

УДК 606

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-5-418-428>

EDN MYVCLW



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Солюбилизация *n*-гексадекана мицеллярными растворами трегалолипида — ПАВ биологического происхождения

И.А. Нечаева¹, А.С. Парфенова¹, А.С. Филиппова¹, А.Е. Фионов^{1,2}

¹ Тульский государственный университет, Тула, 300012 Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Российская академия наук, Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, Пуццино, 142290 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: nechaeva1902@gmail.com

Аннотация

Цели. Выделить биосурфактанты гликолипидной природы, продуцируемые бактериями-деструкторами углеводов нефти, и установить их способность к солюбилизации гидрофобных соединений на примере *n*-гексадекана.

Методы. Трегалоллипиды выделяли из бактерий *Rhodococcus erythropolis* X5 (ВКМ Ас-2532 Д) и *Rhodococcus erythropolis* S67 (ВКМ Ас-2533 Д), входящих в биопрепарат «МикроБак» для биоремедиации нефтезагрязненных территорий. Геном *R. erythropolis* X5 депонирован в базе данных National Center for Biotechnology Information под номерами доступа GenBankCP044283 и CP044284, BioSample – SAMN12818508, BioProject – PRJNA573614 и SRA – PRJNA573614. Содержание трегалолипидных биосурфактантов оценивали по количеству трегалозы в водных растворах биосурфактантов с помощью фенольно-серного метода. Поверхностное натяжение полученных водных растворов биосурфактантов определяли методом отрыва кольца де Нуи с использованием тензиометра Kruss K6 (Kruss, Германия). Критическую концентрацию мицеллообразования определяли по точке перегиба на кривых зависимостей поверхностного натяжения от концентрации раствора биосурфактанта. Для установления солюбилизирующей способности биосурфактантов определяли остаточную концентрацию *n*-гексадекана в водной пробе различной концентрации с помощью газохроматографического метода анализа.

Результаты. При постоянном поверхностном натяжении 24.2 мН/м и 25.0 мН/м для *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67 соответственно значение критической концентрации мицеллообразования для обоих штаммов составило 33 мг/л ($3.8 \cdot 10^{-5}$ моль/л). С помощью газохроматографического метода анализа показано солюбилизирующее действие мицеллярных растворов трегалолипидов родококков в отношении гидрофобного *n*-гексадекана. Процесс солюбилизации охарактеризовали с помощью молярной солюбилизирующей способности (molar solubilization capacity, S_m), молярного коэффициента солюбилизации (molar solubilization ratio, MSR), коэффициента распределения мицелла–вода (micelle–water partition coefficient, K_m) и энергии солюбилизации (ΔG_S^0). Показано, что процесс солюбилизации *n*-гексадекана протекает самопроизвольно ($\Delta G_S^0 = -35.5$ кДж/моль) и более эффективно ($S_m = 4.3$ моль/моль, MSR = 4.7 моль/моль) по сравнению с другими биосурфактантами гликолипидной природы.

Выводы. На основании величины молярного коэффициента солюбилизации можно сделать вывод, что трегалолипиды штамма *R. erythropolis* X5 в большей степени солюбилизируют *n*-гексадекан в водных растворах по сравнению с другими биосурфактантами гликолипидной природы, однако уступают синтетическим поверхностно-активным соединениям.

Ключевые слова

биосурфактанты, солюбилизация, бактерии-деструкторы, поверхностное натяжение, *Rhodococcus*, *n*-гексадекан, трегалолипиды

Поступила: 19.01.2024

Доработана: 16.04.2024

Принята в печать: 06.09.2024

Для цитирования

Нечаева И.А., Парфенова А.С., Филиппова А.С., Филонов А.Е. Солюбилизация *n*-гексадекана мицеллярными растворами трегалолипида — ПАВ биологического происхождения. *Тонкие химические технологии*. 2024;19(5):418–428. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-5-418-428>

RESEARCH ARTICLE

Solubilization of *n*-hexadecane by micellar solutions of trehalolipid—surfactants of biological origin

Irina A. Nechaeva^{1,✉}, Anastasia S. Parfenova¹, Anastasia S. Filippova¹, Andrey E. Filonov^{1,2}

¹ Tula State University, Tula, 300012 Russia

² Pushchino Scientific Center for Biological Research, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

✉ Corresponding author, e-mail: nechaeva1902@gmail.com

Abstract

Objectives. To isolate biosurfactants of glycolipid nature produced by oil hydrocarbon degrading bacteria and to establish their ability to solubilize hydrophobic compounds in the case of *n*-hexadecane.

