8	61,1±3,7	136,1	53,9±3,2	110,8	58,2±3,5	103,8
Екзополісахаридний комплекс	0,50	92,5	105,9±6,4	107,7	48,3±2,9	107,7	52,9±3,2	108,6	62,4±3,7	111,2
	0,10	90,0	102,5±6,1	101,3	45,5±2,6	101,3	50,9±3,0	104,5	58,3±3,5	103,9

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

За всіх досліджуваних концентрацій та джерел вуглецю СКР сприяє росту пшениці. Проте, встановлено, що СКР на гексадекані є найбільш ефективним за розведення 1:50, на сахарозі – розведення 1:10, на гліцерині – 1:20, а ріпаковому ФК – 1:50. Ймовірно, це можна пояснити балансом між стимулювальною дією таких складників СКР, як позаклітинних ТПАР і ЕПК та можливого негативного впливу деяких залишкових вуглецевих субстратів (гексадекану).

Результати вегетаційних і дрібноділянкових досліджень підтвердили стимулювальну дію ТПАР на ріст рослин (рис.6.2). Маса пагонів та коренів сої (вегетаційний дослід) відповідно зростає на 36,8% та 29%, а пшениці (дрібноділянковий дослід) – на 28% та 20 % відносно контролю. Також встановлено, що допосівне оброблення насіння розчинами ТПАР сприяє підвищенню вмісту пігментів фотосинтезу у листі рослин в середньому на 31%.

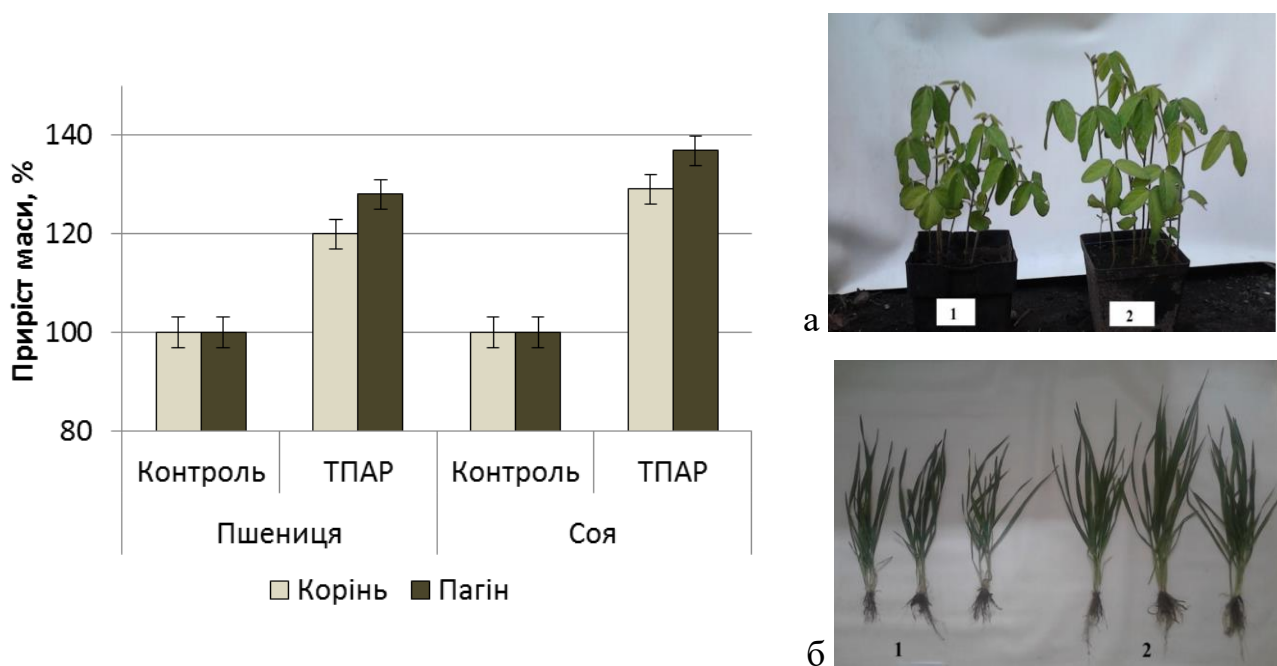


Рис. 6.2. Вплив трегалозоліпідних ПАР на ростові показники сої та пшениці за допосівного оброблення насіння: а – вегетаційні (соя), б – дрібноділянкові (пшениця) досліді; 1 – контроль (вода); 2 – ТПАР (0,05 г/дм³); *-результати достовірні за $p \leq 0,05$. відносно контролю.

Так як процес фотосинтезу опосередковано пов'язаний із процесами росту рослин, наступним етапом було визначення вмісту фотосинтетичних пігментів. Встановлено, що допосівне оброблення насіння розчинами ТПАР сприяє

підвищенню вмісту пігментів фотосинтезу у листі рослин в середньому на 31% (рис.6.3.).

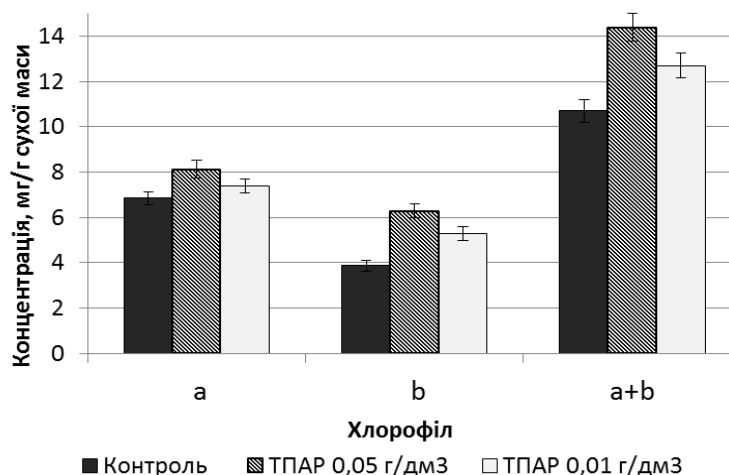


Рис. 6.3. Вплив допосівного оброблення насіння пшениці розчинами ТПАР на вміст хлорофілу у листі рослин.

Показано, що за концентрації ТПАР 0,05 г/дм³ кількість пігментів фотосинтезу була в середньому на 14% вищою, ніж за концентрації 0,01 г/дм³. Цей факт додатково підтверджує доцільність використання для рослинництва ТПАР за концентрації 0,05 г/дм³.

Результати дрібноділянкових експериментів, в яких рослини вирощували до стадії збору врожаю, дозволили проаналізувати вплив ТПАР на масу насіння та урожайність культур (табл.6.3).

Таблиця 6.3.

Вплив ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 на урожайність пшениці та сої

Рослина	Варіанти оброблення насіння	Маса 1000 насінин, г	Урожай	
			г/м ²	%
Соя сорту Іванка	Вода (Контроль)	139,9±5,1	145,0±7,2	100,0
	ТПАР 0.05 г/дм ³	152,6±6,0	172,3±8,6	118,8
Пшениця сорту Золотоколоса	Вода (Контроль)	46,5±1,1	285,2±12,3	100,0
	ТПАР 0.05 г/дм ³	48,5±1,2	347,9±15,5	121,9

Примітки: в таблиці наведено результати дрібноділянкового експерименту, проведеного в польових умовах; результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Встановлено, що допосівне оброблення розчинами ТПАР ($0,05 \text{ г/дм}^3$) сприяє збільшенню маси насіння на 5-9%, а урожайність культур зростає на 18,8-21,9%. Ймовірно, такі результати можна пояснити також збільшенням кількості стручків та бобів у них (для сої), величини колосків, більшим вмістом у них зерна (для пшениці) та кращою схожістю рослин.

Здійснено апробацію ефективності ТПАР при вирощуванні сої та пшениці в умовах виробничого дослідження, проведеного на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України у 2014 (соя) та 2013-2014рр. (пшениця), табл.6.4.

Таблиця 6.4

Вплив ТПАР на урожайність рослин у польових умовах

Рослина	Варіанти оброблення насіння	Маса 1000 насінин, г	Урожайність	
			т/га	%
Соя сорту Іванка	Контроль (Вода)	140,6±5,0	1,46±0,09	100,0
	ТПАР 0.05 г/дм ³	156,1±5,8	1,73*±0,11	118,2
Пшениця сорту Золотоколоса	Контроль (Вода)	46,3±1,1	2,87±0,17	100,0
	ТПАР 0.05 г/дм ³	50,6±1,3	3,48*±0,21	121,3

Примітки: в таблиці наведено результати експерименту, проведеного в виробничих умовах; результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Результати виробничого дослідження показали, що допосівне оброблення насіння ТПАР сприяє приросту маси зерен пшениці на 9%, бобів сої – на 11%, а урожайність культур зростає на 18-21%. Ці дані підтверджують попередньо отримані результати.

Отже, препарати на основі метаболітів *R. erythropolis* Au-1 мають значні перспективи практичного використання у рослинництві як безпечні та ефективні стимулятори росту рослин.

6.2. Продукти штаму *R. erythropolis* Au-1 як інгібітори корозії металів

Вперше встановлено, що метаболіти штаму *R. erythropolis* Au-1 володіють антикорозійними властивостями (табл. 6.5).

Таблиця 6.5.

Вплив розчинів метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 на корозійну активність хлоридного розчину щодо сталі Ст3

№	Варіант, 0,1% NaCl, t=20°C	Швидкість корозії, $K_m \times 10^6$, г/см ² ·год	Ступінь захисту, Z, %	Глибинний показник швидкості корозії, П, мм/рік
1	Неінгібоване середовище	9,50	-	0,120
2	Поживне середовище	2,09	78	0,027
3	ТПАР, 1 г/дм ³	0,95	90	0,012
4	ТПАР, 0,5 г/дм ³	0,95	90	0,012
5	ТПАР, 0,25 г/дм ³	1,24	87	0,016
6	ТПАР, 0,125 г/дм ³	1,90	80	0,024
7	ЕПК, 5 г/дм ³	1,71	82	0,022
8	ЕПК, 1 г/дм ³	2,38	75	0,030
9	СКР (ТПАР, 0,5 г/дм ³)	0,29	97	0,004
10	СКР (ТПАР, 0,25 г/дм ³)	0,29	97	0,004
11	СКР (ТПАР, 0,125 г/дм ³)	0,67	93	0,009

Примітки: ТПАР – трегалозоліпідні ПАР; СКР – супернатант культуральної рідини; ЕПК – екзополісахаридний комплекс; температура

середовища – 20°C; тривалість експерименту – 7 діб; результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Показано, що ступінь захисту сталевих пластинок від корозії розчинами ЕПК, ТПАР знаходився в межах 75-90%. Досліджено також вплив вихідного поживного середовища для вирощування мікроорганізмів (містить фосфати, які є відомими ігнібіторами корозії) на корозію сталевих пластинок ($Z=78\%$). Визначено, що найефективнішим ігнібітором корозії є супернатант культуральної рідини (ступінь захисту $Z=93-97\%$), до складу якого входять трегалозоліпідні ПАР, ЕПК, сліди компонентів поживного середовища. Ймовірно, такий ефект захисту досягається синергетичним впливом усіх компонентів.

Визначено, що СКР штаму *R. erythropolis* Au-1 інгібує корозію як сталі ($Z=77-88\%$), так і алюмінієвого сплаву за різних температур ($Z=45-81\%$), табл.6.6.

Таблиця 6.6.

