

## БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН АКТИНОБАКТЕРІЯМИ РОДУ *RHODOCOCCLUS*

Т.П. Пирог<sup>1,2</sup>, Б.С. Гейченко<sup>1</sup>, Т.А. Шевчук<sup>2</sup>, Ф.В. Мучник<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій,  
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03143, Україна  
e-mail: [tapirog@nuft.edu.ua](mailto:tapirog@nuft.edu.ua)

Ринковий інтерес до представників роду *Rhodococcus* зумовлений унікальними особливостями їх метаболізму, зокрема здатністю до деструкції багатьох ксенобіотиків, що часто відбувається за участі синтезованих цими актинобактеріями поверхнево-активних речовин (ПАР) гліколіпідної природи.

В огляді наведені сучасні дані літератури і результати власних експериментальних досліджень щодо утворення поверхнево-активних речовин родококами на традиційних вуглеводневих (н-алкани, нафта, гас, дизельне паливо), інших гідрофобних (рафіновані олії) та гідрофільних (гліцерин, етанол, вуглеводи) моно- і змішаних субстратах, а також промислових відходах (олійні фузи, відпрацьована олія, відходи виробництва біодизелю). Найбільша кількість публікацій стосується синтезу ПАР за умов росту цих актинобактерій на вуглеводнях, у той час як відомості про використання олієвмісних та гідрофільних субстратів, а також промислових відходів для утворення поверхнево-активних речовин нечисельні. Оптимізація умов культивування продуцентів, у тому числі й за допомогою математичних методів, використання мутантних та генно-інженерних штамів дали змогу підвищити синтезувальну здатність представників роду *Rhodococcus* на різних субстратах до рівня високоактивних продуцентів інших поверхнево-активних гліколіпідів (рамно- та софороліпідів).

**Ключові слова:** родококи, інтенсифікація синтезу поверхнево-активних речовин, гідрофільні та гідрофобні субстрати, промислові відходи.

Універсальні катаболічні шляхи актинобактерій роду *Rhodococcus*, широка субстратна специфічність метаболічних систем, здатність до споживання та перетворення гідрофобних сполук, стійкість до несприятливих умов зумовили великий інтерес до цих бактерій як деструкторів ксенобіотиків. Разом з тим, з 70–80-х років ХХ ст., коли була встановлена здатність представників роду *Rhodococcus* до біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР), розпочато широкомасштабні дослідження, що стосуються пошуку продуцентів цих сполук серед родококів, а також шляхів підвищення синтезу ПАР, вивчення їх фізико-хімічних властивостей та перспектив практичного застосування. У 2012 році ми опублікували огляд літератури [1], в якому було підсумовано наявну на той час інформацію про біотехнологічний потенціал

бактерій роду *Rhodococcus*, у тому числі й про синтез поверхнево-активних речовин.

**Мета** даного огляду – аналіз і узагальнення сучасних даних літератури, а також власних експериментальних досліджень про біосинтез ПАР представниками роду *Rhodococcus*, що з'явилися після публікації роботи [1] або не згадуються в ній.

### Біосинтез поверхнево-активних речовин на гідрофобних субстратах

Першими субстратами, за умов росту на яких виявили синтез ПАР у бактерій роду *Rhodococcus*, були водонерозчинні вуглеводні. Так, у 1979 році було опубліковано роботу [2], в якій дослідники як ростовий субстрат використовували н-алкани C<sub>12</sub>–C<sub>18</sub>. У 80-х роках ХХ ст. з'явилися роботи [3, 4], в яких описано біосин-

тез поверхнево-активних сукцинілтрегалозоліпідів *Rhodococcus* sp. SD-74 на гексадекани. На початку 90-х років ХХ ст. Singer і Finnerty [5] повідомили про використання олій для утворення ПАР бактеріями роду *Rhodococcus*. Зазначимо, що до теперішнього часу вважається, що саме вуглеводні є традиційними субстратами для родококів, а роль синтезованих ПАР полягає у солюбілізації цих водонерозчинних субстратів, що, в свою чергу, полегшує транспорт їх у клітину.

**Традиційні вуглеводневі субстрати.** Упродовж 2013–2018 рр. у літературі з'явилася інформація про синтез ПАР актинобактеріями роду *Rhodococcus* на гексадекани та нафті [6–21], дизельному паливі [22–24] та гасі [25]. Більшість з цих робіт [11–14, 16–18] присвячена визначенню оптимальних для біосинтезу ПАР умов культивування продуцента, проте у деяких роботах автори лише констатували синтез ПАР (часто за показником поверхневого натягу) або розглядали утворення ПАР як додаткову властивість мікроорганізмів-деструкторів ксенобіотиків [6–10, 22].

Наприклад, автори роботи [6] роблять висновок про здатність *Rhodococcus* sp. JZX-01 синтезувати ПАР на суміші дизельного палива та сирої нафти, оскільки за таких умов культивування спостерігали зниження поверхневого натягу до 31,3 мН/м.

У роботі [7] встановлено, що ступінь деструкції сирої нафти (2 %) у процесі вирощування *Rhodococcus* sp. NJ2 на цьому субстраті досягав 49,5 % через 30 діб, що зумовлено синтезом поверхнево-активних речовин. Щоправда, концентрація ПАР була невисокою і становила всього близько 100 мг/л.

Petrikov із співавторами [8] показали, що за умов росту на вуглеводневих субстратах (гексадекан, сира нафта, дизельне паливо) *Rhodococcus* sp. S67 утворював поверхнево-активні тетраестери трегалози у невисокій концентрації (310 мг/л). Автори не розглядали *Rhodococcus* sp. S67 як перспективний продуцент ПАР, оскільки передусім він є ефективним деструктором ксенобіотиків, який входить до складу біопрепарату “MicroBak” для очищення довкілля від нафти [9], а здатність до синтезу ПАР підвищує ступінь деструкції вуглеводневих забруднень. Зазначимо, що у 2018 році було опубліковано роботу [11], в якій повідомлялося про те, що *Rhodococcus* sp. S67 є першим представником роду *Rhodococcus*, який синтезує

ПАР при температурі 10 °С на гексадекани (2%), що перебуває у твердому агрегатному стані. Незважаючи на те, що кількість утворених ПАР за таких умов є низькою (0,15 г/л), отримані результати свідчать про можливість використання штаму S67 для ліквідації нафтових забруднень у регіонах з холодним кліматом.

У процесі культивування штаму *R. soli* 102-Na5, виділеного з забрудненого нафтою узбережжя Тхен (Корея), на сирій нафті (1%, об'ємна частка) ступінь деструкції нафти становив 85% через 14 діб [10]. Синтез поверхнево-активних речовин дослідники оцінювали за показником поверхневого натягу (36,7 мН/м), індексом емульгування та методу розтікання нафти (oil spreading test). Концентрація NaCl у середовищі вирощування штаму 102-Na5 становила 30 г/л, що було зумовлено наближенням лабораторних умов до реальних, оскільки проблема очищення морських вод від розлитої нафти наразі залишається актуальною.

У роботі [22] встановлено, що за умов росту вільних та іммобілізованих в Na-альгінаті клітин штаму *Rhodococcus* sp. МК1 у середовищі з дизельним паливом (1 %) ступінь його деструкції через 7 діб становив 70 та 45% відповідно. Автори зазначають, що нижча ефективність розкладання субстрату іммобілізованими клітинами зумовлена тим, що продуцент синтезує клітинно-зв'язані ПАР, а іммобілізація ускладнює їх вплив на емульгування і доступність дизельного палива для клітин. Проте дослідники не визначали концентрацію синтезованих ПАР, а тільки встановлювали їх якісний склад (жирні та міколові кислоти).