Methods. Trehalolipids were isolated from bacteria *Rhodococcus erythropolis* X5 (VKM Ac-2532 D) and *Rhodococcus erythropolis* S67 (VKM Ac-2533 D) included in the MikroBak biopreparation for the bioremediation of oil-contaminated territories. The genome of *R. erythropolis* X5 is deposited in the National Center for Biotechnology Information database under GenBank accession numbers CP044283 and CP044284, BioSample – SAMN12818508, BioProject – PRJNA573614, and SRA – PRJNA573614. The content of trehalolipid biosurfactants was estimated by the amount of trehalose in aqueous solutions of biosurfactants using the phenol-sulfur method. The surface tension of the obtained aqueous solutions of biosurfactants was determined by the du Noüy ring method using a Kruss K6 tensiometer (Kruss, Germany). The critical concentration of micelle formation was determined by the inflection point on the curves of surface tension dependence on the concentration of the biosurfactant solution. In order to establish the solubilizing ability of biosurfactants, the residual concentration of *n*-hexadecane in an aqueous sample of different concentrations was determined using a gas chromatographic method of analysis.

Results. At a constant surface tension of 24.2 mN/m and 25.0 mN/m for *R. erythropolis* X5 and *R. erythropolis* S67, respectively, the critical micelle concentration for both strains was 33 mg/L ($3.8 \cdot 10^{-5}$ mol/L). The solubilizing effect of *Rhodococcus* trehalolipid micellar solutions against hydrophobic *n*-hexadecane was demonstrated by gas chromatographic analysis. The solubilization process was characterized using molar solubilization capacity (S_m), molar solubilization ratio (MSR), micelle–water partition coefficient (K_m), and solubilization energy (ΔG_S^0). It was shown that the solubilization process of *n*-hexadecane proceeds spontaneously ($\Delta G_S^0 = -35.5$ kJ/mol) and more efficiently ($S_m = 4.3$ mol/mol, MSR = 4.7 mol/mol) than in comparison with other biosurfactants of glycolipid nature.

Conclusions. Based on the value of the molar solubilization coefficient, it can be concluded that trehalolipids of the *R. erythropolis* X5 strain solubilize *n*-hexadecane in aqueous solutions to a greater extent than compared to other biosurfactants of a glycolipid nature, but are inferior to synthetic surfactants.

Keywords

biosurfactants, solubilization, bacteria-destroyers, surface tension, *Rhodococcus*, *n*-hexadecane, trehalolipids

Submitted: 19.01.2024

Revised: 16.04.2024

Accepted: 06.09.2024

For citation

Nechaeva I.A., Parfenova A.S., Filippova A.S., Filonov A.E. Solubilization of *n*-hexadecane by micellar solutions of trehalolipid—surfactants of biological origin. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2024;19(5):418–428. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-5-418-428>

ВВЕДЕНИЕ

Биосурфактанты или поверхностно-активные вещества (ПАВ) биологического происхождения благодаря своим физико-химическим и биологическим свойствам имеют значительные преимущества перед синтетическими ПАВ и стремительно занимают значительную нишу в производстве так называемых «зеленых» продуктов, вытесняя с рынка аналоги химического происхождения. Благодаря структурному разнообразию и таким свойствам, как снижение поверхностного и межфазного натяжения, пенообразование, эмульгирование, смачивание, стабилизация эмульсий и солюбилизация гидрофобных веществ, биосурфактанты можно применять в фармацевтической и пищевой промышленности [1], косметологии [2], для увеличения нефтеотдачи, в биоремедиации загрязненных территорий [3], в биоэлектрохимии [4], в сельском хозяйстве [5] и технологиях очистки сточных вод. Продуцентами биосурфактантов являются микроорганизмы различных таксономических групп, например, бактерии родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* и дрожжи родов *Candida* и *Rhodotorula* [6].

Особое внимание среди бактерий, способных образовывать и выделять в окружающую среду биосурфактанты, следует уделить бактериям рода *Rhodococcus*. Метаболическая активность родококков обусловлена наличием большого числа ферментных систем, которые позволяют им разлагать многие природные и антропогенные органические соединения, например, алканы, циклоалканы, ароматические соединения, фенолы, полициклические ароматические углеводороды, галогенированные углеводороды и полихлорированные соединения. Список токсичных соединений, загрязняющих окружающую среду, которые могут быть минерализованы или трансформированы родококками, довольно велик и включает также взрывчатые вещества, фармацевтические препараты, пластмассы и труднорастворимые синтетические полимеры [7].