Вплив СКР штаму *R. erythropolis* Au-1 на корозійну активність хлоридного розчину щодо сталі та алюмінію

Матеріал	Варіант, 0,1% NaCl	t, °C	Швидкість корозії, $K_m \times 10^6$, г/см ² ·год	Ступінь захисту, Z, %	Глибинний показник швидкості корозії, П, мм/рік
Сталь 20	Неінгібоване середовище	25	11,62	-	0,148
		40	22,95	-	0,292
		50	26,25	-	0,334
	СКР (ТПАР 0,25 г/дм ³)	25	1,42	88	0,018
		40	4,40	81	0,056
		50	6,13	77	0,078
Алюм іній	Неінгібоване середовище	25	8,17	-	0,104
		40	17,60	-	0,224

		50	21,62	-	0,275
	СКР (ТПАР 0,25 г/дм ³)	25	4,48	45	0,057
		40	5,89	67	0,075
		50	4,09	81	0,052

Примітки: *t* - температура; СКР – супернатант культуральної рідини; ТПАР – трегалозоліпідні ПАР.

Поляризаційними дослідженнями виявлено суттєве зменшення анодних і катодних струмів зразків сталі Ст 3 після їх витримки протягом 24 та 96 год у корозивному середовищі – синтетичному кислому дощі, інгібованому ТПАР (рис. 6.4).

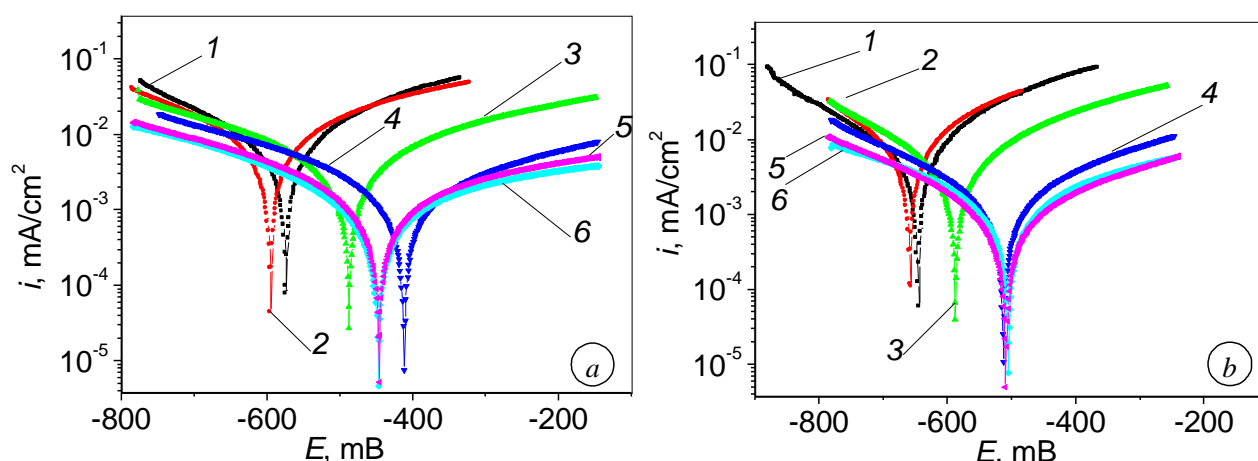


Рис. 6.4. Поляризаційні криві сталі Ст 3 після витримки 24 год (а) та 96 год (б) у синтетичному кислому дощі: 1 – неінгібований розчин; 2 – 0,05 г/дм³ ТПАР; 3 – 0,1 г/дм³ ТПАР; 4 – 0,15 г/дм³ ТПАР; 5– 0,2 г/дм³ ТПАР; 6 – 0,25 г/дм³ ТПАР.

Зі збільшенням концентрації ТПАР від 0,15 до 0,25 г/дм³ інгібування електродних реакцій на сталі значно посилювалося, що можна пояснити наближенням концентрації розчину ТПАР до значень ККМ. При чому потенціал корозії зміщувався в анодну область на 100...200 мВ. Густина струму корозії металу зменшувалася у 5–9 разів порівняно зі значенням, одержаним у неінгібованому середовищі, що може вказувати на утворення бар'єрних

адсорбційних плівок на поверхні металу. В інгібованих розчинах спостерігали переважно змішаний катодно-анодний контроль корозії сталі.

Результати квантово-хімічного розрахунку показують, що електронні характеристики молекули трегалозо-6-мономіколату (для розрахунку вибрано структуру $C_{62}H_{118}O_{15}$ з молекулярною вагою – 1103,60 а.м.у) є важливими параметрами для прогнозування її реакційної здатності на поверхні металу. Зокрема, негативне значення енергії ЕНОМО молекули трегалозо-6-мономіколату свідчить загалом про фізичний механізм її адсорбції на поверхні. Значення ЕНОМО і ELUMO є -9,244 і -0,021 eV відповідно. Досить високе числове значення ЕНОМО (9,244 eV) вказує на донорні властивості молекули, тобто свідчить про передачу електронів до акцептора – металічного атома з незайнятими молекулярними орбіталями та, відповідно, адсорбцію трегалозо-6-мономіколату на поверхні металу.

Встановлено, що електронні густини НОМО локалізовані на карбонільних групах трегалозо-6-мономіколату та частково на атомі кисню, який з'єднує глікозидні цикли, кисневі атоми яких є донорами електронів. Вуглецевий ланцюг $CH_3(CH_2)_6$ є гідрофобною частиною молекули. Електронна густина LUMO загалом локалізована на гідроксильних групах глікозидних циклів молекули інгібітора. Це означає, що ці групи можуть приймати електрони з металічних атомів з утворенням антизв'язуючих орбіталей та працювати як акцептор електронів.

Однак отримане числове значення ширини енергетичної щілини трегалозо-6-мономіколату є значно вищим (9,219 eV) порівняно, наприклад, із відомими інгібіторами, які містять аміногрупи ($\approx 3...4$ eV). Це свідчить про низьку реакційну здатність молекули загалом, що підтверджується розрахунками її параметрів жорсткості η (4,609 eV) та м'якості σ (0,108 eV), а також значенням електронегативності (5,32 eV). Цьому сприяє, на нашу думку, просторова будова молекули, функціональні групи якої знаходяться в різних площинах, та наявність гідрофобних вуглецевих ланцюгів.

Результати щодо реакційної здатності функціональних груп підтверджено розрахунками розподілу електронного заряду на атомах трегалозо-6-мономіколату. Відомо, що негативніше заряджені атоми деяких функціональних груп можуть взаємодіяти з атомами металу на поверхні або іонами металів у середовищі з утворенням зв'язку за донорно-акцепторним механізмом. Електрофільні атаки молекули відбуваються на ділянках негативного заряду. Це означає, що ділянки іонної реактивності можна оцінити із зарядів атомів у молекулі. Середні значення маллікеновських зарядів на атомі кисню, розраховані на функціональних групах трегалозо-6-мономіколату наведені на рис. 6.5.

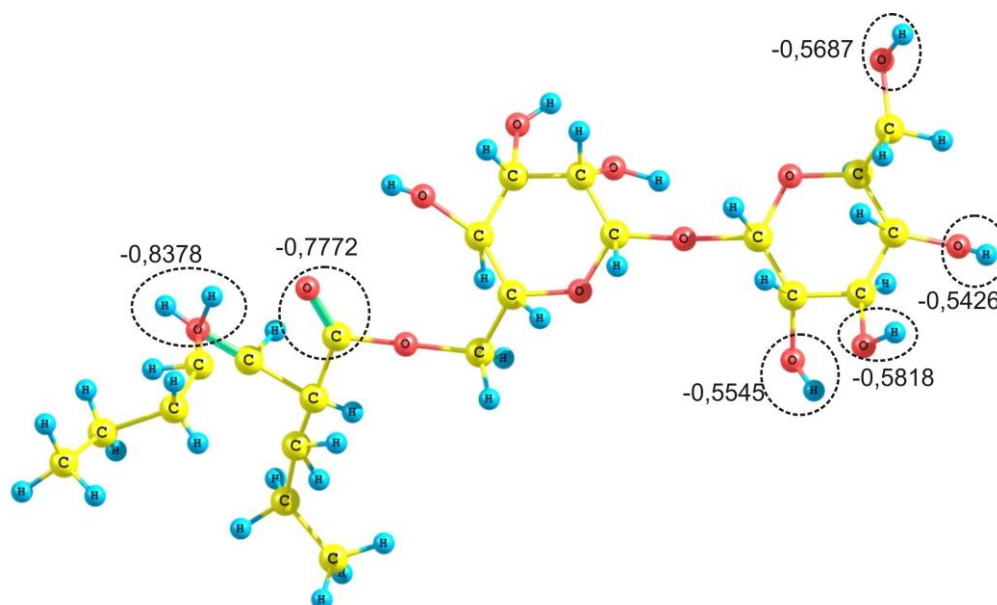


Рис. 6.5. Розраховані електронні заряди на функціональних групах трегалозо-6-мономіколату.

Таким чином, трегалозо-6-мономіколату (входить до складу ТПАР) може інгібувати корозію поверхні металу через фізичну адсорбцію та гідрофільні частини карбонільних і гідроксильних груп (полярної або іонних груп) за донорно-акцепторним механізмом, тоді як гідрофобна частина $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6$ обернена до поверхні розчину, утворюючи гідрофобний бар'єр і зменшуючи тим швидкість корозії.

Додаткове введення невеликої кількості малорозчинного фосфату цинку, в кількості 60 мг/дм^3 , в середовище, інгібоване ТПАР, істотно зменшує корозію

вуглецевої сталі. Про це свідчать дані поляризаційних досліджень. Потенціал корозії сталі в середовищі, інгібованому композицією ТПАР та цинк фосфату найбільше зміщується в позитивну сторону, а швидкості електродних реакцій та густина струму саморозчинення металу найменші (рис. 6.6).

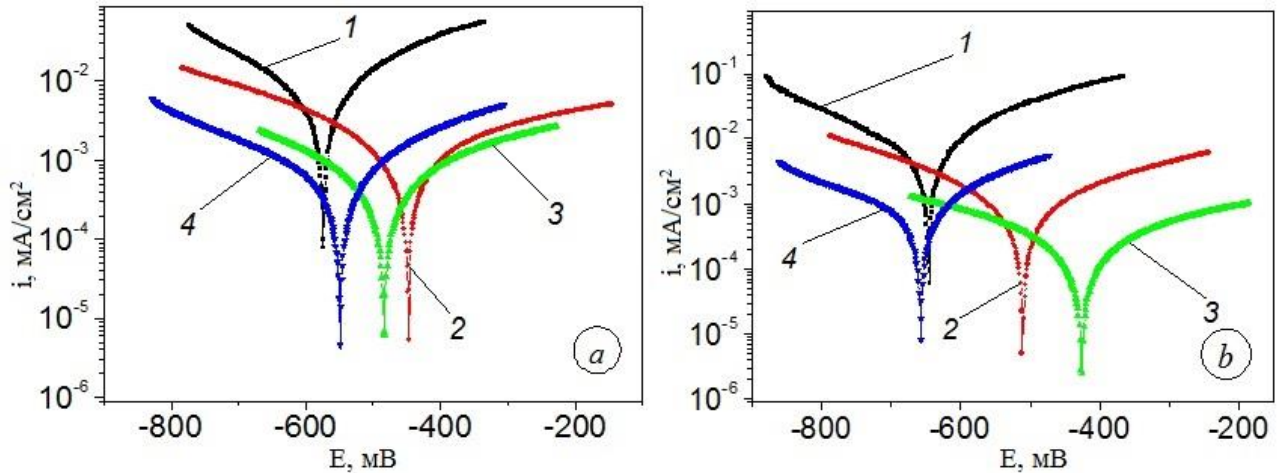


Рис. 6.6. Поляризаційні криві СтЗ після витримки 24 год (а) та 96 год (б) у синтетичному кислому дощі: 1 – неінгібований розчин; 2 – 0,25 г/дм³ ТПАР; 3 – 0,25 г/дм³ ТПАР+0,06 г/дм³ фосфату цинку; 4 – 0,06 г/дм³ фосфату цинку.