**Вплив умов культивування на біосинтез ПАР.** У роботах [12–14, 16, 23, 25], з метою підвищення концентрації цільового продукту, досліджували залежність синтезу ПАР представниками роду *Rhodococcus* на вуглеводнях від умов культивування.

Так, Ramanathan [12] встановив, що заміна нітрату амонію у середовищі культивування *R. oracus* DSM 43250 та *R. ruber* DSM 7511 з гексадеканом (1 %) на нітрат натрію супроводжувалася збільшенням концентрації синтезованих ПАР з 0,5 до 2,5–4,0 г/л. Зазначимо, що автор цієї роботи не акцентував увагу на механізмах, що лежать в основі інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин. Можна припустити, що катіони натрію є активаторами ферментів катаболізму гексадекану у штамів DSM 43250 і DSM 7511, як було встановлено

нами для *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 [26] або ферментів біосинтезу ПАР.

У той же час Kazemі зі співавторами [13] показали, що оптимальним джерелом азоту для біосинтезу ПАР *R. erythropolis* Р6-4Р є дріжджовий екстракт. У разі заміни сульфату амонію у базовому середовищі з гексадеканом на дріжджовий екстракт кількість ПАР підвищувалася у три рази (до 4,5 г/л). У роботі [14] встановлено, що у процесі вирощування *Rhodococcus* sp. PML026 в колбах на качалках у середовищі з гексадеканом (2%) концентрація ПАР була невисокою і становила всього 286 мг/л. Цілком ймовірно, що однією з причин цього є використання глюкози для одержання інокуляту. Як правило, в біотехнологічних процесах з метою скорочення тривалості лаг-фази використовують одне і те ж джерело вуглецю для отримання інокуляту та біосинтезу цільового продукту. На наступному етапі автори здійснювали культивування *Rhodococcus* sp. PML026 в ферментаторі і вивчали вплив концентрації розчиненого кисню  $pO_2$  на синтез ПАР. В результаті масштабування процесу концентрацію поверхнево-активних речовин підвищили до 2,7 г/л. Такого результату вдалося досягти підтриманням концентрації розчиненого кисню на рівні  $pO_2 \geq 30\%$  за рахунок збільшення подачі повітря до 2 л/хв. При цьому швидкість перемішування перебувала в межах 330–350 об/хв [14].

У роботі [15] встановлено, що штам *R. erythropolis* Au-1 з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за умов росту в середовищі з тетрадеканом і гексадеканом утворював 2,73 і 2,8 г/л клітинно-зв'язаних ПАР. Концентрація вуглеводнів у середовищі становила 20 г/л.

Шульга зі співавторами [16] показали, що внесення у середовище культивування *R. erythropolis* Au-1 з гексадеканом (2,5 %) алюмокалієвих галунів (2 г/л) дало змогу підвищити концентрацію синтезованих ПАР на 68 % (до 5,9 г/л). Автори пояснюють це тим, що дубильні речовини, зокрема – алюмокалієві галуни, впливають на агрегацію клітин родококів в результаті збільшення гідрофобності клітинної стінки. Підвищення синтезу асоційованих з клітинами трегалозоліпідів супроводжується зниженням гідрофобності і, як наслідок – зменшенням ступеня конгломерації клітин. Крім того, у роботі [16] зазначається, що флокуляція клітин продуцента під впливом алюмокалієвих

галунів значно полегшує їх відділення від культуральної рідини і дає змогу вилучити стадію центрифугування під час виділення поверхнево-активних речовин.

У роботі Xia зі співавторами [17] встановлено, що *R. erythropolis* Z25, ізольований з пластової води нафтородовища в Китаї, за умов росту на сирій нафті (20 г/л) синтезував 1,56 г/л ПАР. Пізніше [18] ці ж автори повідомили про виділення з пластових вод штаму *R. ruber* Z25, який під час культивування у середовищі з сирою нафтою (5 %) утворював 12,95 г/л ПАР. Крім того, *R. ruber* Z25 характеризувався здатністю до синтезу ПАР у процесі вирощування в анаеробних умовах, щоправда їх концентрація була на порядки нижчою (0,53 г/л), ніж в аеробних. Цікаво, що ріст цього штаму в анаеробних умовах спостерігався лише за наявності у середовищі нітратів. Автори роботи [18] припускають, що нітрат може бути термінальним акцептором електронів, а отже, його відновлення відіграє ключову роль у деструкції вуглеводнів за відсутності кисню.

Vuong Thi Nga зі співавторами [23] з використанням математичних методів оптимізували склад поживного середовища з дизельним паливом для культивування продуцента ПАР *R. ruber* TD2, виділеного із забрудненої нафтою прибережної зони. На оптимізованому середовищі, що містило 5,7 % дизельного палива і 3,3 г/л  $NaNO_3$ , при рН 8,3, упродовж 5 діб штам TD2 синтезував 30,1 г/л ПАР, що більш, ніж у 2 рази вище порівняно з показником до оптимізації.

У роботі Gogotov і Khodakov [25] встановлено, що максимальна концентрація ПАР (1,95 г/л), синтезованих виділеним зі шламу нафтосховища штамом *R. erythropolis* sH-5, досягалася за таких умов: концентрація гасу – 2 %, джерело азоту – нітрат натрію (0,85 г/л), рН 6,8–7,0. За умов росту штаму на вихідному середовищі, що містило 1 % гасу і сульфат амонію як джерело азотного живлення, кількість ПАР становила всього 0,82 г/л.

У табл. 1 підсумовано дані щодо біосинтезу ПАР бактеріями роду *Rhodococcus* на традиційних гідрофобних субстратах.

Отже, тільки встановлення оптимальних умов культивування (концентрація субстрату, природа та концентрація джерела азоту, рівень аерації та ін.) дає змогу підвищити рівень синтезу ПАР у кілька разів. Зазначимо, що концентрація ПАР, синтезованих деякими представниками роду *Rhodococcus* на вуглеводнях навіть

без оптимізації умов культивування і вдосконалення штамів є достатньо високою (13–20 г/л, див. табл. 1) і порівняною з показниками синте-

зу рамно- і софороліпідів, щоправда, на вуглеводневих субстратах [27, 28].

**Таблиця 1**

**Біосинтез ПАР бактеріями роду *Rhodococcus* на вуглеводневих субстратах**

Продуцент	Джерело вуглецю, концентрація	Кількість ПАР, г/л		Література
		до оптимізації	після оптимізації	
<i>R. opacus</i> DSM 43250	Гексадекан, 1%	0,5	4,0	[12]
<i>R. ruber</i> DSM 7511	Гексадекан, 1%	0,5	2,5	[12]
<i>Rhodococcus</i> sp. PML026	Гексадекан, 2%	0,286	2,7	[14]
<i>R. erythropolis</i> Au-1	Гексадекан, 2,5%	3,5	5,9	[16]
<i>R. erythropolis</i> P6-4P	Гексадекан, 5 г/л	1,5	4,5	[13]
<i>R. erythropolis</i> Z25	Сира нафта, 20 г/л	1,56	–	[17]
<i>R. ruber</i> Z25	Сира нафта, 5%	12,95	–	[18]
<i>R. ruber</i> TD2	Дизельне паливо, 5,7 %	13,5	30,1	[23]
<i>R. erythropolis</i> sH-5	Гас, 2%	0,82	1,95	[25]

Примітка: «–» – оптимізацію не здійснювали.

**Вдосконалення штамів-продуцентів ПАР.**

Для підвищення синтезу ПАР дослідники одержували мутантні [19, 20] та генно-інженерні штами [21]. У роботах [19, 20] здатність до синтезу поверхнево-активних речовин оцінювали за показником умовної концентрації ПАР (CMD, critical micelle dilution, безрозмірні одиниці). Встановлено, що після УФ опромінення умовна концентрація ПАР, синтезованих *R. erythropolis* sp. SB-1A на гексадекані (3 %), підвищилась у 4 [20], а штамом *R. erythropolis* sp. P6-4P – у 14,5 разів [19].