Для родококков характерно образование ПАВ гликолипидной природы в ответ на присутствие в питательной среде алканов. Такие вещества представляют собой один или два не восстанавливающих дисахарида трегалозы, связанных с миколовыми кислотами — длинноцепочечными α -разветвленными- α -гидроксированными жирными кислотами с различной длиной углеродной цепи [8].

Низкая критическая концентрация мицеллообразования (ККМ), способность снижать поверхностное и межфазное натяжение, высокая активность в экстремальных условиях среды (температура, pH), хорошая эмульгирующая способность в сочетании с высокой биоразлагаемостью, низкой токсичностью и безопасностью для окружающей среды, а также возможностью получения из возобновляемых источников сырья [9] делает эти биологические ПАВ более перспективными для разработки экологически безопасных биотехнологий.

В связи с перечисленными свойствами и широким применением трегалолипидов в различных областях промышленности, актуальным и востребованным представляется исследование солюбилизирующей способности их мицеллярных растворов.

Целью работы было выделение биосурфактантов гликолипидной природы, продуцируемых бактериями-деструкторами рода *Rhodococcus* углеводородов нефти, и оценка их солюбилизирующей способности в отношении гидрофобных соединений на примере *n*-гексадекана.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы *Rhodococcus erythropolis* X5 (ВКМ Ас-2532 Д) и *Rhodococcus erythropolis* S67 (ВКМ Ас-2533 Д) были получены из коллекции лаборатории биологии и плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук. Биопрепарат «МикроБак» содержит эти бактерии и используется для биоремедиации нефтезагрязненных территорий [10]. Геном *R. erythropolis* X5 депонирован в базе данных NCBI¹ под номерами доступа GenBank CP044283 и CP044284, BioSample – SAMN12818508, BioProject – PRJNA573614 и SRA – PRJNA573614 [11].

Культивирование микроорганизмов проводили в качалочных колбах в 200 мл жидкой минеральной среды Эванса [12] с добавлением *n*-гексадекана (20 г/л) (ЭКОС-1, Россия) в качестве единственного источника углерода и энергии при температуре 26°C и аэрации с частотой вращения 180 об/мин на орбитальной качалке «Excella 25» (Eppendorf, Германия) в течение 3 суток.

Выделение биосурфактантов проводили из проб культуральной жидкости методом жидкостной экстракции [13]. Разделение гликолипидных компонентов проводили с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах TLC Silica gel 60 F254 (Merck, Германия) [14].

¹ National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Дата обращения 31.07.2024. / Accessed June 31, 2024.

Общее содержание биосурфактантов определяли по концентрации углевода в пробе спектрофотометрически фенольно-серным методом [15], предварительно построив градуировочную зависимость по соответствующему углеводу — трегалозе. Для расчета концентрации трегалолипида полученное значение концентрации сахара умножали на коэффициент, равный отношению молекулярной массы гликолипида (862) к молекулярной массе трегалозы (342), который соответственно равен 2.5.

Поверхностное натяжение полученных водных растворов биосурфактантов определяли по методике [13] с использованием тензиометра Kruss K6 (Kruss, Германия). Готовили исходный водный раствор с концентрацией 250 мг/л. Методом разбавления получали серию образцов, в которых концентрации биосурфактантов находились в интервале 0–250 мг/л, измеряли поверхностное натяжение каждого раствора. КKM определяли по точке перегиба на кривых зависимостей поверхностного натяжения от концентрации.

Для установления солюбилизирующей способности биосурфактанта определяли остаточную концентрацию *n*-гексадекана в водных пробах биосурфактанта различной концентрации согласно методике [16] с нашими модификациями. Для этого в пробирку добавляли 300 мкл *n*-гексадекана и 10 мл раствора биосурфактанта соответствующей концентрации, закрывали пробкой и интенсивно встряхивали в течение 1 мин. Далее пробирки оставляли при температуре 28°C, с частотой вращения 180 об/мин на орбитальной качалке «Eppella 25» (Eppendorf, Германия) на 24 ч. Содержимое пробирок переливали в делительную воронку и оставляли на 2 ч для разделения фаз, затем отбирали в отдельную пробирку слой *n*-гексадекана. После этого в пробирки с помощью градуированной пипетки приливали 10 мл гексана, закрывали пробкой и интенсивно встряхивали в течение 1 мин. Газохроматографическое определение остаточной концентрации *n*-гексадекана, экстрагированного гексаном, проводили по методике определения содержания нефтепродуктов в природных и сточных водах газохроматографическим методом² на газовом хроматографе «Хроматэк Кристалл 5000.2» (Хроматэк, Россия) с колонкой Varian Capillary Column CP-Sil 8 CB (50 м) и пламенно-ионизационным детектором. Концентрацию гексадекана вычисляли методом абсолютной градуировки.