Ступінь захисту вуглецевої сталі інгібувальною композицією досягає 93-96% (табл. 6.7).

Таблиця 6.7.

Ступінь захисту вуглецевої сталі інгібувальною композицією ТПАР та цинк фосфату у синтетичному кислому дощі, Z, %

Час, год	0,25 г/дм ³ ТПАР	0,25 г/дм ³ ТПАР+ 0,06 г/дм ³ цинк фосфату	0,06 г/дм ³ цинк фосфату
24	90	93	85
96	91	96	88

Композиція забезпечує вищий ступінь захисту вуглецевої сталі у синтетичному кислому дощі, ніж її компоненти, взяті окремо. Візуально можна було бачити (рис. 6.8), що поверхня сталі після 25 діб експозиції в кислому дощі покрилася продуктами корозії коричневого кольору з домішками

зеленуватих. Водночас в цьому ж корозивному розчині, інгібованому композицією “ТПАР+цинк фосфат”, сталь практично не кородувала.

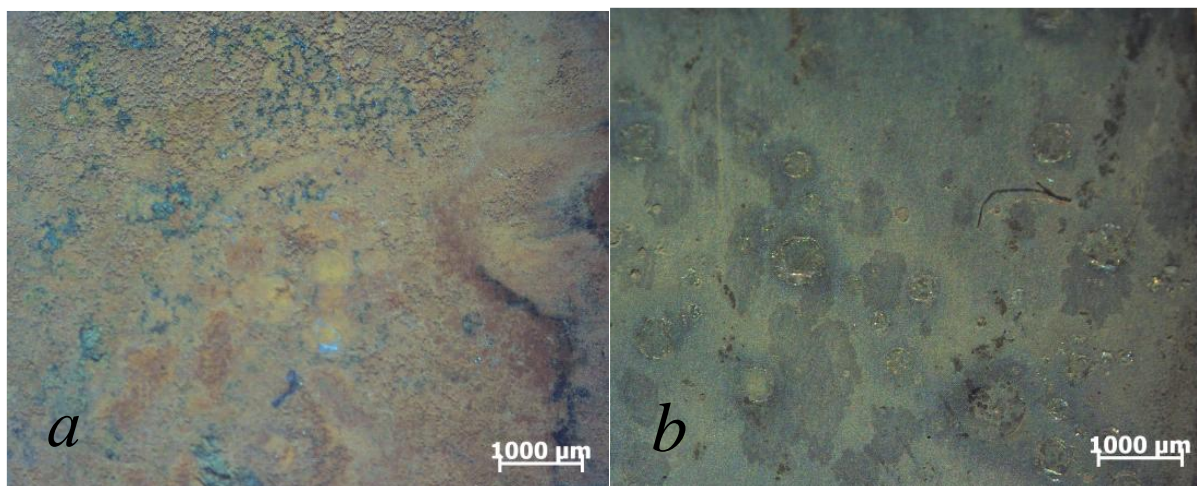


Рис. 6.7. Поверхня зразків сталі Ст 3 після 25 діб експозиції в кислому дощі неінгібованому (a) та інгібованому композицією ТПАР + фосфат цинку (b), (оптичний стереомікроскоп Carl Zeiss Stemi 2000).

Запатентовано антикорозійні композиції для вуглецевої сталі, до складу якої входять ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 та дисперсного цинк фосфату у різних співвідношеннях (патент № 136578, 2019), (табл.6.8).

Таблиця 6.8.

Приклади складу інгібіторної композиції (№1-5)

Компоненти	Вміст компонентів, мас.%				
	1	2	3	4	5
ТПАР*	97,0	93,0	90,0	86,0	84,0
Цинк фосфат	3,0	6,0	10,0	14,0	16,0

Примітки: * супернатант культуральної рідини штаму *R. erythropolis* Au-1 за вмісту ТПАР 0,1% (1 г/дм³).

Вивчено швидкість корозії та ступінь захисту вуглецевої сталі за використання розроблених композицій у пластовій воді за різних температур після 175 год випробувань (табл.6.9).

Таблиця 6.9.

Захист вуглецевої сталі розробленими композиціями у пластовій воді

Склад інгібіторної композиції	Температура розчину, °С					
	20 °С		40 °С		60 °С	
	К, г/см ² ·год	Z, %	К, г/см ² ·год	Z, %	К, г/см ² ·год	Z, %
Модельна пластова вода	$1,75 \cdot 10^{-5}$	–	$1,9 \cdot 10^{-5}$	–	$2,12 \cdot 10^{-5}$	–
Промисловий інгібітор	$3,47 \cdot 10^{-6}$	80,2	$5,45 \cdot 10^{-6}$	77,4	$8,68 \cdot 10^{-6}$	71,5
Приклад №1	$2,42 \cdot 10^{-6}$	86,2	$4,54 \cdot 10^{-6}$	82,6	$7,19 \cdot 10^{-6}$	80,0
Приклад №2	$1,53 \cdot 10^{-6}$	91,3	$4,09 \cdot 10^{-6}$	85,2	$6,64 \cdot 10^{-6}$	83,2
Приклад №3	$0,95 \cdot 10^{-6}$	94,6	$3,23 \cdot 10^{-6}$	90,1	$5,87 \cdot 10^{-6}$	87,6
Приклад №4	$1,59 \cdot 10^{-6}$	90,9	$3,61 \cdot 10^{-6}$	87,9	$6,01 \cdot 10^{-6}$	86,8
Приклад №5	$2,02 \cdot 10^{-6}$	88,5	$4,05 \cdot 10^{-6}$	85,4	$7,42 \cdot 10^{-6}$	78,7

Примітки: час випробувань 175 год; К – швидкість корозії; Z – ступінь захисту; результати достовірні за $p \leq 0,05$ відносно контролю.

Запропоновані інгібіторні композиції ефективніше захищають вуглецеву сталь від корозії у пластовій воді, ніж промисловий інгібітор. Так, при додаванні інгібіторної композиції № 3 до модельної пластової води швидкість корозії сталі порівняно з використанням промислового інгібітора зменшується в 1,47–3,65 рази, а ступінь захисту сталі зростає до 87,6% – 94,6% (таблиця 6.9). Вказаний протикорозійний ефект досягається поєднанням в одній композиції органічної складової – ТПАР та неорганічної – дисперсного цинк фосфату (ТПАР ефективно солюбілізують цинк фосфат). Таким чином синергічна дія цинк фосфату та ТПАР забезпечує високу протикорозійну активність інгібіторної композиції.

Отже, встановлено можливий механізм інгібування корозії трегалозоліпідними ПАР. Визначено, що метаболіти штаму *R. erythropolis* Au-1 можна використовувати як самостійні препарати, так і в складі синтетичних,

для захисту від корозії вуглецевої сталі та алюмінієвого сплаву у 0,1% розчині NaCl, синтетичному кислому дощі, пластовій воді.

Висновки до розділу 6

Встановлено ефективність практичного застосування метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 при вирощуванні зернових та бобових культур в експериментах, проведених у лабораторних та польових умовах. Визначено ефективність різних шляхів допосівного оброблення насіння розчинами ТПАР (замочування та обприскування) та найбільш ефективну концентрацію ТПАР (0,05 г/дм³). Обґрунтовано доцільність застосування СКР штаму *R. erythropolis* Au-1 як препарату для стимулювання росту рослин, встановлено його ефективні концентрації.

Стимулювальну дію ТПАР на рослини підтверджено під час апробації ефективності ТПАР за вирощування сої та пшениці в умовах виробничого дослідження: допосівне оброблення насіння розчинами ТПАР сприяло приросту маси зерна пшениці на 9%, бобів сої – на 11% порівняно з контролем, а урожайність культур зросла на 18-21%.

Вперше встановлено доцільність застосування ТПАР як екологічно безпечних інгібіторів корозії металів та з'ясовано можливий механізм інгібування корозії (адсорбція молекул ТПАР на поверхні вуглецевої сталі з утворенням бар'єрної плівки). Встановлено протикорозійні властивості метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 (СКР, ТПАР, ЕПК), а також їх композицій із синтетичним інгібітором – цинк фосфатом для захисту вуглецевої сталі та алюмінієвого сплаву за різних температур у 0,1% розчині NaCl, синтетичному кислому дощі, пластовій воді (ступінь захисту становить 45-97 %).

Вперше розроблено і запатентовано антикорозійну композицію для вуглецевої сталі, до складу якої входять 84-97 мас % СКР штаму *R. erythropolis* Au-1 (вміст ТПАР 1 г/дм³) та цинк фосфат – 3-16 мас %.. Ступінь захисту

вуглецевої сталі за використання розробленої композиції у пластовій воді за різних температур досягає 87,6 – 94,6%.

Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:

1. Корецька, Н.І.; Баранов, В.І.; Пристай, М.В.; Карпенко, О.В. Вплив метаболітів бактерій роду *Rhodococcus* на ростові показники проростків пшениці. *Вісник НУ «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2013. 761, с.128-132.
2. Баня, А. Р.; Баранов, В. І.; Карпенко, І. В.; Корецька, Н. І.; Вільданова, Р. І.; Карпенко, О. В. Вплив біогенних поверхнево-активних речовин і мікробного препарату на морфометричні показники проростків *Raphanus sativus L.* і *Pisum arvense L.* *Біологічні студії*. 2013, том 7, №1, с.115-122.
3. Похмурський, В.І.; Зінь, І.М.; Карпенко, О.В.; Покинсьброда, Т.Я.; Корецька, Н.І.; Тимусь, М.Б.; Квятковські, Л.; Копилець, В., Хлопик О. Захист вуглецевої сталі інгібіторами біогенного походження. *Проблеми корозії та протикорозійного захисту матеріалів / Спецвипуск журналу “Фізико-хімічна механіка матеріалів”*. – № 12. – Львів: Фізико-механічний інститут ім. Г.В. Карпенка НАН України, 2018. с.183-187.
4. Pokhmurs'kyi, V. I.; Zin', I. M.; Tymus', M. B.; Kornii, S. A.; Karpenko, O. V.; Khlopyk, O. P.; **Korets'ka, N. I.** Inhibition of the corrosion of carbon steel by xanthan biopolymer. *Materials Science* 2020. 55 (4). (Ukrainian Original Vol. 55, No. 4, July–August, 2019). <https://doi.org/10.1007/s11003-020-00334-z>.
5. Zin, I. M.; Karpenko O. V.; Pokyn'broda, T. Ya.; Korets'ka, N. I.; Tymus', M. B.; Kwiatkowski, L.; Kornii, S. A. Inhibition of the corrosion of carbon steels by trehalose lipid surfactants. *Materials Science*, 2019, 54 (4), pp 522-528 (Ukrainian Original Vol. 54, No. 4, July–August, 2018). [DOI 10.1007/s11003-019-00207-0](https://doi.org/10.1007/s11003-019-00207-0).
6. Слободян, З. В.; Маглатюк, Л. А.; Купович, Р. Б.; Корецька, Н. І.; Зінь, Я. І. Вплив супернатанту культуральної рідини трегалозоліпиду на корозію сталі 20 та алюмінію в хлоридних розчинах. *Фізико-хімічна механіка матеріалів* 2019, 55 (5), с.27-33.