Inaba зі співавторами [21] створили генно-інженерний штам – надпродуцент сукцинілтрегалозоліпідів з вихідного *Rhodococcus* sp. SD-74. На першому етапі були ідентифіковані гени, відповідальні за метаболізм алканів (*alkB* – кодує синтез алканмонооксигенази) та утворення сукцинілтрегалозоліпідів (*fda* – відповідальний за синтез фруктозо-біфосфат альдолази, яка каталізує перетворення тріоз на гексози та навпаки, та *tlsA* – кодує синтез ацетил-КоА трансферази, яка функціонує на останніх етапах синтезу сукцинілтрегалозоліпідів). Автори встановили, що за умов росту *Rhodococcus* sp. SD-74 на гексадекані (10 %) рівень експресії *alkB* збільшувався у 100, а *tlsA* – у 10 разів. Далі промоторну ділянку *alkB* клонували і вбудовували у плазмиду pSMT3, після чого плазмиду pSMT3-P<sub>alkB</sub> використовували для надекспресії генів *tlsA* і *fda*. На останньому етапі штам SD-74 трансформували плазмідами pSMT3-P<sub>alkB</sub>::*tlsA* і pSMT3-P<sub>alkB</sub>::*fda* та оцінювали синтез ПАР. Встановлено, що кон-

центрація ПАР, синтезованих трансформантом pSMT3-P<sub>alkB</sub>::*tlsA*, була удвічі вищою (до 40 г/л) порівняно з показниками, встановленими для вихідного штаму.

**Олієвмісні субстрати.** Незважаючи на велику кількість публікацій про мікробний синтез ПАР на рафінованих і відпрацьованих оліях [29–31], інформація про родококів, які ростуть на таких субстратах, є нечисельною. Перші такі повідомлення датуються 2008–2009 рр., коли було встановлено здатність *R. erythropolis* 16LM.USTNB до утворення поверхнево-активних речовин на середовищі з 3% пересмаженої соняшникової олії [32], а *Rhodococcus* sp. BS32 – з 20 г/л ріпакової олії [33]. Проте в цих роботах не наводяться дані кількісного визначення ПАР (в г/л), у зв'язку з чим порівняння результатів з даними інших публікацій не виявляється можливим.

Наступні публікації щодо утворення ПАР представниками роду *Rhodococcus* на олієвмісних субстратах з'явилися лише через кілька років – у 2013–2016 рр. [15, 24, 34–37]. У більшості цих робіт як субстрати для вирощування продуцентів поверхнево-активних речовин дослідники використовували рафіновані олії. Так, у процесі культивування штаму *R. equi* P20 на соєвій олії (2,5%) концентрація синтезованих ПАР (фосфоліпопептиди) становила 7,3 г/л [34]. *R. ruber* TD2, який синтезує ПАР на дизельному паливі [23], утворює 13,7 г/л поверхнево-активних речовин на оливковій олії [24]. У роботі [35] встановлена здатність до синтезу ПАР на

кукурудзяній олії (20 %) штаму *R. rhodochrous* FNCC 0066, проте концентрацію поверхнево-активних речовин (в г/л) не визначали, а синтез ПАР оцінювали за зниженням поверхневого натягу (до 49 мН/м) і показником індексу емульгування ( $E_{24}$  38%) вільної від клітин культуральної рідини.

White зі співавторами [36] показали, що *Rhodococcus* sp. PML026 за умов росту на соняшниковій олії синтезує як клітинно-зв'язані, так і позаклітинні ПАР. Встановлено, що на ранніх стадіях росту штаму PML026 утворює переважно асоційовані з клітинами поверхнево-активні речовини, а в стаціонарній – збільшується вміст позаклітинних ПАР. Проте синтезувальна здатність *Rhodococcus* sp. PML026 виявилася невисокою: кількість трегалозоліпідних ПАР, визначена за концентрацією трегалози, не перевищувала 0,3–0,4 г/л.

У 2014 році Корецька зі співавторами [15] повідомили про здатність *R. erythropolis* Au-1 до синтезу клітинно-зв'язаних ПАР на широкому наборі олієвмісних субстратів (20 г/л). Так, за умов росту штаму Au-1 на рафінованій соняшниковій і оливковій олії концентрація таких ПАР становила 1,73 і 2,9 г/л відповідно, на вазеліновій оливі – 3,48, а на фузі олійному – 2,62 г/л. У роботі [37] ці ж автори встановили, що *R. erythropolis* Au-1 у процесі вирощування на середовищі з фузом ріпакової олії (20 г/л) утворює, крім асоційованих з клітинами, і позаклітинні ПАР, концентрація яких досягала 2,95 г/л.

Наші дослідження [38, 39] показали, що штаму *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 синтезує 1,7 г/л позаклітинних ПАР на пересмаженій соняшниковій олії (2%). Оскільки основним компонентом комплексу гліколіпідних ПАР, синтезованих штамом ІМВ Ас-5017, є трегало-

зоміколати, припустили, що внесення в середовище з олією глюкози буде супроводжуватися підвищенням рівня ПАР за рахунок наявності в середовищі культивування майже готових блоків для утворення гліколіпідів. Дійсно, за внесення 0,1% глюкози на початку процесу культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на олієвмісному середовищі кількість синтезованих ПАР підвищувалася в 4 рази у порівнянні з вирощуванням бактерій на середовищі без глюкози [38, 39]. Подальші дослідження показали, що концентрація ПАР залежала як від типу відпрацьованої олії (олія після смаження картоплі, м'яса, змішана олія після смаження цибулі, сиру, котлет, картоплі), так і від її вмісту у середовищі культивування штаму ІМВ Ас-5017. Максимальна кількість ПАР (5,1–5,3 г/л) досягалася у разі використання як субстрату змішаної відпрацьованої олії (5–7%) і підвищення вмісту нітрату натрію (джерело азоту) у середовищі до 2,0–2,6 г/л.

Узагальнені дані щодо використання різних олій для синтезу ПАР родококами наведено у табл. 2.

Ці дані свідчать про те, що концентрація ПАР, синтезованих представниками роду *Rhodococcus* на олієвмісних субстратах (рафіновані та пересмажені олії, фузи), є порівняною з такою на вуглеводнях (див. табл. 1), проте нижчою, ніж кількість рамно- та софороліпідів, які утворюються на аналогічних субстратах [28].

#### Утворення поверхнево-активних речовин на гідрофільних субстратах

Наші дослідження, результати яких опубліковано у 2004 році [40], були одними з перших, в яких встановлено здатність бактерій роду *Rhodococcus* синтезувати позаклітинні ПАР на етанолі. Кілька років потому – у 2008 році з'явилася інформація [25] про виділення штаму

**Таблиця 2**

#### Утворення ПАР за умов росту представників роду *Rhodococcus* на олієвмісних субстратах

Продуцент	Олія, концентрація	Кількість ПАР, г/л	Література
<i>R. equi</i> P20	Сосва, 2,4 %	7,3	[34]
<i>R. ruber</i> TD2	Оливкова**	13,7	[24]
<i>Rhodococcus</i> sp. PML026	Соняшникова, 2%	0,4	[36]
<i>R. erythropolis</i> Au-1	Соняшникова, 20 г/л	1,73*	[15]
	Оливкова, 20 г/л	2,9*	[15]
	Фуз ріпакової олії, 20 г/л	2,95	[37]
<i>R. erythropolis</i> ІМВ Ас-5017	Пересмажена соняшникова олія, 2% + глюкоза, 0,1%	6,8	[38, 39]
	Пересмажена соняшникова олія, 5%	5,1	дана робота

Примітка: \* – клітинно-зв'язані ПАР; \*\* – концентрацію не наведено.