Эксперименты проводили в трехкратной повторности, статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 и SigmaPlot® 2011. Рассчитаны показатели среднее ± доверительный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Представители рода *Rhodococcus* являются эффективными деструкторами углеводородов нефти, легко адаптируются к экстремальным условиям окружающей среды и часто входят в состав биопрепаратов для очистки от нефтяных загрязнений³, продуцируют в среду биосурфактанты гликолипидной природы, а именно трегалолипиды. Гидрофобная природа углеводородов нефти является причиной их низкой биодоступности в процессе биодеградации. Однако образование мицеллярных растворов трегалолипидов должно способствовать ее увеличению. В настоящей работе оценили солюбилизирующую способность штаммов *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67 в отношении гидрофобного соединения, на примере *n*-гексадекана.

В результате экстракции системой полярных органических растворителей из культуральной жидкости бактерий-деструкторов углеводородов нефти *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67 были выделены биосурфактанты гликолипидной природы. Ранее было установлено, что основными биосурфактантами, продуцируемыми данными бактериями, выращенными на *n*-гексадекане, как при 26°C, так и при 10°C, являются 2,3,4-сукцинил-октаноил-деcanoил-2'-деcanoилтрегалоза и 2,3,4-сукцинил-диооктаноил-2'-деcanoилтрегалоза [13, 17].

Для подтверждения химической структуры выделенных веществ, синтезируемых исследуемыми бактериями, полученный экстракт липидов анализировали методом тонкослойной хроматографии. Для обнаружения тетраэфиров трегалозы применяли α -нафтольный реагент, который является специфическим проявителем для сахаров, позволяющий идентифицировать гликолипиды среди других липидных компонентов. Сравнивая полученные данные с литературными (табл. 1), можно отметить, что биосурфактанты родококков проявляются на хроматограммах различным количеством пятен и величинами удерживания, однако пятно, проявляющееся

² Методика выполнения измерений содержаний НП в природных и сточных водах газохроматографическим методом с пламенно-ионизационным детектором. МВИ-05-94. М.: 1994. [Methodology for measurement of oil product content in natural and waste waters by gas chromatographic method with flame ionization detector. MVI-05-94. М.: 1994.]

³ Неустроев М.М. *Экологическая оценка нефтезагрязненных мерзлотных почв и разработка способов их биоремедиации*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Якутск. 2016. [Neustroev M.M. *Ecological assessment of oil-contaminated permafrost soils and development of methods of their bioremediation*. Cand. Sci. Thesis. (Biol.). Yakutsk. 2016.]

с наибольшей интенсивностью с коэффициентом удерживания R_f 0.35–0.39, присутствует во всех хроматограммах, кроме штамма *R. erythropolis* A29-k1 и штамма *R. ruber* IEGM 231.

Таблица 1. Сравнительная характеристика значений R_f трегалолипидов различных штаммов родококков

Table 1. Comparative characteristics of the R_f values of trehalolipids of various *Rhodococcus* strains

Штамм микроорганизма Microbial strain	R_{f1}	R_{f2}	R_{f3}
<i>R. erythropolis</i> X5	0.38	0.50	0.59
<i>R. erythropolis</i> S67	0.37	0.50	–
<i>R. ruber</i> IEGM 231 [18]	0.18	0.39	0.75
<i>R. erythropolis</i> A29-k1 [19]	0.46	0.54	–
<i>R. sp.</i> 3–2 [15]	0.35	0.53	0.56

Проявленные трегалолипидные компоненты могут иметь структурные различия, однако все содержат остатки углеводов, и полученные результаты соответствуют результатам более ранних исследований [20].