7. Патент України на корисну модель № 136578 від 27.08.2019. Інгібіторна композиція. Зінь, І.М.; Похмурський, В.І.; Карпенко, О.В.; Слободян, З.В.; Тимусь, М.Б.; Корній, С.А.; Хлопик, О.П.; Корецька, Н.І.; Покинсьброда, Т.Я.; Ногіна, Т.М.; Хоменко, Л.А.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі обґрунтовано і практично розв'язано важливе науково-технологічне завдання – розроблення біотехнології поверхнево-активних продуктів актинобактерій *R. erythropolis* Au-1, встановлення їх фізико-хімічних і біологічних властивостей та напрямків практичного застосування. Зокрема:

1. У результаті скринінгу культур *R. erythropolis* обрано штам *R. erythropolis* Au-1 – перспективний продуцент клітинно-зв'язаних і позаклітинних трегалозоліпідних ПАР, екзополісахаридного комплексу. Вперше виділено клітинний біополімер, який ідентифіковано як полігідроксиалканоат. Розроблено раціональний склад поживного середовища та проведено апробацію синтезу ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 у біореакторі з вихровою системою аерації. У результаті вихід цільових продуктів зріс на 41-50%: клітинно-зв'язаних ТПАР – до 4,8 г/дм³, а позаклітинних ТПАР – до 1,5 г/дм³.

2. Встановлено доцільність застосування відходів олійної і харчової промисловості, зокрема, фосфатидних концентратів, фузів, відпрацьованої олії як дешевих субстратів для синтезу метаболітів *R. erythropolis* Au-1: вихід АСБ становив 10,1-11,7 г/дм³, клітинно-зв'язаних ТПАР – 1,4-1,7 г/дм³, позаклітинних – 2,4-2,6 г/дм³. Показано, що отримані продукти (із залишками олійних субстратів) можна застосовувати у рослинництві.

3. З використанням математичного моделювання (метод лінійних багатопараметрових рівнянь) визначено, що оптимальними екстрагентами ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 з культуральної рідини є розчинники з високою поляризуючою здатністю щодо молекул ТПАР. Розроблено нові методи виділення позаклітинних ТПАР – сорбція на натрій альгінаті або багат шарових магніточутливих композитних адсорбентах на основі оксидів перехідних металів. Найбільш раціональним сорбентом є композит з CuO – вихід ТПАР становив 0,88 г/дм³. Визначено, що ефективним й екологічно безпечним екстрагентом для трегалозоліпідних ПАР є етанол.

4. Розроблено технологію та запропоновано апаратурно-технологічну схему промислового виробництва практично цінних метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1. Технологія дає змогу максимально використати усі компоненти постферментаційної культуральної рідини та одержати 5 цільових продуктів: супернатант культуральної рідини, позаклітинні та клітинно-зв'язані трегалозоліпідні ПАР, екзополісахаридний комплекс, полігідроксиалканоат.

5. Визначено фізико-хімічні і біологічні властивості продуктів штаму *R. erythropolis* Au-1: висока поверхнева активність ТПАР (поверхневий натяг 35-36 мН/м, ККМ – 0,3-0,5 г/дм³), емульгування гідрофобних речовин супернатантом культуральної рідини (E₂₄ – 35-61%) і розчинами ЕПК (E₂₄ – 42-58%), підвищення змочування поверхонь. Показано, що ТПАР є регуляторами проникності клітинних мембран мікроорганізмів і рослин. Трегалозоліпідні ПАР є низько токсичними речовинами у порівнянні з синтетичними ПАР і рамноліпідами – цитотоксична доза становить 0,477-0,541 г/дм³.

6. Встановлено, що у композиціях з ТПАР підсилюється дія біологічно активних речовин. Розроблено препарати ТПАР з біоцидами-тіосульфонатами, в яких мінімальні інгібувальні і біоцидні концентрації тіосульфонатів знижено на 20-50%. Запропоновано комплексний регулятор росту рослин на основі індоліл-3-оцтової кислоти з ТПАР, що дозволяє зменшити дозу фітогормону у 10 разів.

7. У лабораторних та польових дослідах доведено ефективність метаболітів *R. erythropolis* Au-1 у рослинництві. Визначено раціональну концентрацію ТПАР (0,05 г/дм³) для стимулювання росту бобових і злакових рослин при допосівному обробленні насіння (надземна маса сої і пшениці зростала у середньому на 25%, а коренева – на 33% щодо контролю, урожайність культур – на 20%). Ефективним засобом допосівного оброблення насіння є СКР завдяки синергічній дії його компонентів: ТПАР, ЕПК, ауксинових фітогормонів.

8. Встановлено, що поверхнево-активні метаболіти штаму *R. erythropolis* Au-1 (СКР, ТПАР, ЕПК) є екологічно безпечними інгібіторами корозії сталі та алюмінію: в 0,1% розчині NaCl, синтетичному кислому дощі та пластовій воді ступінь захисту становив 45-97%. Розроблено синергічні інгібувальні

композиції СКР з цинк фосфатом, які забезпечують високий ступінь захисту вуглецевої сталі у пластовій воді – 88-95% (патент України № 136578, 2019).

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

Abdel-Mawgoud, A. M.; Stephanopoulos, G. Simple glycolipids of microbes: Chemistry, biological activity and metabolic engineering. *Synthetic and Systems Biotechnology* [Online] **2017**, *3* (1), pp 3-19. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.12.001>.

Abdel-Megeed, A.; Al-Rahma, A.; Mostafa, A.; Husnu Can Baser, K. Biochemical characterization of anti-microbial activity of glycolipids produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Pak. J. Bot.* [Online] **2011**, *43* (2), pp 1323-1334. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43\(2\)/PJB43\(2\)1323.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43(2)/PJB43(2)1323.pdf) (accessed Apr 27, 2020).

Abboud, J. L. M.; Notario, R. Critical compilation of scales of solvent parameters. I. Pure, non-hydrogen bond donor solvents. *J.Appl.Chem.* **1999**, *71* (4): pp 845-718.

Alizadeh-Sani, M.; Hamishehkar, H.; Khezerlou, A.; Azizi-Lalabadi, M.; Azadi, Y.; Nattagh-Eshtivani, E.; Fasihi, M.; Ghavami, A.; Aynehchi, A.; Ehsani, A. Bioemulsifiers derived from microorganisms: applications in the drug and food industry. *Adv Pharm Bull* [Online] **2018**, *8* (2), 191. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.023>

Allied Market Research. Surfactants Market Overview. <https://www.alliedmarketresearch.com/surfactant-market> (accessed May 5, 2020).

de Almeida, D. G.; Soares da Silva, R. D.; Luna, J. M.; Rufino, R. D.; Santos, V. A.; Banat, I. M.; Sarubbo, L. A. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Front Microbiol* [Online] **2016**, *7*, p 1718. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01718>.

Altaee, N.; Fahdil, A.; Yousif, E.; Sudesh, K. Recovery and subsequent characterization of polyhydroxybutyrate from *Rhodococcus equi* cells grown on crude palm kernel oil. *Journal of Taibah University for Science* [Online] **2016**, *10* (4), pp 543-550. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.09.003>

Alvarez, H. M.; Kalscheuer, R.; Steinbüchel, A. Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effect of inhibitors and polyethylene glycol. *Fett-Lipid* [Online] **1997**, *99*, pp 239-246.

<https://doi.org/10.1002/lipi.19970990704>

Al-wazni, W. S. Immunological effects of Biosurfactant extract from *Serratia marcescens* in mice. *Al-Kufa University Journal for Biology* [Online] **2016**, 7 (2), pp 36-42. <http://journals.uokufa.edu.iq/index.php/ajb/article/viewFile/8492/pdf> (accessed Apr 27, 2020).

Akbari, S.; Abdurahman, N. H.; Yunus, R. M.; Fayaz, F.; Alara, O. R. Biosurfactants – a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnol Res Innov* [Online] **2018**, 2 (1), pp 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>

Awada, S. M., [Spendlove](#), R. S.; [Awada](#) M. (Agscitech Inc.) US Patent US 7,994,138 B2 Microbial biosurfactants as agents for controlling pests. Aug. 9, 2011.

Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, 53(5):495-508. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>

Banat, I. M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, M. G; Fracchia, L.; Smyth, T. J.; Marchant, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* [Online] **2010**, 87, pp 427–444. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>

Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**. 98 (7), pp 5648–5563.

Bell, K. S.; Philip, J. C.; Aw, D.W.J.; Christofi, N. The Genus *Rhodococcus*. *J. Appl. Microbiol* [Online] **1998**, 85, pp 195-210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00525.x>

Braunegg, G; Bona, R.; Koller, M. Sustainable polymer production. *Polymer-plastic Technol. and Eng* [Online] **2004**, 43 (6), pp 1779-1793. <https://doi.org/10.1081/PPT-200040130>

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* [Online] **1976**, 72 (1-2) pp 248 –254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brycki, B. E.; Kowalczyk, I. H.; Szulc, A.; Kaczerewska, O.; Pakiet, M. Organic Corrosion Inhibitors. In *Corrosion Inhibitors, Principles and Recent Applications*; [Online] Aliofkhazraei, M., Ed.; IntechOpen: London, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72943>.

Bugnicourt, E.; Cinelli, P.; Lazzeri, A.; Alvarez, V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym. Lett.* [Online] **2014**, *8* (11), pp 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>

Bucci, A. R.; Marcelino, L.; Mendes, R. K.; Etchegaray, A. The antimicrobial and antiadhesion activities of micellar solutions of surfactin, CTAB and CPCl with terpinen-4-ol: applications to control oral pathogens. *World J Microbiol Biotechnol* [Online] **2018**, *34* (6), p 86. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2472-1>

Casillo, A.; Lanzetta, R.; Parrilli, M.; Corsaro, M. M. Exopolysaccharides from Marine and Marine Extremophilic Bacteria: Structures, Properties, Ecological Roles and Applications. *Marine drugs* [Online] **2018**, *16* (2), p 69. <https://doi.org/10.3390/md16020069>

Castro, A. R.; Rocha, I.; Alves, M. M.; Pereira, M. A. *Rhodococcus opacus* B4: a promising bacterium for production of biofuels and biobased chemicals. *AMB Express* [Online] **2016**, *6* (35). <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0207-y>

de Carvalho, C. C.; da Fonseca M. M. The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* [Online] **2005**, *67* (6), pp 715-26. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1932-3>

Chen, G. Q.; Wu, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* [Online] **2005**, *26* (33), pp 6565-6578. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.036>

Chuo, S.C.; Abd-Talib, N.; Mohd-Setapar, S.H.; Hassan, H.; Nasir, H.M.; Ahmad, A.; Lokhat, D.; Ashraf, G.M. Reverse micelle extraction of antibiotics using an eco-friendly sophorolipids biosurfactant. *Sci Rep* [Online] **2018**, *8* (1), 477. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18279-w>

Cornelis, K.; Ritsema Nijse, T. J.; Holsters, M.; Goenthals, K.; Jaziri, M. The

plant pathogen *Rhodococcus fascians* colonizes the exterior and interior of the aerial parts of plants. *Mol. Plant Microbe Interact* [Online] **2001**, 14, pp 599-608. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.5.599>

Das, P.; Mukherjee, S.; Sen, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere* [Online] **2008**, 72 (9), pp 1229–1234. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.015>

D'aes, J.; De Maeyer, K.; Pauwelyn, D.; Hofte M. Biosurfactants in plant-Pseudomonas interactions and their importance to biocontrol. *Environmental Microbiology Reports* [Online] **2010**, 2, pp 359 – 372. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00104.x>

Dawes, E. A. Polyhydroxybutyrate: An Intriguing Biopolymer. *Biosci. Rep.* [Online] **1988**, 8 (6): pp 537-547. <https://doi.org/10.1007/BF01117332>

Deleu, M.; Paquot, M. From renewable vegetablesresources to microorganisms: new trends in surfactants. *Comptes Rendus Chimie* [Online] **2004**, 7 (6-7), pp 641-646. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2004.04.002>

Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.; Rebers, P.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **1956**, 28, pp 350 – 356. https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5012807/mod_resource/content/0/Dubois_1956%20%28m%C3%A9todo%29.PDF (accessed Apr 28, 2020).