*R. erythropolis* sH-5, який утворював ПАР у процесі культивування на гідрофільних субстратах, у тому числі й на етанолі. Так, за умов росту штаму sH-5 на етанолі (1 %), глюкозі (1–2 %), сахарозі (1–2 %) концентрація ПАР становила 1,48; 1,16 і 2,3 г/л відповідно. Автори роботи [25] зазначають, що *R. erythropolis* sH-5 синтезує переважно асоційовані з клітинами поверхнево-активні речовини.

Перші згадки про використання гліцерину для синтезу ПАР родококами датуються 2006 р. [41], коли було встановлено, що *R. erythropolis* ATCC 4277 під час вирощування в колбах на качалці у середовищі з 1,5 % гліцерину утворював 0,4 г/л ПАР. Після масштабування процесу у ферментаторі Biostat® об'ємом 2 л вдалося підвищити концентрацію ПАР до 1,7 г/л за рахунок підтримання упродовж культивування концентрації розчиненого кисню на рівні 30 % (від насичення повітрям) і рН на рівні 7,0 [41]. У 2010 році Pacheco зі співавторами [42] показали, що цей же штам у процесі культивування в колбах на середовищі з 2 % гліцерину синтезував 0,285 г/л ПАР.

У роботі Ваїаї зі співавторами [43] повідомляється про здатність *Rhodococcus* sp. PTR03 синтезувати ПАР на гліцерині (1,5 %), проте концентрацію поверхнево-активних речовин автори не визначали.

Kazemi зі співавторами [13] встановили, що за умов росту на гліцерині і сахарозі *R. erythropolis* P6-4P утворював 0,3 і 0,5 г/л ПАР відповідно. У разі використання як субстрату крохмалю чи глюкози концентрація поверхнево-активних речовин підвищувалася до 1,0 г/л. Цілком ймовірно, що недостатньо висока кількість ПАР, синтезованих штамом P6-4P на гідрофільних джерелах вуглецю, зумовлена низькою концентрацією субстратів у середовищі (всього 5 г/л). Разом з тим, у роботі Nazina зі співавторами [44] було встановлено, що *R. ruber* 14H на середовищі з вищою концентрацією сахарози (10 г/л) утворював лише 0,54 г/л ПАР.

Корецька зі співавторами [15] показали, що *R. erythropolis* Au-1 синтезує асоційовані з клітинами ПАР не тільки на гідрофобних субстратах (вуглеводні, олії, див. табл. 1 і 2), а й на гідрофільних. Зазначимо проте, що концентрація поверхнево-активних речовин, синтезованих на сахарозі та гліцерині становила 0,78 і 0,38 г/л, відповідно та була у 2,2–9,2 разів нижчою, ніж на гідрофобних субстратах.

Актуальною проблемою останнього десятиліття є пошук шляхів утилізації технічного гліцерину – відходів виробництва біодизелю, що зумовлено щорічним збільшенням обсягів випуску цього виду біопалива приблизно на 8 % [45]. Передбачається, що до 2022 р. обсяг ринку біодизелю перевищить 3 млрд доларів США. Щорічне виробництво біодизелю у світі становить десятки мільйонів тон, при цьому частка утворюваних відходів сягає 10% [45, 46]. Одним з можливих варіантів їх утилізації може бути використання як субстрату для синтезу практично цінних мікробних метаболітів, у тому числі й поверхнево-активних речовин [46]. Якщо у літературі є достатньо інформації про біосинтез рамноліпідів [47] та аміноліпідів [48] на відходах виробництва біодизелю, то відомості про використання такого субстрату для одержання ПАР представниками роду *Rhodococcus* практично відсутні.

Наші дослідження [49, 50] показали можливість біоконверсії відходів виробництва біодизелю у поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017. Головна мета полягала у максимальному підвищенні концентрації технічного гліцерину у середовищі культивування штаму ІМВ Ас-5017 для забезпечення утилізації якомога більшої кількості цього токсичного відходу. Встановлено, що збільшення концентрації нітрату натрію до 2,6 г/л і кількості інокуляту до 10 % дало змогу реалізувати біосинтез ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на середовищі з 8% відходів виробництва біодизелю. Кількість синтезованих ПАР становила 3,4 г/л, що удвічі вище, ніж на базовому середовищі з нижчою концентрацією джерел вуглецю і азоту.

Інформацію про синтез поверхнево-активних речовин на гідрофільних субстратах підсумовано у табл. 3.

Отже, рівень синтезу ПАР за умов росту актинобактерій роду *Rhodococcus* на гідрофільних субстратах (спирти, вуглеводи) є нижчим порівняно з показниками на гідрофобних вуглеводневих і олієвмісних субстратах (див. табл. 1 і 2). Крім того, такі субстрати, за винятком технічного гліцерину, є дороговартісними, а тому невигідними для промислового виробництва ПАР. Використання відходів виробництва біодизелю для біосинтезу ПАР дає змогу вирішити дві актуальні проблеми: утилізувати токсичні відходи, а отже, й підвищити рентабельність виробництва біодизелю, а також знизити собівартість

поверхнево-активних речовин і тим самим підвищити ефективність технології їх одержання.

### Синтез поверхнево-активних речовин на змішаних субстратах

У роботах [25, 51–54] встановлено можливість біосинтезу ПАР бактеріями роду *Rhodococcus* на суміші ростових субстратів. На жаль, у більшості робіт [51–53] автори не порівнювали показники синтезу ПАР на моно- та змішаних субстратах, тому немає можливості оцінити ефективність таких процесів біосинтезу.

Mutalik зі співавторами [51] показали, що на середовищі з гексадеканом та манітолом *Rhodococcus* spp. МТСС 2574 синтезував 10,9 г/л ПАР. Таку комбінацію джерел вуглецю автори використовували, виходячи з міркувань про те, що наявність у середовищі гідрофобного гексадекану стимулюватиме синтез ПАР, а манітол є легко доступним джерелом вуглецю, що споживатиметься клітинами на ранніх фазах росту для накопичення біомаси. Зазначимо, що концентрація гексадекану у суміші є досить високою (68 г/л), тому вихід ПАР від субстрату є дуже низьким (15 %).

У роботі [52] встановлена здатність виділеного з глибоководного гідротермального осаду Окінавської западини штаму *Rhodococcus* sp. BS-15 до синтезу ПАР гліколіпідної природи на суміші глюкози (10 г/л) і оливкової олії (50 г/л). Вибір субстратів базувався на припущенні авторів, що глюкоза буде використовуватися для синтезу вуглеводної складової ПАР, а олія – ліпідної. Щоправда, ефективність трансформації змішаного субстрату у ПАР *Rhodococcus* sp. BS-15 не перевищувала 10%, тоді як концентрація цільового продукту, син-

тезованого на середовищі з глюкозою і оливковою олією, становила всього 6,31 г/л. Разом з тим автори роботи [52] акцентували увагу на тому, що оптимальною температурою для синтезу ПАР *Rhodococcus* sp. BS-15 є 20 °С, що не характерно для інших продуцентів поверхнево-активних речовин роду *Rhodococcus*. Така температура культивування робить процес біосинтезу ПАР *Rhodococcus* sp. BS-15 привабливим з економічної точки зору завдяки зниженню його енергоємності.