Количество выделенных трегалолипидов бактерий *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67 после трех суток культивирования определяли по измерению содержания трегалозы в анализируемых образцах. Штамм X5 продуцирует биосурфактанты в большем объеме (0.31 г/л, $36 \cdot 10^{-5}$ моль/л) в отличие от штамма

S67 (0.25 г/л, $29 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Представленные результаты согласуются с данными работы Льюнг с соавторами [14], в которой содержание трегалолипидных биосурфактантов составляло около 0.3 г/л. Такое же количество трегалолипидов было получено Вайтом [21] в бесклеточном супернатанте в ходе культивирования *Rhodococcus sp.* PLM026 на подсолнечном масле при 19°C.

Одним из важных коллоидно-химических свойств ПАВ как химического, так и биологического происхождения является способность снижать поверхностное натяжение (воздух – вода). Вследствие этого эффективность биосурфактантов можно оценить, измерив поверхностное натяжение их растворов и построив графическую зависимость поверхностного натяжения от содержания биосурфактанта (рис. 1). При низких содержаниях (до 25 мг/л) наблюдается линейная зависимость, причем происходит резкое уменьшение поверхностного натяжения при увеличении содержания биосурфактанта в пределах от 30 до 35 г/л. При дальнейшем увеличении содержания биосурфактанта темпы снижения поверхностного натяжения замедляются вследствие постепенного насыщения поверхностного слоя молекулами биосурфактанта. При достижении ККМ биосурфактанты в водном растворе начинают образовывать мицеллы, и поверхностное натяжение дальше не изменяется. ККМ выделенных трегалолипидов штаммов X5 и S67 определяли по точке перегиба графической зависимости поверхностного натяжения от концентрации биосурфактанта.

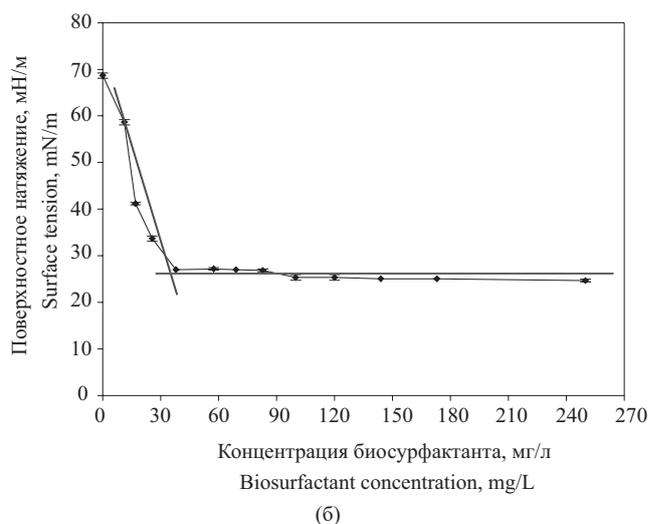
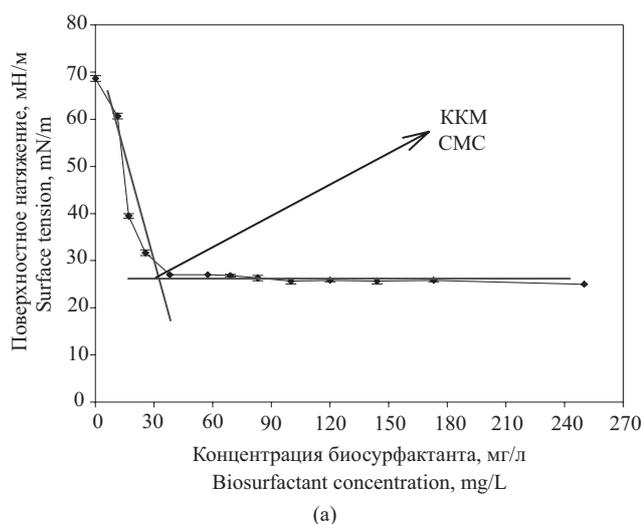


Рис. 1. Зависимость поверхностного натяжения от содержания биосурфактантов штаммов *R. erythropolis* X5 (a) и *R. erythropolis* S67 (b)

Fig. 1. Dependence of surface tension on biosurfactant content of *R. erythropolis* X5 (a) and *R. erythropolis* S67 strains (b). CMC — critical micelle concentration