Edwards, K. R.; Lepo, J. E.; Lewis, M. A. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. *Mar Pollut Bull* [Online] **2003**, 46 (10), pp 1309–1316. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00238-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00238-8)

Farmer S, Alibek K, Muzumber S., Adams K., Dixon T., Chen Y., Milovanovic M. Microbial products and uses thereof to improve oil recovery. US. Patent US 2020/0071600 A1, March 5, 2020. <http://www.freepatentsonline.com/y2020/0071600.html> (accessed Apr 28, 2020).

Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, Gh. A simple method for the isolation and

purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **1957**. – Vol.226. – P.497 – 509. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781> (accessed Apr 28, 2020).

Fracchia, L.; Ceresa, C.; Franzetti, A.; Cavallo, M.; Gandolfi, I.; van Hamme, J.; Gkorezis, P.; Marchant, R.; Banat, I.M. (2014) *Industrial applications of biosurfactants*. In *Biosurfact: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics*. Kosaric, N.; Sukan, F.V. Eds.; CRC Press: Florida, USA, 2014, Volume 3, pp 245-360. <https://www.routledge.com/Biosurfactants-Production-and-UtilizationProcesses-Technologies-and/Kosaric-Sukan/p/book/9781466596696> (accessed Apr 28, 2020).

Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Smyth, T.; Banat, I. Production and application of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology* [Online] **2010**, *112* (6), pp 617 – 627. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900162>

Fuchtenbusch, B.; Steinbuchel, A. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from low-rank coal liquefaction products by *Pseudomonas oleovorans* and *Rhodococcus ruber*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* [Online] **1999**, *52*, pp 91-95. <https://doi.org/10.1007/s002530051492>

Gharaei-Fathabad, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry. (A mini-review). *Am J Drug Discov and Devel* [Online] **2011**, *1* (1), pp 58-69. <https://doi.org/10.3923/ajdd.2011.58.69>

Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications *Scientifica (Cairo)*. [Online] **2012**, *2012*. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.

George, S.; Jayachandran, K. Biosurfactants from Processed Wastes. In *Waste to Wealth. Energy, Environment, and Sustainability*; Singhania, R., Agarwal, R., Kumar, R., Sukumaran, R., Eds; Springer: Singapore, 2018; chapter 2, pp 45-58 https://doi.org/10.1007/978-981-10-7431-8_2

Gunawan, S.; Vorderbruggen, M.A.; Armstrong, C.D. Method of using biosurfactants as acid corrosion inhibitors in well treatment operations. USA Patent 2016/0237334 A1. August 18, 2016.

<http://www.freepatentsonline.com/y2016/0237334.html> (accessed May 1, 2020).

Gutnick, D. L.; Minas, W. A. Perspectives on microbial surfactants. *Biochemical Society Transactions* **1987**, 15, pp 228 – 356.

Inaba, T.; Tokumoto, Y.; Miyazaki, Y.; Inoue N.; Maseda, H.; Nakajima-Kambe, T.; Uchiyama, H.; Nomura, N. Analysis of genes for succinoyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. Strain SD-74. *Appl Environ Microbiol.* [Online] **2013**; 79 (22), pp 7082–7090. <https://doi.org/10.1128/AEM.01664-13>.

Ivanković, T.; Hrenović, J. Surfactants in the Environment. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju [Online] **2010**. 61. 95-110. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1943>.

Ivshina, I. B.; Kuyukina, M. S.; Philp, J. C.; Christofi, N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. *World J Microbiol Biotechnol.* [Online] **1998**, 14, pp 711–717. <https://doi.org/10.1023/A:1008885309221>

Ha, C. S.; Cho, W. J. Miscibility, properties and biodegradability of microbial polyester containing blends. *Prog. Polym. Sci.* [Online] **2002**, 27 (4): pp 759-809. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00050-8)

Hirata, Y.; Ryu, M.; Oda, Y.; Igarashi, K.; Nagatsuka, A.; Furuta, T.; Sugiura, M. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. *J Biosci Bioeng.* [Online] **2009**, 108 (2), pp 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.03.012>

Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, PH. A.; Staley, j. T.; Williams, S. T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Moscow: Myr. 1997, 2, p 368. ISBN 5-03-003110-3.

Hu, X.; Li, D.; Qiao, Y.; Wang, X.; Zhang, Q.; Zhao, W.; Huang, L. Purification, characterization and anticancer activities of exopolysaccharide produced by *Rhodococcus erythropolis* HX-2. *Int J Biol Macromol.* **2020**, 145, pp 646-654. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.228>.

Hultberg, M.; Bergstrand, K.J.; Khalil, S.; Alsanius, B. Production of

biosurfactants and antibiotics by fluorescent pseudomonads isolated from a closed hydroponic system equipped with a slow filter. *Antonie van Leeuwenhoek* [Online] **2008**, 93 (4), pp 373-80. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9214-y>

Hwang, Y. H.; Kim, M. S.; Song, I. B.; Park, B. K.; Lim, J. H.; Park, S. C.; Yun, H. I. Subacute (28 day) toxicity of surfactin C, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, in rats. *J Health Sci.* [Online] **2009**, 55 (3), pp 351–355. <https://doi.org/10.1248/jhs.55.351>

Jahan, R.; Bodratti, A. M.; Tsianou, M.; Alexandridis, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science.* [Online] **2020**, 275: 102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>

Jana, S.; Mondal, S.; Kulkarni, S. S. Chemical Synthesis of Biosurfactant Succinoyl Trehalose Lipids. *Organic Letters* [Online] **2017**, 19 (7), pp 1784-1787. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b00550>

Janek, T.; Krasowska, A.; Czyżnikowska, Z.; Łukaszewicz M. Trehalose lipid biosurfactant reduces adhesion of microbial pathogens to polystyrene and silicone surfaces: an experimental and computational approach. *Front Microbiol* [Online] **2018**; 9: 2441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02441>

Jameson, P. E.; Dhandapani, P.; Song, J.; Zatloukal, M.; Strnad, M.; Remus-Emsermann, M. N. P.; Schlechter, R. O.; Novák, O. The Cytokinin Complex Associated With *Rhodococcus fascians*: Which Compounds Are Critical for Virulence? *Front. Plant Sci.* [Online] **2019** 10:674. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00674>

Kilic, E. Evaluation of degreasing process with plant derived biosurfactant for leather making: An ecological approach. *J Textile Apparel* **2013**, 23:181–187. <https://dergipark.org.tr/en/pub/tekstilvekonfeksiyon/issue/23820/253774> (accessed May 1, 2020)

Kim, S.K.; Kim, Y.C.; Lee, S.; Kim, J.C.; Yun, M.Y.; Kim, I.S. Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach

aphid (*Myzus persicae*). *J Agric Food Chem* [Online] **2010**, 59 (3), pp 934-938.
<https://doi.org/10.1021/jf104027x>

Khanna, S.; Srivastava, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem* [Online] **2005**, 40 (2): pp 607-619.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>

Koppel, I.A.; Palm, V.A. The influence of the solvent on Organic Reactivity. In *Advances in Linear Free Energy Relationships*; Chapman, N.B., Shorter, A.J., Eds.; Plenum Press: London - New York, 1972; p. 203.

Koppel, I. A.; Palm, V. A. Parameters of total solvent activity. *Reactivity of organic compounds* **1974**, 11 (1), pp 121-138.

Kretschmer, A.; Bock, H.; Wagner, F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* **1982**, 4, 864–870.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242110/> (accessed Apr 28, 2020).

Kretschmer, A.; Wagner, F. Characterization of biosynthetic intermediates of trehalose dicorynomycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Biochimica et Biophysica Acta* [Online] **1983**, 753, pp 306 – 313.
[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(83\)90053-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(83)90053-X)

Kumar, S.; Dubey, R. C. Application of Biosurfactant Producing PGPR in Agriculture: A Mini Review. *N Y Sci J* [Online] **2016**, 9 (8), pp 44-55.
<https://doi.org/10.7537/marsnys090816.08>.

Kuyukina, M. S.; Ivshina, I. B.; Philp, J. C.; Christofi, N.; Dunbar, S. A.; Ritchkova, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods* [Online] **2001**, 2, p 149–156.
DOI:[10.1016/s0167-7012\(01\)00259-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00259-7)

Kuyukina, M. S.; Ivshina, I. B.; Gein, S. V.; Baeva, T. A.; Chereshev, V. A. In vitro immunomodulating activity of biosurfactant glycolipid complex from *Rhodococcus ruber*. *Bull Exp Biol Med* [Online] **2007**, 144 (3), pp 326–330.
<https://doi.org/10.1007/s10517-007-0324-3>

Kuyukina, M. S.; Kochina, O. A.; Gein, S. V.; Ivshina, I. B.; Chereshev, V. A.

Mechanisms of Immunomodulatory and Membranotropic Activity of Trehalolipid Biosurfactants (a Review). *Appl Biochem Microbiol* [Online] **2020**, *56*, pp 245–255. <https://doi.org/10.1134/S0003683820030072>

Kuznetsov, Yu.I.; Mercer, A.D.; Thomas, J.G.N. *Organic Inhibitors of Corrosion of Metals* [Online]; Springer: Boston, 1996; p. 283. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1956-4>.

López-Arredondo, D.; Leyva-González, M.; Alatorre-Cobos, F.; Herrera-Estrella, L. Biotechnology of nutrient uptake and assimilation in plants. *Int. J. Dev. Biol.* [Online] **2013**, *57* (6-8), pp 595–610. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130268lh>.

Liu, K.; Sun, Y.; Cao, M.; Wang, J.; Lu, J. R.; Xu, H. Rational design, properties and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [Online] **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.12.005>

Lu, J.; Tappel, R. C.; Nomura, C. T. Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polym. Rev.* [Online] **2009**, *49* (3), pp 226-248. <https://doi.org/10.1080/15583720903048243>

Liu, G.; Zhong, H.; Yang, X.; Liu, Y.; Shao, B.; Liu, Z. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review. *Biotechnol Bioeng.* **2018**, *115* (4):pp 796-814. <https://doi.org/10.1002/bit.26517>

Mahjoubi, M.; Cappello, S.; Souissi, Y.; Jaouani, A.; Cherif, A. Microbial Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon– Contaminated Marine Environments. In *Recent Insights in Petroleum Science and Engineering* [Online] IntechOpen: London, **2018**. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72207>.

Maitani, Y.; Yano, S.; Hattori, Y.; Furuhashi, M.; Hayashi, K. Liposome vector containing biosurfactant-complexed DNA as herpes simplex virus thymidine kinase gene delivery system. *J Liposome Res* [Online] **2006**, *16* (4): pp 359-72. <https://doi.org/10.1080/08982100600992443>

Makitra, R. G.; Turovsky, A. A.; Zaikov, G. E. *Correlation Analysis in Chemistry of Solutions*. VSP: Utrecht - Boston, 2004; p 320 p. <https://www.routledge.com/Correlation-Analysis-in-Chemistry-of-Solutions-1st->

[Edition/Makitra-Turovsky-Zaikov/p/book/9789067644068](#) (accessed Apr 29, 2020).

Makkar, R. S.; Cameotra, S. S.; Banat, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* [Online] **2011**, *1* (1), 5. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5>

Mazaheri-Assadi, M.; Tabatabaee, M. S. Biosurfactants and their use in upgrading petroleum vacuum distillation residue: a review. *Inter J Environ Res* [Online] **2010**, *4* (4), pp 549-72. <http://dx.doi.org/10.22059/IJER.2010.242>

McInerney, M. J.; Javaheri, M.; Nagle, D. P. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. *Journal of Industrial Microbiology* [Online] **1990**, *5*, pp 95–101. <https://doi.org/10.1007/BF01573858>

Mędrzycka, K.; Hallmann, E.; Pastewski, S. Evaluation of surfactant and biosurfactant mixture usefulness in oil removal from soil, based on physicochemical studies and flushing experiments. *Environ Prot Eng* **2009**, *35*, pp 191–205. <https://www.semanticscholar.org/paper/EVALUATION-OF-SURFACTANT-AND-BIOSURFACTANT-MIXTURE-M%C4%99drzycka-Hallmann/400e8e9a69c3a3bbc30b2b13186c31567e4120eb> (accessed May 1, 2020).