Сао [53] повідомив про виділення з північної частини Атлантичного океану штаму *R. erythropolis* sp. SB-1A, який синтезує суміш поверхнево-активних аміноліпідів та гліколіпідів. Оскільки на гексадекані як моносубстраті штаму SB-1A характеризувався повільним ростом, автор запропонував доповнити середовище глюкозою. Внесення у середовище з гексадеканом (3,5 %) глюкози у концентрації 1 г/л супроводжувалося збільшенням швидкості росту *R. erythropolis* sp. SB-1A. Зазначимо, що у даній роботі здатність до синтезу ПАР визначали за показником поверхневого натягу і критичної концентрації міцелоутворення і не аналізували концентрацію синтезованих ПАР, що не дає змоги оцінити ефект від використання змішаного субстрату.

У роботі Gogotov і Khodakov [25] встановлено, що *R. erythropolis* sH-5 у процесі культивування на суміші гасу (2 %) і меляси (0,5%) синтезує 3,2 г/л ПАР, що вдвічі вище, ніж на моносубстраті гасі. Автори роботи не обґрунтували вибір моносубстратів у складі їх суміші. Проте, можна припустити, що вуглеводи меляси є попередниками гліколіпідів, синтезованих штамом sH-5.

Таблиця 3

### Біосинтез ПАР бактеріями роду *Rhodococcus* на гідрофільних субстратах

Продуцент	Джерела вуглецю, концентрація	Кількість ПАР, г/л	Література
<i>R.erythropolis</i> ATCC 4277	Гліцерин, 1,5 %	1,7	[41]
<i>R.erythropolis</i> P6-4P	Глюкоза, 5 г/л	1,0	[13]
	Крохмаль, 5 г/л	1,0	[13]
	Гліцерин, 5 г/л	0,3	[13]
	Сахароза, 5 г/л	0,5	[13]
<i>R. ruber</i> 14H	Сахароза, 10 г/л	0,54	[44]
<i>R. erythropolis</i> Au-1	Гліцерин, 20 г/л	0,38	[15]
	Сахароза, 20 г/л	0,78	[15]
<i>R.erythropolis</i> sH-5	Етанол, 1%	1,48	[25]
	Глюкоза, 1–2 %	1,16	[25]
	Сахароза, 1–2 %	2,3	[25]
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	Відходи виробництва біодизелю, 8 %	3,4	[50]

В інших роботах автори емпірично встановлювали концентрацію моносубстратів у суміші [51–53]. Зазначимо, що основним критерієм ефективності змішаних субстратів є максимальна конверсія вуглецю в цільовий продукт, для досягнення якої необхідно визначити оптимальне для його синтезу молярне співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші, як було встановлено у наших дослідженнях [39, 54]. Це потребує попереднього здійснення теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ПАР і біомаси на енергетично дефіцитному субстраті з наступним визначенням концентрації енергетично надлишкового субстрату, що забезпечить «покриття» енергетичних витрат на цей процес [54]. Для розрахунку оптимального співвідношення моносубстратів необхідно знати шляхи їх метаболізму, структуру синтезованих ПАР, а також співвідношення Р/О (кількість молекул АТФ, які утворюються в розрахунку на один атом кисню у процесі окиснювального фосфорилування). Теоретичний розрахунок енергетичних потреб синтезу трегалозоміколатів *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на суміші енергетично надлишкового гексадекану і енергетично дефіцитного гліцерину показав, що оптимальним для синтезу ПАР є молярне співвідношення субстратів 1:7. За таких умов спостерігали збільшення умовної концентрації ПАР на 38 % та 122 % порівняно з показниками на моносубстратах гексадекані та гліцерині відповідно [39, 54].

Узагальнені дані щодо показників синтезу ПАР за умов росту бактерій роду *Rhodococcus* на змішаних субстратах наведені в табл. 4.

Ці дані свідчать про доцільність використання суміші ростових субстратів для синтезу ПАР, оскільки у цьому разі їхня концентрація є вищою, ніж на гідрофобних та гідрофільних моносубстратах (див. табл. 1–3).

### Утворення ПАР бактеріями роду *Rhodococcus* на інших субстратах

У роботі Kazemi зі співавторами [13] встановлена здатність *R. erythropolis* sp. P6-4P до синтезу 1,5 г/л ПАР на екстракті компостованих рибних відходів. Автори зазначають, що понад 50 % виловленої риби класифікується як рибні відходи, утилізація яких є проблемою для рибопереробних підприємств і рибних ферм. Компостування є одним з варіантів вирішення даної проблеми. Компост, виготовлений з рибних відходів, багатий на поживні речовини [55], завдяки чому може бути використаний як субстрат у біотехнологічних процесах. Цими ж авторами [13] показано, що екстракт компостованих рибних відходів може слугувати не тільки джерелом вуглецю для синтезу ПАР штамом P6-4P, а й джерелом азоту.

Автори робіт [56–58] встановили, що культивування представників роду *Rhodococcus* на середовищах з ароматичними поліциклічними вуглеводнями часто супроводжується синтезом ПАР, які полегшують споживання цих ксенобіотиків мікроорганізмами. Зазвичай, під час проведення таких досліджень здатність до синтезу ПАР встановлювали за показником поверхневого натягу.

Так, у роботі Mishra з колегами [56] показано, що під час вирощування *Rhodococcus* sp. NJ2 у середовищі з 200 мг/л флуорантену (поліциклічний вуглеводень) поверхневий натяг культуральної рідини знижувався до 28 мН/м. На 10-у добу культивування ступінь деструкції ксенобіотика становив 74%.

Група вчених з Болгарії – Hristov, Christova, Kabaivanova та ін. [57] встановила здатність вільних та іммобілізованих клітин *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 до асиміляції моно- та суміші субстратів (фенол, гексадекан) з одночасним синтезом ПАР. Субстрат вносили циклами

**Таблиця 4**

#### Біосинтез ПАР за умов росту бактерій роду *Rhodococcus* на суміші субстратів

Продуцент	Джерела вуглецю, концентрація	Кількість ПАР, г/л	Література
<i>Rhodococcus</i> spp. МТСС 2574	Гексадекан, 63,8 г/л + манітол, 1,6 г/л	10,9	[51]
<i>R. erythropolis</i> sH-5	Дизельне паливо, 5%+ м'яса, 0,5%	4,2	[25]
<i>R. erythropolis</i> sH-5	Гас, 2% + м'яса, 0,5%	3,9	[25]
<i>R. erythropolis</i> sp. SB-1A	Гексадекан, 3,5%+ глюкоза, 1 г/л	–*	[53]
<i>Rhodococcus</i> sp. BS-15	Оливкова олія, 50 г/л + глюкоза, 10 г/л	6,31	[52]

Примітка: \* – дані не наведено.



дробно по 500 мг/л кожного вуглеводню. Цикл вважався завершеним після повної деструкції фенолу і гексадекану, в результаті чого субстрати у середовище вносили повторно. Встановлено, що вільні клітини повністю асимілювали суміш вуглеводнів (за 16 циклів повністю асимільовано 8 г/л фенолу та гексадекану). У разі використання іммобілізованих у гідроксипропілцелюлозо/полі(N-ізопропілакриламідному) криогелі клітин за 40 циклів спостерігали деструкцію 20 г/л вуглеводнів. Під час культивування показник поверхневого натягу знижувався до 32 мН/м.

Kundu зі співавторами [58] показали, що *Rhodococcus pyridinovorans* NT2 розкладав на 98% 400 мг/л 4-нітротолуену упродовж 120 год. Асиміляція ксенобіотика супроводжувалася синтезом ПАР, щоправда, його концентрація була невисокою і становила всього 45 мг/л.

Наші дослідження [59] показали, що *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 синтезує поверхнево-активні речовини у процесі культивування на ароматичних вуглеводнях. За умов росту штаму ІМВ Ас-5017 на середовищі з фенолом і толуолом (0,5 %) умовна концентрація ПАР становила 3,3 та 1,3 відповідно. Вищі концентрації фенолу та толуолу виявилися токсичними для *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017. Бензол та нафталін у невисоких концентраціях (0,3%) інгібували біосинтез ПАР (умовна концентрація поверхнево-активних речовин не перевищувала 0,6).