Meijer, W. G.; Prescott, J. F. Rhodococcus equi. *Vet. Res.* [Online] **2004**, *35* (4), pp 383-96. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004024>

Mir, Sh.; Jamal, P.; Alama, Md. Z.; Mir, A. B.; Ansari, A. H. Microbial Surface Tensio-active Compounds: Production and Industrial Application Perspectives. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering* [Online] **2017**, *3* (8), pp 273-292. <https://doi.org/10.25141/2475-3432-2017-8.0273>

Mishra, A.; Jha, B. Microbial Exopolysaccharides. In *The Prokaryotes* Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8_25.

Mnif, I.; Ghribi, D. Glycolipid biosurfactants: Main properties and potential applications in agriculture and food industry. *J Sci Food Agric.* [Online] **2016**, *96* (13), pp 4310–4320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7759>.

Mohan, P. K.; Nakhla, G.; Yanful, E. K. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Res.* [Online]

2006, 40 (3). pp 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.030>

Montoneri, E.; Boffa, V.; Savarino, P.; Tambone, F.; Adani, F.; Micheletti, L.; Gianotti, C.; Chiono, R. Use of biosurfactants from urban wastes compost in textile dyeing and soil remediation. *Waste Manag.* **2009** [Online], 29 (1), pp 383-9. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.01.011>.

Mordor Intelligence. Bio-surfactants market – growth, trends, and forecast (2020 - 2025). <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/biosurfactants-market> (accessed May 5, 2020).

Mulligan, C. N.; Sharma, S.K.; Mudhoo, A., Eds. *Biosurfactants: Research Trends & Applications* [Online]; CRC Press: Boca Raton, 2014; p 323. https://www.academia.edu/15914943/BIOSURFACTANTS_Research_Trends_and_Applications (accessed May 4, 2020).

Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F.; James, S.; Bennett, H. P. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environ Sci Technol* [Online] **1999**, 33 (21), pp 3812-3820. <https://doi.org/10.1021/es9813055>

Mulligan, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut.* [Online] **2005**, 133 (2), pp 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>

Mordor Intelligence. Bio-surfactants market – growth, trends, and forecast (2020 - 2025). <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/biosurfactants-market> (accessed May 5, 2020).

Muthusamy, K.; Gopalakrishnan, S.; Ravi, T. K.; Sivachidambaram, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Curr Sci* [Online] **2008**, 94 (6), pp 736-747. <https://www.jstor.org/stable/24100627?seq=1> (accessed May 1, 2020)

Neese, F. The ORCA program system. *WIREs Comput Mol Sci.* [Online] **2012**, 2 (1), pp 73–78. <https://doi.org/10.1002/wcms.81>

Nielsen, T.H.; Sorensen, J. Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **2003**, 69 (2), pp 861-868. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.861-868.2003>.

Nikolova, B.; Antov, G.; Semkova, S.; Tsoneva, I.; Christova, N.; Nacheva, L.; Kardaleva, P.; Angelova, S.; Stoineva, I.; Ivanova, J.; Vasileva, I.; Kabaivanova, L. Bacterial natural disaccharide (trehalose tetraester): molecular modeling and in vitro study of anticancer activity on breast cancer cells. *Polymers* [Online] **2020**, *12*, 499; <https://doi.org/10.3390/polym12020499>.

Okoliegbe, I. N.; Agarry, O. O. Application of microbial surfactant. *Scholarly Journal of Biotechnology* **2012**, *1*, pp 15–23. <http://scholarly-journals.com/sjb/archive/2012/April/pdf/Okoliegbe%20and%20Agarry.pdf> (accessed May 1, 2020).

Ozawa, T.; Ogata, H.; Doi, M. Isolation of transposon Tn5-induced hydrophobic mutants of a *Bradyrhizobium japonicum* strain with improved competitive nodulation abilities. *Soil Science and Plant Nutrition* [Online] **1992**, *38* (3), pp 545-552. <https://doi.org/10.1080/00380768.1992.10415086>

Patil, H. I.; Pratap, A. P. Production and Quantitative Analysis of Trehalose Lipid Biosurfactants Using High-Performance Liquid Chromatography. *J Surfactants Deterg* [Online] **2018**, *21* (4), pp 553-564. <https://doi.org/10.1002/jsde.12158>

Pacwa-Płociniczak, M.; Płaza, G. A.; Piotrowska-Seget, Z.; Cameotra, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* [Online] **2011**, *12* (1), pp 633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>

Patel, S.; Homaei, A.; Patil, S.; Daverey, A. Microbial biosurfactants for oil spill remediation: pitfalls and potentials. *Appl Microbiol Biotechnol* [Online] **2019**, *103* (1): pp 27-37. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9434-2>

Parthipan, P.; Sarankumar, R.K.; Jaganathan, A.; Amuthavalli, P.; Babujanathanam, R.; Rahman, P.K.S.M.; Murugan, K.; Higuchi, A.; Benelli, G.; Rajasekar, A. Biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* A1 and *Pseudomonas stutzeri* NA3 reduce longevity and fecundity of *Anopheles stephensi* and show high toxicity against young instars. *Environ Sci Poll Res* **2018**, *25*, pp 10471-10481. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0105-0>.

Pasiar, M.; Rouhi, L.; Bamzadeh, Z.; Hejazi, S.H. In vitro selective growth inhibition of breast adenocarcinoma cell lines by *Pseudomonas* sp. UW4 metabolites.

Tehran Univ Med J [Online] **2016**, 74 (9), pp 614-620. <http://tumj.tums.ac.ir/article-1-7803-en.html> (accessed May 1, 2020).

Pokhmurs'kyi, V. I.; Karpenko, O. V.; Zin, I. M.; Tymus', M. B.; Veselivs'ka, H. H. Inhibiting action of biogenic surfactants in corrosive media. *Materials Science* [Online] **2014**, 50 (3), pp 448-453. <https://doi.org/10.1007/s11003-014-9741-4>

Poremba, K.; Gunkel, W.; Lang, S.; Wagner, F. Marine Biosurfactants, III. Toxicity Testing with Marine Microorganisms and Comparison with Synthetic Surfactants. *Zeitschrift für Naturforschung C* [Online] **1991**, 46 (3-4), pp 210-216. <https://doi.org/10.1515/znc-1991-3-409>

Radhika, V.; Ueda, N.; Tsuboi, Y.; Kojima, M.; Kikuchi, J.; Takuji Kudo, T.; Sakakibara, H. Methylated Cytokinins from the Phytopathogen *Rhodococcus fascians* Mimic Plant Hormone Activity. *Plant Physiology* [Online], **2015**, 169, pp 1118–1126. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00787>

Rapp, P.; Bock, H.; Wray, V.; Wagner, F. Formation, isolation and characterisation of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Journal of General Microbiology* [Online] **1979**, 115 (12), pp 491-503. <https://doi.org/10.1099/00221287-115-2-491>

Rebello, S.; Asok, A. K.; Mundayoor, S.; Jisha, M. S. Surfactants: Toxicity, remediation and green surfactants. *Environ Chem Lett* [Online] **2014**, 12, pp 275–287. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0466-2>

Recommendations for Reporting the Results of Correlation Analysis in Chemistry using Regression Analysis. *Quant. Struct. Act. Relat.* 1985; 4 (1): p 29-39.

Reichardt, Ch. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Wiley VCH: Weinheim, 2003; p 630.

Rodrigues, L.; Banat, I.M.; Teixeira, J.; Oliveira, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* [Online] **2006**, 57 (4), pp 609-618. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl024>

Sachdev, D. P.; Cameotra, S. S. Biosurfactants in agriculture. *Int J Appl Microbiol Biotechnol* [Online] **2013**, 97, pp 1005–1016. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8>

Sahnoun, R.; Mnif, I.; Fetoui, H.; Gdoura, R.; Chaabouni, K.; MakniAyadi, F. Evaluation of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant toxicity towards mice. *Int J Pept Res Ther* [Online] **2014**, 20, pp 333–340. <https://doi.org/10.1007/s10989-014-9400-5>

Sajid, M.; Khan, M. S. A.; Cameotra, S. S.; Al-Thubiani, A. S. Biosurfactants: Potential applications as immunomodulator drugs. *Immunology Letters* [Online] **2020**. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.04.003>.

Sato, S.; Andreeßen, B.; Steinbüchel, A. Strain and process development for poly (3HB-co-3HP) fermentation by engineered *Shimwellia blattae* from glycerol. *AMB Express* [Online] **2015**, 5, p 9. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0105-8>

Senthilkumar, P.; Dawn, S. S.; Samrot, A. V.; Kumar, N. Production, Optimization and Characterization of Poly [R] Hydroxyalkanoate from *Enterobacter* sp SU16. *Indian Journal of Science and Technology* [Online] **2016**, 9 (45). <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i45/87822>

Semeniuk, I.; Kochubei, V.; Skorokhoda, V.; Pokynbroda, T.; Midyana, H.; Karpenko, E.; Melnyk, V. Biosynthesis products of *Pseudomonas* sp. PS-17 strain metabolites. 1. Obtaining and thermal characteristics. *Chem. Chem. Technol.* [Online] **2020**, 14 (1), pp. 26–31. <https://doi.org/10.23939/chcht14.01.026>

Sha, R.; Jiang, L.; Meng, Q.; Zhang, G.; Song, Z. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. *J Basic Microbiol* [Online] **2011**, 52 (4), p 9. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100295>

Shah, A. A.; Hasan, F.; Hameed, A.; Ahmed, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* [Online] **2008**, 26, pp 246-265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>

Sharma, D.; Saharan, B. S.; Chauhan, N.; Bansal, A.; Procha, S. Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. *Sci World J.* [Online] **2014**, 2014: 493548, p 9. <https://doi.org/10.1155/2014/493548>

Shekhar, S.; Sundaramanickam, A.; Balasubramanian, T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. *Crit Rev Environ Sci Technol* [Online] **2015**, 45 (14), pp 1522-1554.

<https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955631>

Shin, K. H.; Ahn, Y., Kim, K. W. Toxic effect of biosurfactant addition on the biodegradation of phenanthrene. *Environ Toxicol Chem* [Online] **2005**, 24: pp 2768–2774. <https://doi.org/10.1897/05-071r1.1>

Shishatskaya, E. I.; Goreva, A.V.; Voinova, O. N.; Inzhevatin, E. V.; Khlebopros, R. G., Volova, T. G. Evaluation of antitumor activity of rubomycin deposited in absorbable polymeric microparticles. *Bull. Exp. Biol. Med* [Online] **2008**, 145 (3), pp 358-361. <https://doi.org/10.1007/s10517-008-0091-9>

Shraddha, A.; Pratap, S.; Pradeep, K.M. Application of EPS in agriculture: an important natural resource for crop improvement. *Agri Agri Res & Tech: Open Access J* [Online] **2017**, 8 (2): 555731. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.08.555731>.

Shubina, V.; Gaillet, L.; Chaussadent, T.; Meylheuc, T.; Creus, J. Biomolecules as a sustainable protection against corrosion of reinforced carbon steel in concrete. *Journal of Cleaner Production* [Online] **2016**, 112 (1), pp 666-671. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.07.124>

Sil, J.; Dandapat, P.; Das, S. Health care applications of different biosurfactants: review. *Int J Sci Res* [Online] **2017**, 6 (10), pp 41-50. <https://doi.org/10.21275/ART20177093>

Silva, I. A.; Veras, B. O.; Ribeiro, B. G.; Aguiar, J. S.; Campos Guerra J. M.; Luna, J. M.; Sarubbo, L. A. Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier. *PeerJ* [Online] **2020**, 8:e9064. <https://doi.org/10.7717/peerj.9064>

Singh, P.; Cameotra, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol* **2004**, 22 (3), pp 142-146. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.01.010>

Singh, A., Van Hamme, J. D., Ward, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Applications aspects. *Biotechnology Advances* [Online] **2007**, 25, pp 99-121. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.10.004>

Singh, R.; Glick, B. R.; Rathore, D. Biosurfactants as a biological tool to

increase micronutrient availability in soil: A review. *Pedosphere* [Online] **2018**, 28 (2), pp 170–189. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60018-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60018-9)

Smyth, T. J. P.; Perfumo, A.; Marchant, R.; Banat, I. M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*; Timmis K. N., eds; Springer: Berlin Heidelberg, 2010; pp 3705-3723. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-540-77587-4_291 (accessed May 1, 2020).

Sobrinho, H.; Luna, J.; Rufino, R.; Figueiredo Porto, A.; Sarubbo, L. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. *Electron J Biotechnol* [Online] **2013**, 16 (4), pp 1–12. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue4-fulltext-4>

Sotirova, A.; Spasova, D.; Vasileva-Tonkova, E. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res* [Online] **2009**, 164 (3), pp 297-303. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.005>.

Sotirova, A.; Avramova, T.; Lazarkevich, I.; Lubenets, V.; Karpenko, E.; Galabova, D. Antimicrobial potential of selected thiosulfonates – based biocides and biosurfactants against bacteria and fungi. *Reports BAS* **2010**; 6, pp 21–25.

Sotirova, A.; Avramova, T.; Stoitsova, S.; Lazarkevich, I.; Lubenets, V.; Karpenko, E.; Galabova, D. The importance of rhamnolipid-biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates. *Current Microbiology* [Online] **2012**, 65 (5), pp 534-541, <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0191-7>

Stancu, M. M. Response of *Rhodococcus erythropolis* strain IBB_{Po1} to toxic organic solvents. *Braz J Microbiol* [Online] **2015**, 46 (4), pp 1009-1018. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140462>

Szułczyńska, J. The influence of surface active compounds synthesized by microorganisms on the environment – an overview. *World Scientific News* [Online] **2017**, 70 (2), pp 550-557. <http://www.worldscientificnews.com/wp-content/uploads/2017/01/WSN-72-2017-550-557.pdf> (accessed May 1, 2020).

Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, structure and properties of

polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci* [Online] **2000**, 25, pp 1503-1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)

Sudesh, K.; Loo, C. Y.; Goh, L. K.; Iwata, T.; Maeda, M. The oil-absorbing property of polyhydroxyalkanoate films and its practical application: A refreshing new outlook for an old degrading material. *Macromol. Biosci* [Online] **2007**, 7 (11), pp 1199-1205. <https://doi.org/10.1002/mabi.200700086>

Tokumoto, Y.; Nomura, N.; Uchiyama, H.; Imura, T.; Morita, T.; Fukuoka, T.; Kitamoto, D. Structural characterization and surface-active properties of a succinoyl trehalose lipid produced by *Rhodococcus* sp. SD-74. *J Oleo Sci.* **2009**; 58 (2), pp 97-102. <https://doi.org/10.5650/jos.58.97>

Urai, M.; Anzai, H.; Ogihara, J.; Noriyuki, Iwabuchi, N.; Shigeaki Harayama, Sh.; Sunairia, M.; Nakajima, M. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2. *Carbohydrate Research* [Online] **2006**, 341 (6), pp 766–775. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.12.013>

Urai, M.; Yoshizaki, H.; Anzai, H.; Ogihara, J.; Iwabuchi, N.; Harayama, S.; Sunairia, M.; Nakajima, M. Structural analysis of an acidic, fatty acid ester-bonded extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. *Carbohydrate Research* [Online] **2007a**, 342 (7), pp 933–942. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.02.001>

Urai, M.; Yoshizaki, H.; Anzai, H.; Ogihara, J.; Iwabuchi, N.; Harayama, S.; Sunairia, M.; Nakajima, M. Structural analysis of mucoidan, an acidic extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. *Carbohydrate Research* [Online] **2007b**, 342 (7), pp 927-932. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.02.002>

Vasileva-Tonkova, E.; Gesheva, V. Glycolipids produced by *Nocardioides* sp. During growth on n-paraffin. *Process Biochemistry* [Online] **2005**, 40 (7), pp 2387-2391. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.09.018>

Verlinden, R. A. J.; Hill, D. J.; Kenward, M. A.; Williams, C. D.; Radecka, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol* [Online]. **2007**, 102 (6), pp 1437-1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

[2672.2007.03335.x](https://doi.org/10.3923/jm.2015.181.192)

Vijayakumar, S.; Saravanan, V. Biosurfactants-types, sources and applications. *Res J Microbiol* [Online] **2015**, *10* (5), pp 181–192. <https://doi.org/10.3923/jm.2015.181.192>

Volova, T. G.; Shishatskaya, E. I.; Sevastianov, V. I.; Efremov, S.; Mogilnaya, O. Results of biomedical investigations of PHB and PHB / PHV fibers. *Biochem. Eng. J.* [Online] **2003**, *16* (2), pp 125-133. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00038-X)

Volkland, H. P.; Harms, H.; Knopf, K.; Wannerand, O.; Zehnder, A. Corrosion Inhibition of Mild Steel by Bacteria. *Biofouling* [Online] **2000**, *15* (4), pp 287-297. <https://doi.org/10.1080/08927010009386319>

Wang, Y.; Nie, M.; Diwu, Z.; Lei, Y.; Li, H.; Bai, X. Characterization of trehalose lipids produced by a unique environmental isolate bacterium *Rhodococcus qingshengii* strain FF. *J Appl Microbiol* [Online] **2019**, *127* (5), pp 1442-1453. <https://doi.org/10.1111/jam.14390>

Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* [Online] **2008**, *3*, pp 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

Williams, A. G., Wimpenny, Y. W. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in bat culture. *Journal of Biological Chemistry* [Online] **1977**, *102* (1), pp 12 – 21. <https://doi.org/10.1099/00221287-102-1-13>

Williams, D. R.; Anderson, A. J.; Dawes, E. A.; Ewing, D. F. (). Production of copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from succinic acid by *Rhodococcus rubber*: biosynthetic considerations. *Microbiol. Biotech.* **1994**, *40*, pp 717-723. <https://www.semanticscholar.org/paper/Production-of-a-co-polyester-of-3-hydroxybutyric-by-Williams-Anderson/606d075f18b368a4a8a2469830eef37c88532daa> (accessed May 03, 2020).

Wu, T.; Xu, J.; Xie, W.; Yao, Z.; Yang, H.; Sun C.; Li, X. *Pseudomonas aeruginosa* L10: A Hydrocarbon-Degrading, Biosurfactant-Producing, and Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacterium Isolated From a Reed (*Phragmites*

australis). *Frontiers in Microbiology* [Online] **2018**, 9, p 1087.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01087>

Yogesh, C.; Pathak, B.; Fulekar, M. H. PHA-production application and its bioremediation in environment. *Res. J. Environ. Sci.* [Online] **2012**, 1 (2), pp 46-52.
<http://www.isca.in/IJENS/Archive/v1/i2/9.ISCA-JEvS-2012-009.pdf> (accessed May 2, 2020).

Yuewen, L.; Ran, L.; Zhifei, L.; Jing, C.; Xinli, L. Comparison of the pharmaceutical activities of sophorolipids and nano-hydroxyapatite sophorolipids on cervical cancer cells. *Chin J Appl Environ Biol* [Online] **2017**, 3, pp 386-490.
<http://www.cibj.com/en/oa/DArticle.aspx?type=view&id=BIOJAEB201607041>
 (accessed May 2, 2020).

Zhao, Z.; Wang, Q.; Wang, K.; Brian, K.; Liu, C.; Gu, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Biores Techno* 2010l, 101(1), 292.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.071>.

Zin', I.M.; Karpenko, O.V.; Kornii, S.A.; Midyana, H.H.; Tymus', M.B.; Khlopyk, O.P.; Karpenko, I.V.; Lysyak, V.M. Influence of a Rhamnolipid Biocomplex on the Corrosion of Duralumin in the Case of Mechanical Activation of its Surface. *Materials Science*. **2016**, 51 (5), pp 618–626.
<https://doi.org/10.1007/s11003-016-9883-7>

Абрамзон, А. А.; Зайченко, Л. П.; Файнгольд, С. И. *Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение*. Химия: Ленинград 1988; с 200. <https://www.twirpx.com/file/199759/> (accessed May 2, 2020).

Виноградова, Р. П.; Храпунов, С. Н. *Физико-химические методы в биохимии*. К.: Вища школа. 1983; с 287.

Герхардт, Ф.. *Методы общей бактериологии*. Т.1.; Москва: Мир. 1983. 535 с.

Гродзинский А. М.; Гродзинский, Д. М. *Краткий справочник по физиологии растений*. Наукова Думка: Київ, 1973; с 591.

Гудзь, С. П.; Гнатуш, С. О.; Яворська, Г. В.; Білінська, С. І.; Борсукевич, Б.

М. *Практикум з мікробіології : підручник*, серія «Біологічні студії»; ЛНУ імені Івана Франка: Львів, 2014, с 436.

Донец, А. Т.; Кошелев, В. В.; Бехтерева, М. Н. Качественное и количественное содержание липидов у бактерий. *Микробиология* **1970**, 24, с 300-304.

Доспехов, Б. А. *Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований)*, 5-е изд.; Агропромиздат: Москва, 1985; с 351. https://mf.bmstu.ru/info/faculty/lt/caf/lt1/soil_books/uchebnik9.pdf (дата обращения Май. 11, 2020).

ДСТУ 4138-2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. Чинний від 2004-01-01. Держспоживстандарт України: Київ, 2003, с 173. <https://www.twirpx.com/file/2576304/>. (дата звернення Трав. 11, 2020).

ДСТУ ISO 520:2015. Зернові і бобові. Визначення маси 1 000 зерен. Чинний від 2016-01-01. Держспоживстандарт України: Київ, 2016, . http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=86231 (дата звернення Трав. 11, 2020).

Зелена хвиля. Мити ПАРом чи водою? <https://ecoclubua.com/2011/08/myty-parom-chy-vodoyu> (дата звернення Трав. 6, 2020)

Єрохін, В. А. Біотехнологія поверхнево-активних рамноліпідів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері. Дисертація канд. техн. наук. НТУ України “КПІ ім. Ігоря Сікорського”, Львів, 2015, с 170.

Карпенко, О. В.; Єрохін, В. А.; Пристай, М. В.; Шульга, О. М. Застосування вихрового ферментера для одержання продуктів мікробного синтезу. *Вопросы химии и химической технологии* **2012**, 2, с 34-39.

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

Лакин Г. Ф. *Биометрия*. – М.: Высшая школа-1990. – 350 с.

Льонг, Т. М.; Нечаева, И. А.; Петриков, К. В.; Филонов, А. Е.; Понаморева,

О. Н. Структура и физико-химические свойства гликолипидных биосурфактантов, продуцируемых бактериями-нефтедеструкторами *Rhodococcus* sp. X5. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология* [Online] **2017**, 7 (2), с 72–79. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-2-72-79>.

Львівенергозбут. Тарифи. https://lez.com.ua/taryfy_jur

Макитра, Р.Г.; Пириг, Я.Н.; Кивелюк, Р.Б. Важнейшие характеристики растворителей, применяемые в уравнениях ЛСС. *Деп.ВИНИТИ* **1986**, 628-В86, с.33.