Наведені дані щодо утворення ПАР бактеріями роду *Rhodococcus* під час споживання токсичних вуглеводнів свідчать про доцільність їх використання у складі препаратів для деструкції цих ксенобіотиків.

•••

Отже, якщо до недавнього часу дослідники використовували для синтезу поверхнево-активних речовин актинобактеріями роду *Rhodococcus* в основному вуглеводневі субстрати, то останніми роками ситуація змінилася. З кожним роком збільшується кількість публікацій про утворення ПАР за умов росту родококів на так званих «нетрадиційних» для цих бактерій субстратах: олієвмісних (у тому числі й олійних фузах та відпрацьованій олії), гідрофільних (у тому числі й відходах виробництва біодизелю), а також змішаних. Проте зазначимо, що у сучасній літературі відомостей про синтез ПАР представниками роду *Rhodococcus* значно менше, ніж інформації про утворення по-

верхнево-активних рамноліпідів (*Pseudomonas*) [27, 28, 47, 60, 61], аміноліпідів (*Bacillus*) [48, 62, 63], софороліпідів та манозилеритритолліпідів (дріжджі) [30, 64–66]. На нашу думку, це зумовлено наступними причинами:

*По-перше*, концентрація ПАР, синтезованих родококами, є нижчою, ніж інших гліколіпідів. *По-друге*, високою залишається вартість субстратів, які використовуються для їх синтезу (вуглеводні). *По-третє*, потенційне практичне застосування ПАР родококів обмежується в основному природоохоронними технологіями (деструкція ксенобіотиків) [6–10, 22, 56–58]. Рамно-, софороліпіди та аміноліпіди є препаратами мультифункціонального призначення, яким притаманна висока антимікробна та антиадгезивна активність, у тому числі й здатність до руйнування біоплівки. Інформація про антимікробні та антиадгезивні властивості різних мікробних ПАР підсумована нами в оглядах [67, 68]. Щоправда, у літературі є відомості про імономодульовальні властивості ПАР родококів [69–71], проте їх кількість значно нижча, ніж публікацій про біологічні властивості інших мікробних ПАР.

Від описаних у літературі представників роду *Rhodococcus* вигідно відрізняється ізольований нами штам *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, який має такі переваги:

– синтезує позаклітинні ПАР на широкому спектрі вуглецевих субстратів, у тому числі й токсичних промислових відходах, при цьому концентрація ПАР досягає 7–8 г/л, а вихід від субстрату – 40–50 % [1, 38, 39, 50];

– крім високої ефективності деструкції нафтових забруднень, у тому числі й комплексних з важкими металами, ПАР характеризуються високою антимікробною та антиадгезивною активністю [72, 73];

– антимікробна та антиадгезивна активність, у тому числі й здатність до руйнування біоплівки, притаманні супернатанту культуральної рідини, що дає змогу вилучити з технологічного процесу дорогу стадію виділення та очищення ПАР;

– крім позаклітинних поверхнево-активних речовин, штам синтезує фітогормони ауксинової, цитокінінової та гіберелінової природи [74, 75], що робить його перспективним для створення безвідходної інтегрованої біотехнології одержання комплексного мікробного препарату з різноманітними біологічними властивостями.

# BIOSYNTHESIS OF SURFACTANTS BY ACTINOBACTERIA OF *RHODOCOCCUS* GENUS

T.P. Pirog<sup>1,2</sup>, B.S. Heichenko<sup>1</sup>,  
T.A. Shevchuk<sup>2</sup>, F.V. Muchnyk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National University of Food Technologies,  
68 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

## Summary

Market interest to the *Rhodococcus* genus bacteria is due to the unique properties of their metabolism, in particular, the ability to destroy many xenobiotics, which often occurs with a participation of glycolipid nature surfactants synthesized by these actinobacteria. The review presents recent literature data and the results of own experimental studies concerning formation of surfactants under cultivation of *Rhodococcus* on traditional hydrocarbons (n-alkanes, crude oil, kerosene, diesel fuel), other hydrophobic (refined oils) and hydrophilic (glycerol, ethanol, carbohydrates) mono- and mixed substrates, as well as industrial wastes (fried oil, waste of biodiesel production). The largest number of publications relates to the synthesis of surfactants by these actinobacteria on hydrocarbons, while information about using oil and hydrophilic substrates, as well as industrial waste for the formation of surfactants, is limited. Optimization of producers cultivation conditions, including the use of mathematical methods, mutant and genetically engineered strains allowed to increase synthesizing ability of *Rhodococcus* genus representatives on different substrates to the level of highly active producers of other surface-active glycolipids (rhamno- and sophorolipids).

**Keywords:** *Rhodococcus*, intensification of surfactants synthesis, hydrophilic and hydrophobic substrates, industrial waste.

1. Pirog TP, Shulyakova MO, Shevchuk TA, Sofylkanich AP. [Biotechnological potential of bacteria of *Rhodococcus* strain and their metabolites]. *Biotechnology*. 2012; 5(2):51–67. Ukrainian.
2. Rapp P, Bock H, Wray V, Wagner F. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *J Gen Microbiol*. 1979; 115(2):491–503.
3. Uchida Y, Misawa S, Nakahara T, Tabuchi T. Factors affecting the production of succinoyl trehalose lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD-74 grown on n-alkanes. *Agricultural Biol Chem*. 1989; 53(3):765–9.
4. Uchida Y, Tsuchiya R, Chino M. Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Agricultural Biol Chem*. 1989; 53(3):757–63.
5. Singer ME, Finnerty WR. Physiology of biosurfactant synthesis by *Rhodococcus* species H13-A. *Can J Microbiol*. 1990; 36(11):741–5.
6. Li C, Zhou ZX, Jia XQ, Chen Y, Liu J, Wen JP. Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain *Rhodococcus* sp. JZX-01. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013; 171(7):1715–25. doi:10.1007/s12010-013-0451-4.
7. Kumari B, Singh SN, Singh DP. Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation. *Process Biochem*. 2012; 47(12):2463–71.
8. Petrikov K, Delegan Y, Surin A, Ponamoreva O, Puntus I, Filonov A, et al. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: formation and structure. *Process Biochem*. 2013; 48(5–6):931–35. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.008>
9. Nechaeva IA, Luong TM, Satina VE, Ponamoreva ON. [Influence of the physiological characteristics of the bacteria genus *Rhodococcus* on the degradation n-hexadecane]. *Proceedings Tula State University. Series: Natural Sciences*. 2016; 1:90–8. Russian.
10. Lee DW, Lee H, Kwon BO, Khim JS, Yim UH, Kim BS, et al. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environ Pollut*. 2018; 241:254–64. doi:10.1016/j.envpol.2018.05.070.
11. Luong TM, Ponamoreva ON, Nechaeva IA, Petrikov KV, Delegan YA, Surin AK, et al. Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus*

- erythropolis* S67 at low temperature. World J Microbiol Biotechnol. 2018; 34(2):20. doi:10.1007/s11274-017-2401-8.
12. Ramanathan K. Enhancement of hydrocarbon degradation using biosurfactants from *Rhodococcus* species in a membrane reactor system. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Heriot-Watt University, Edinburgh, 2014. 173 p.
  13. Kazemi K, Zhang B, Lye ML. Production of biosurfactant by *Rhodococcus erythropolis* sp. cultivated in a novel fish waste compost extract substrate. In: Proceeding of Annual Conference of the Canadian Society for Civil Engineering; 2016 June 1–4; London, Canada: London, 2016. ENV-653-2.
  14. Bages-Estopa S, White DA, Winterburn JB, Webb C, Martin PJ. Production and separation of a trehalolipid biosurfactant. Biochem Eng J. 2018; 139:85–94. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.006>.
  15. Koretska N, Prystai M, Karpenko O. [Biosynthesis and properties of surfactants of *Rhodococcus erythropolis* Au-1 strain]. Visnyk (Official Gazette) of Lviv Polytechnic National University. Series: Chemistry, Materials Technology and Application. 2014; 787:258–63. Ukrainian.
  16. Shulga A, Shcheglova N, Vildanova R. [Influence of potassium alum on the synthesis of microbial surface-active compounds]. Microbiol Biotechnol. 2014; 1:85–93. Russian.
  17. Xia W, Dong H, Yu L, Yu D. Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects. 2011; 392(1):124–30. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.09.044>.
  18. Zheng C, Yu L, Huang L, Xiu J, Huang Z. Investigation of a hydrocarbon-degrading strain, *Rhodococcus ruber* Z25, for the potential of microbial enhanced oil recovery. J Petrol Sci Eng. 2012; 81:49–56.
  19. Lv Z, Cai Q, Zhang B, Chen B. A new high-yielding bio-dispersant producer mutated from *Rhodococcus erythropolis* strain P6-4P. In: Proceeding of Annual Conference of the Canadian Society for Civil Engineering; 2016 June 1–4; London, Canada: London, 2016. ENV-624-1.
  20. Cai Q, Zhang B, Chen B, Cao T, Lv Z. Biosurfactant produced by a *Rhodococcus erythropolis* mutant as an oil spill response agent. Water Qual Res J Can. 2016; 51(2):97–105. doi:10.2166/wqrjc.2016.025.
  21. Inaba T, Tokumoto Y, Miyazaki Y, Inoue N, Maseda H, Nakajima-Kambe T, et al. Analysis of genes for succinoyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. strain SD-74. Appl Environ Microbiol. 2013; 79(22): 7082–90. doi:10.1128/AEM.01664-13.
  22. Kis ÁE, Laczi K, Zsíros S, Kós P, Tengölics R, Boundedjoum N, et al. Characterization of the *Rhodococcus* sp. MK1 strain and its pilot application for bioremediation of diesel oil-contaminated soil. Acta Microbiol Immunol Hung. 2017; 64(4):463–82. doi:10.1556/030.64.2017.037/
  23. Vuong Thi Nga, Kieu Quynh Hoa, Tran Dinh Man, Lai Thuy Hien. Medium optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus ruber* TD2 using response surface methodology. TAP CHI SINH HOC. 2014; 36(3):360–6. doi:10.15625/0866-7160/v36n3.5976.
  24. Hien LT, Yen NT, Nga VT. Biosurfactant-producing *Rhodococcus ruber* TD2 isolated from oil polluted water in vung tau coastal zone. TAP CHI SINH HOC. 2013; 35(4):454–60.
  25. Gogotov IN, Khodakov RS. Surfactant Production by the *Rhodococcus erythropolis* sH-5 Bacterium Grown on Various Carbon Sources. Appl Biochem Microbiol. 2008; 44(2):186–91. <https://doi.org/10.1134/S0003683808020105>.
  26. Pirog TP, Shevchuk TA, Klimenko YuA. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane. Appl Biochem Microbiol. 2010; 46(6):599–606. <https://doi.org/10.1134/S0003683810060074>.

27. Tan YN, Li Q. Microbial production of rhamnolipids using sugars as carbon sources. *Microb Cell Fact.* 2018; 17(1):89. doi:10.1186/s12934-018-0938-3.
28. Nurfarahin AH, Mohamed MS, Phang LY. Culture medium development for microbial-derived surfactants production – an overview. *Molecules.* 2018; 23(5). pii: E1049. doi:10.3390/molecules23051049.
29. Ebadipour N, Lotfabad TB, Yaghmaei S, RoostaAzad R. Optimization of low-cost biosurfactant production from agricultural residues through response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol.* 2016; 46(1):30–8. doi:10.1080/10826068.2014.979204.
30. Almeida DG, Soares da Silva RC, Luna JM, Rufino RD, Santos VA, Sarubbo LA. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. *Front Microbiol.* 2017; 8:157. doi:10.3389/fmicb.2017.00157.
31. Araújo HWC, Andrade RFS, Montero-Rodríguez D, Rubio-Ribeaux D, Alves da Silva CA, Campos-Takaki GM. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microb Cell Fact.* 2019; 18(1):2. doi:10.1186/s12934-018-1046-0.
32. Sadouk Z, Hacene H, Tazerouti A. Biosurfactants production from low cost substrate and degradation of diesel oil by a *Rhodococcus* strain. *Oil Gas Sci Technol – Rev IFP.* 2008; 63(6):747–53. doi:10.2516/ogst:2008037.
33. Ruggeri C, Franzetti A, Bestetti G, Careda P, La Colla P, Pintus M, et al. Isolation and characterization of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments. *Int Biodeter Biodegr.* 2009; 63(7):936–42. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.05.003
34. Moussa LA, Abdel Azeiz AZ. Identification and characterization of biosurfactants produced by *Rhodococcus equi* and *Bacillus methylotrophicus*. *J Biol Chem Environ Sci.* 2013; 2(8):341–58.
35. Suryanti V, Hastuti S, Pujiastuti D. Evaluation of biosurfactants grown in corn oil by *Rhodococcus rhodochrous* on removing of heavy metal ion from aqueous solution. *AIP Conference Proceedings.* 2016; 1710 (1):030016. https://doi.org/10.1063/1.4941482
36. White D, Hird L, Ali S. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. *J Appl Microbiol.* 2013; 115(3):744–55. doi:10.1111/jam.12287.
37. Koretska N, Prystai M, Karpenko O. Rape phosphatide concentrate in the technologies of surfactants production by the *Actinobacteria*. *Ukrainian Food J.* 2014; 3(3):422–29.
38. Pirog T, Sofilkanych A, Shevchuk T, Shulyakova M. Biosurfactants of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017: synthesis intensification and practical application. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013; 170(4):880–94. doi:10.1007/s12010-013-0246-7.
39. Pirog T, Sofilkanych A, Konon A, Shevchuk T, Ivanov S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. *Food Bioprod Process.* 2013; 91(2):149–57. http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.001
40. Pirog TP, Shevchuk TA, Volishina IN, Karpenko EV. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates. *Appl Biochem Microbiol.* 2004; 40(5):470–75. https://doi.org/10.1023/B:ABIM.0000040670.33787.5f.
41. Ciapina EM, Melo WC, Santa Anna LM, Santos AS, Freire DM, Pereira NJr. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source. *Appl Biochem Biotechnol.* 2006; 131(1–3):880–6.
42. Pacheco G, Ciapina E, Gomes E, Junior N. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. *Braz J Microbiol.* 2010; 41(3):685–93. doi:10.1590/S1517-83822010000300019.