Сеги, Й. *Методы почвенной микробиологии*. Колос: Москва, 1983; с 296.

Слободян, З.; Хабурський, Я.; Горак, Ю. Экстракти дубової кори – “зелені” інгібітори корозії середньовуглецевих сталей у нейтральних та кислих середовищах. *Вісник ТНТУ* **2012**, 68, с 23-29.

Трибель, С.О.; Сігарьова, Д.Д.; Секун, М.П.; Иващенко, О.О. та ін.. *Методики випробування і застосування пестицидів*. Трибель, С.О., ред; Світ:Київ, 2001; с 448. <https://www.twirpx.com/file/1051715/> (дата звернення Трав. 11, 2020).

Осипенко М.А., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Ившина И.Б., Няшин Ю.И., Любивая О.В. Математическая модель морфогенетического цикла бактерий рода *Rhodococcus*. *Российский журнал биомеханики*. 2010. Т. 14, № 4 (50): 26–34. <https://cyberleninka.ru/article/n/matematicheskaya-model-morfogeneticheskogo-tsikla-bakteriy-roda-rhodococcus> (дата звернення Трав. 6, 2020).

Пирог, Т. П.; Шевчук, Т. А.; Клименко, Ю. О. Особливості синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. *Мікробіологічний журнал* [Online] **2010**, 72 (2), с 10-15. http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol_2010_72_2_3. (accessed May 2, 2020).

Пирог, Т. П.; Игнатенко, С. В. Масштабирование процесса биосинтеза поверхностноактивных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане. *Прикладная биохимия и микробиология* **2011**, 47 (4), с 436–442.

Пирог, Т. П.; Конон, А. Д. Мікробні поверхнево-активні речовини. І.

Гліколіпіди. *Biotechnologia acta* **2014a**, 7 (1), с 9-30.
<https://doi.org/10.15407/biotech7.01.009>

Пирог, Т. П.; Софілканич, А. П.; Конон, А. Д.; Гриценко, Н. А. Біосинтез поверхнево-активних речовин на промислових відходах. *Biotechnologia acta* [Online] **2014b**, 7 (5), с 9-26, <https://doi.org/10.15407/biotech7.05.009>

Пирог, Т. П.; Леонова, Н. О.; Шевчук, Т. А.; Савенко, И. В.; Иутинская, Г. А. Синтез фитогормонов бактериями *Acinetobacter Calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia Vaccinii* IMB B-7405 – продуцентами поверхностно-активных веществ. *Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Серыя Біялагічных Навук*. [Online] **2016**. 1 <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/24783> (дата звернення Трав. 3, 2020).

Т. П. Пирог, М. А. Шулякова, Л. В. Никитюк, С. И. Антонюк, И. В. Эль Биоконверсия промышленных отходов в поверхностно-активные вещества штаммами *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 И *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Biotechnologia Acta* [Online] **2017**, 10 (2), с 22-33. <https://doi.org/10.15407/biotech10.02.022>

Покинсьброда, Т.Я. Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, їх властивості та застосування. Дисертація канд. техн. наук, НТУ України “КПІ ім. Ігоря Сікорського”, Київ, 2018; с 207.

Посилкіна, О. В.; Доровський, О. В.; Братішко, Ю. С.; Деренська, Я. М.; Сагайдак-Нікітюк, Р. В.; Світлична, К. С.; Кубасова, Г. В. Економіка, планування та організація хіміко-фармацевтичного виробництва: підруч. для студ. ВНЗ фармац. і мед. профілю. НФаУ:Харків, 2016; с 528. <http://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/11164> (дата звернення Трав. 11, 2020).

Пристай, М. В. Біотехнологія поверхнево-активних речовин бактерій родів *Gordonia* і *Rhodococcus*. Дисертація канд. техн. наук, НТУ України “КПІ ім. Ігоря Сікорського”, Львів, 2012; с 150.

Сидоров, Ю. І.; Влязло, Р. Й.; Новіков, В. П. *Процеси і апарати*

мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування: Навчальний посібник. Інтелект-Захід: Львів, 2008, с 736.

Тістечок, С.І.; Мицик, Ю.Я.; Федоренко, В.О.; Громико, О.М. Біосинтетичний потенціал актиноміцетів ризосфери *Helianthemum Stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. *Innovative biosystems & bioengineering* [Online] **2019**, 3 (2), с 105-113. <https://doi.org/10.20535/ibb.2019.3.2.170129>

Шлык, А. А. *Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. Биохимические методы в физиологии растений.* Наука: Москва, 1971; с 154–170.

Щеглова, Н. С.; Карпенко, О. В.; Вільданова, Р. І.; Шульга, О. М.; Баранов, В. І. Вплив мікробних поверхнево-активних речовин на ріст бобових рослин. *Biotechnologia Acta* [Online] **2015**, 8 (1), с 76-81. http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2015_8_1_11 (дата звернення Трав. 11, 2020).

Додатки

ДОДАТОК А
АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ

ЗАТВЕРДЖУЮ
Заст. директора Фізико-механічного
Інституту ім. Г.В.Карпенка НАН України
В.Р. СКАЛЬСЬКИЙ
« 5 » 2018 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор ТзОВ «КАЛЬВІ»
О.А. МАКАР
« 5 » 2018 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Відділення фізико-хімії горючих копалин
Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії
ім. Л.М.Литвиненка НАН України
Г.Г. МІДЯНА
« 5 » 2018 р.

АКТ

апробації екологічно чистого біогенного інгібітора для підвищення протикорозійних властивостей мастильно-охолоджувальних рідин

м. Львів

« 5 » 2018 р.

Даний акт складений представниками Фізико-механічного інституту ім. Г.В.Карпенка НАН України: завідувачем відділу № 11 І.М.Зінем, ст.н.с. З.В.Слободян, н.с. Л.А. Маглатюк, пров. інженером Р.Б. Купович, представником Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л.М.Литвиненка НАН України: пров. інженером Н.І. Корецькою та представником ТзОВ «КАЛЬВІ»: пров. інженером Н.Я. Іванович про те, що в квітні-вересні 2018 р. на підприємстві був випробуваний новий екологічно-чистий інгібітор біогенного походження, отриманий шляхом мікробного синтезу, для мастильно-охолоджувальних рідин (МОР).

Суть дослідно-промислової перевірки полягала у введенні даного інгібітора за концентрації 1 г/л в мастильно-охолоджувальну рідину, яка не містила товарного інгібітора, в результаті чого спостерігали наступне. Інгібітор добре змішується з 5% водним розчином МОР і захищає середньовуглецеві сталі від корозії на 85...92%, що є на рівні ефективності товарного інгібітора (суміш заміщених амінів). Перевагою даного інгібітора є протикорозійний захист міді, відсутній у товарного інгібітора, який утворює розчинні комплекси з іонами міді, та відсутність шкідливого впливу на довілля і обслуговуючий персонал.

Даний акт не є основою для взаємних фінансових розрахунків і отримання авторських винагород.

Від ФМІ НАН України:

Зав.від. № 11 Зінь І.М. Зінь
Ст.н.с. Слободян - З.В.Слободян
Н.с. Маглатюк - Л.А.Маглатюк
Пров. інж. Купович - Р.Б.Купович

Від ТзОВ «КАЛЬВІ»:

Пров. інж. Іванович Н.Я. Іванович

Від Відділення ФХГК ІНФОВ

Пров.інж. Коречька - Н.І.Коречька

АКТ

використання результатів дисертаційної роботи

«Біотехнологія поверхнево-активних продуктів штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1, їх властивості та застосування»

Корецької Наталії Ігорівни

Джерело впровадження: Матеріали дисертаційної роботи та наукові публікації молодшого наукового співробітника Відділення хімії і біотехнології горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М.Литвиненка НАН України Корецької Наталії Ігорівни на тему **«Біотехнологія поверхнево-активних продуктів штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1, їх властивості та застосування»**, поданої на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю **«Біотехнологія»**.

Де впроваджується: у науковій роботі та навчальному процесі студентів біологічного факультету Львівського національного університету ім. Івана Франка у курсах лекцій «Фізіологія та біохімія рослин», а також у спецкурсі «Механізми адаптацій рослин», для студентів кафедри фізіології та екології рослин.

Декан
біологічного факультету
Львівського національного університету
ім. І. Франка, к.б.н., доцент



І.С. Хамар

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з науково-педагогічної роботи
 Національного університету
 «Львівська політехніка»
 проф.  Давидчук О.
 « 20 »  2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

«Біотехнологія поверхнево-активних продуктів штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1, властивості та застосування».

2. 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 3а, здобувач наукового ступеня к.т.н. Корецька Н.І.

3. Джерела інформації:

1. Koretska N.I., Prystay M.V., Karpenko E.V. Rape phosphatide concentrate in the technologies of surfactants production by the *Actinobacteria*. Ukrainian food journal, V.3, Issue 3, 2014, P. 429-436.

2. Корецька Н.І., Мідяна Г.Г., Карпенко О.В. Оптимізація екстракції трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1. *Innovative biosystems and bioengineering*. 2018. Т. 2, №. 4, С. 246–251. <https://doi.org/10.20535/ibb.2018.2.4.148935>.

3. I. M. Zin, O. V. Karpenko, T. Ya. Pokyn'broda, N.I. Korets'ka, M. B. Tymus', L. Kwiatkowski, and S. A. Kornii. Inhibition of the corrosion of carbon steels by trehalose lipid surfactants. *Materials Science*, Vol. 54, No. 4, January, 2019 (Ukrainian Original Vol. 54, No. 4, July–August, 2018). DOI 10.1007/s11003-019-00207-0.

1. **Впроваджено:** у науково-дослідну роботу і навчальний процес кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

2. **Термін впровадження:** листопад 2019р.

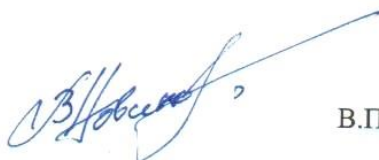
3. **Ефективність впровадження:** апробація та використання роботи свідчать, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелі інформації. Розроблену біотехнологію синтезу поверхнево-активних продуктів штамом *R. erythropolis* Au-1 апробовано у пілотному реакторі об'ємом 5 дм³. Продуктом є супернатант культуральної рідини, що має наступні показники: поверхневий натяг – 37,0 мН/м, вміст позаклітинних трегалозоліпідних ПАР – 1,5 г/дм³, клітинно-зв'язаних трегалозоліпідних ПАР – 4,8 г/дм³.

Результати дисертаційної роботи використовуються в науковій роботі магістрів та навчальному процесі кафедри, зокрема у викладанні спецкурсів «Основи біотехнологічного виробництва» та «Загальна біотехнологія».

4. **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

к. е. н. Стасів О.Ф.

2020 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

*результатів дисертаційної роботи Корецької Наталії Ігорівни
“Біотехнологія поверхнево-активних продуктів штаму
Rhodococcus erythropolis Au-1, властивості та застосування”*

Результати досліджень з синтезу біогенних поверхнево-активних речовин, що представлені у дисертаційній роботі *Корецької Наталії Ігорівни*, використані у виробничих дослідах на полях Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України, підтверджено ефективність застосування біогенних трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин при вирощуванні сої та озимої пшениці. Показано, що у польових умовах стимулювальна дія біоПАР мала чітко виражений характер. Результати дисертації спрямовані на подальше впровадження перспективних трегалозоліпідних ПАР у сільськогосподарську практику при створенні ефективних екологічно безпечних препаратів для вирощування зернових та бобових культур.

Провідний науковий співробітник
лабораторії захисту рослин,
к. б. н.

К. І. Яцук