43. Bajaj A, Mayilraj S, Mudiam MK, Patel DK, Manickam N. Isolation and functional analysis of a glycolipid producing *Rhodococcus* sp. strain IITR03 with potential for degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT). *Bioresour Technol.* 2014; 167:398–406. doi:10.1016/j.biortech.2014.06.007.
44. Nazina T, Kostrukova N, Tatarkin Yu, Babich T, Sokolova D, Ivoilov V, et al. [Biogeochemical processes in carbonate oil plasts with different physical and chemical conditions as a basis for the development of biotechnology improvement oil]. *Georesources, geoenergy, geopolitics.* 2014; 1(9):1–13. Russian.
45. Vivek N, Sindhu R, Madhavan A, Anju AJ, Castro E, Faraco V, et al. Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate – metabolic aspects, challenges and possibilities: an overview. *Bioresour Technol.* 2017; 239:507–17. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.056.
46. Poblete-Castro I, Wittmann C, Nikel PI. Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species. *Microb Biotechnol.* 2019. doi:10.1111/1751-7915.13400.
47. Salazar-Bryam AM, Lovaglio RB, Contiero J. Biodiesel byproduct bioconversion to rhamnolipids: upstream aspects. *Heliyon.* 2017; 3(6):e00337. doi:10.1016/j.heliyon.2017.e00337.
48. Etchegaray A, Coutte F, Chataigné G, Béchet M, Dos Santos RH, Leclère V, et al. Production of *Bacillus amyloliquefaciens* OG and its metabolites in renewable media: valorisation for biodiesel production and p-xylene decontamination. *Can J Microbiol.* 2017; 63(1):46–60. doi:10.1139/cjm-2016-0288.
49. Pirog T, Shulyakova M, Sofilkanych A, Shevchuk T, Mashchenko O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. *Food Bioprod Process.* 2015; 93:11–8. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.09.003>.
50. Pirog TP, Shevchuk TA, Mashchenko OYu. [The ways of increasing bioconversion of crude glycerol in biosurfactants of *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405]. *Mikrobiol Z.* 2015; 77(1):2–8. <https://doi.org/10.15407/microbiolj77.01.002>. Russian.
51. Mutalik SR, Vaidya BK, Joshi RM, Desai KM, Nene SN. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. *Bioresour Technol.* 2008; 99(16):7875–80. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.027.
52. Konishi M, Nishi S, Fukuoka T, Kitamoto D, Watsuji TO, Nagano Y, et al. Deep-sea *Rhodococcus* sp. BS-15, lacking the phytopathogenic fas genes, produces a novel glucotriose lipid biosurfactant. *Mar Biotechnol (NY).* 2014; 16(4):484–93. doi:10.1007/s10126-014-9568-x.
53. Cao T. Generation of biodispersants for offshore oil spill response. Thesis for the degree of Master of Engineering. Memorial University of Newfoundland. Newfoundland, 2015. 137 p.
54. Pirog TP, Shulyakova MO, Shevchuk TA. [Mixed substrates in environment and biotechnological processes]. *Biotechnologia Acta.* 2013; 6 (6):28–44. doi:10.15407/biotech6.06.028. Ukrainian.
55. Ghaly AE, Ramakrishnan VV, Brooks MS, Budge SM, Dave D. Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: a critical review. *J Microb Biochem Technol.* 2013; 5(4):107–29.
56. Mishra S, Singh SN, Pande V. Bacteria induced degradation of fluoranthene in minimal salt medium mediated by catabolic enzymes in vitro condition. *Bioresour Technol.* 2014; 164:299–308. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.076.

57. Hristov AE, Christova NE, Kabaivanova LV, Nacheva LV, Stoineva IB, Petrov PD. Simultaneous biodegradation of phenol and n-hexadecane by cryogel immobilized biosurfactant producing strain *Rhodococcus wratislawiensis* BN38. *Pol J Microbiol.* 2016; 65(3):287–93. doi:10.5604/17331331.1215608.
58. Kundu D, Hazra C, Dandi N, Chaudhari A. Biodegradation of 4-nitrotoluene with biosurfactant production by *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: metabolic pathway, cell surface properties and toxicological characterization. *Biodegradation.* 2013; 24(6):775–93.
59. Pirog TP, Shulyakova MO, Nikituk LV, Antonuk SI, Elperin IV. Industrial waste bioconversion into surfactants by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405. *Biotechnologia Acta.* 2017; 10(2):22–33. <https://doi.org/10.15407/biotech10.02.022>.
60. Pérez-Armendáriz B, Cal-Y-Mayor-Luna C, El-Kassis EG, Ortega-Martínez LD. Use of waste canola oil as a low-cost substrate for rhamnolipid production using *Pseudomonas aeruginosa*. *AMB Express.* 2019; 9(1):61. doi:10.1186/s13568-019-0784-7.
61. Eraqi WA, Yassin AS, Ali AE, Amin MA. Utilization of crude glycerol as a substrate for the production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol Res Int.* 2016; 2016:3464509. doi:10.1155/2016/3464509.
62. Dang Y, Zhao F, Liu X, Fan X, Huang R, Gao W et al. Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microb Cell Fact.* 2019; 18(1):68. doi:10.1186/s12934-019-1121-1.
63. Ayed HB, Azabou MC, Hmidet N, Triki MA, Nasri M. Economic production and biocontrol efficiency of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus mojavensis* A21. *Biodegradation.* 2018. doi:10.1007/s10532-018-9864-7.
64. Zhou G, Tian X, Lin Y, Zhang S, Chu J. Rational high-throughput system for screening of high sophorolipids-producing strains of *Candida bombicola*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2019; 42(4):575–82. doi:10.1007/s00449-018-02062-w.
65. Konishi M, Makino M. Selective production of deacetylated mannosylerythritol lipid, MEL-D, by acetyltransferase disruption mutant of *Pseudozyma hubeiensis*. *J Biosci Bioeng.* 2018; 125(1):105–10. doi:10.1016/j.jbiosc.2017.08.003.
66. Saika A, Koike H, Fukuoka T, Morita T. Tailor-made mannosylerythritol lipids: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(16):6877–84. doi:10.1007/s00253-018-9160-9.
67. Pirog TP, Savenko IV, Lutsay DA. Microbial surface-active substances as antiadhesive agents. *Biotechnologia Acta.* 2016; 9(3):7–22. doi:org/10.15407/biotech9.03.007.
68. Pirog TP, Lutsay DA, Kliuchka LV, Beregovaya KA. Antimicrobial activity of surfactants of microbial origin. *Biotechnologia Acta.* 2019; 12(1):39–57. <https://doi.org/10.15407/biotech12.01.039>.
69. Gein SV, Kuyukina MS, Ivshina IB, Baeva TA, Chereshnev VA. *In vitro* cytokine stimulation assay for glycolipid biosurfactant from *Rhodococcus ruber*: role of monocyte adhesion. *Cytotechnology.* 2011; 63(6):559–66. doi:10.1007/s10616-011-9384-3.
70. Baeva TA, Gein SV, Kuyukina MS, Ivshina IB, Kochina OA, Chereshnev VA. Effect of glycolipid *Rhodococcus* biosurfactant on secretory activity of neutrophils *in vitro*. *Bull Exp Biol Med.* 2014; 157(2):238–42. doi:10.1007/s10517-014-2534-9.
71. Gein SV, Kochina OA, Kuyukina MS, Ivshina IB. Effects of glycolipid *Rhodococcus* biosurfactant on innate and adaptive immunity parameters *in vivo*. *Bull Exp Biol Med.* 2018;165(3):368–72. doi:10.1007/s10517-018-4172-0.
72. Pirog TP, Konon AD, Beregovaya KA, Shulyakova MA. Antiadhesive properties of the surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis*

- IMB Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Microbiology*. 2014; 83(6):732–9. doi:10.1134/S0026261714060150.
73. Pirog TP, Shevchuk TA, Petrenko NM, Paliichuk OI, Iutynska GO. [Influence of cultivation conditions of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 on the properties of synthesized surfactants]. *Mikrobiol Z*. 2018; 80(4):13–27. <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.04.013>. Ukrainian.
74. Pirog T, Leonova N, Shevchuk T, Savenko I, Iutinska H. [Synthesis of phytohormones bacteria of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 – producers of surface-active substances]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017; (1):90–5. Russian.
75. Pirog TP, Havrylkina DV, Leonova NO, Shevchuk TA, Iutynska GO. [Synthesis of biologically active gibberellins GA<sub>4</sub> and GA<sub>7</sub> by microorganisms]. *Mikrobiol Z*. 2019; 81(2):90–109. <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.02.090>. Ukrainian.

Отримано 30.07.2019