Таблица 2. Характеристики биосурфактантов

Table 2. Characteristics of biosurfactants

Микроорганизм Microorganism	Биосурфактант Biosurfactant	Поверхностное натяжение, мН/м Surface tension, mN/m	ККМ, мг/л CMC, mg/L
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S6 [22]	Рамнолипиды Rhamnolipids	33.9	50.0
<i>Staphylococcus aprophyticus</i> SBPS-15 [23]	Гликолипиды (стафилозан) Glycolipids (staphylosan)	30.9	24.0
<i>Rhodococcus</i> sp. HL-6 [24]	Гликолипиды Glycolipids	30.7	40.0
<i>Rhodococcus ruber</i> IEGM 235 [25]		26.8	54.0
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43215 [25]	Трегалоллипиды Trehalolipids	26.0–32.0	4.0–15.0
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> BN38 [26]		24.4	5.0
<i>Rhodococcus qingshengii</i> FF [27]		–	85.0

При постоянном поверхностном натяжении 24.2 мН/м и 25 мН/м для *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67 соответственно значение ККМ для обоих штаммов составило 33 мг/л ($3.8 \cdot 10^{-5}$ моль/л). В табл. 2 приведены значения поверхностного натяжения и ККМ биосурфактантов, выделенных другими исследователями.

Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов (табл. 2). По эффективности к снижению поверхностного натяжения воды исследуемые трегалолипиды не уступают другим видам гликолипидов. Следует отметить преимущество выделенных трегалолипидов *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67 и перед синтетическими ПАВ. Так, например, додецилсульфат натрия (ККМ = 2.34 г/л) и Твин-80 (ККМ = 0.016 г/л) снижают поверхностное натяжение воды с 72 до 37 и 34.8 мН/м соответственно [28], в то время как природные ПАВ снижают поверхностное натяжение воды до более низких значений.

Представляло интерес оценить солюбилизирующую способность полученных трегалолипидов, позволяющую увеличить биодоступность гидрофобных загрязнителей для бактериальных клеток, повысив их гидрофильность. Процесс солюбилизации можно описать как коллоидное растворение различных веществ в мицеллах ПАВ, поэтому для определения солюбилизирующей способности трегалолипидов использовали растворы с содержанием трегалолипидов, кратным ККМ.

Количественно солюбилизацию характеризуют при помощи молярной солюбилизирующей способности (S_m), представляющей собой отношение количества молей солюбилизата (*n*-гексадекана) к количеству молей солюбилизатора (трегалоллипид):

$$S_m = \frac{C_1}{C_2}, \quad (1)$$

где C_1 — концентрация солюбилизата, моль/л, C_2 — концентрация солюбилизатора, моль/л.

С ростом концентрации мицеллярных растворов трегалолипида количество солюбилизированного *n*-гексадекана закономерно увеличивалось в диапазоне содержаний трегалолипида выше ККМ, что указывает на солюбилизацию гидрофобного соединения в мицеллах ПАВ. Через 24 ч средняя молярная солюбилизация *n*-гексадекана в водном растворе биосурфактанта штамма X5 составила 4.3 моль *n*-гексадекана/моль трегалолипида. Изотерма солюбилизации имеет линейный характер при концентрации трегалолипида выше ККМ, что свидетельствует о постоянной форме мицелл (рис. 2).

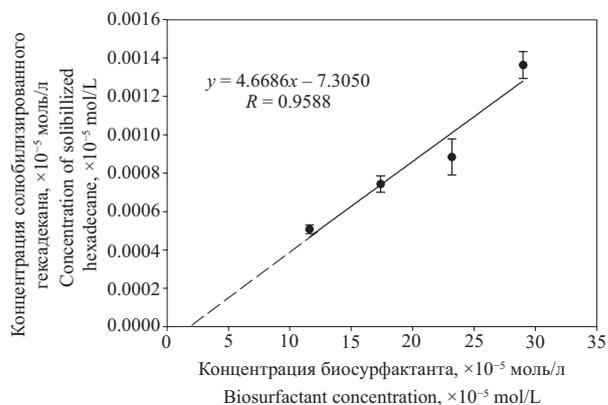


Рис. 2. Изотерма солюбилизации *n*-гексадекана мицеллами трегалолипида

Fig. 2. Solubilization isotherm of *n*-hexadecane by trehalolipid micelles

Изотермы солубилизации позволяют определить значения ККМ, для чего изотермы солубилизации необходимо экстраполировать до оси концентраций. Отрезки, отсекаемые на оси концентраций, дают искомые значения ККМ [28]. Согласно рис. 2 значение ККМ трегалолипидного биосурфактанта, продуцируемого штаммом *R. erythropolis* X5, составляет $2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Данное значение немного отличается от значения ККМ, найденного по изотерме поверхностного натяжения ($3.8 \cdot 10^{-5}$ моль/л), что может быть связано с ошибкой метода определения солубилизирующей способности биосурфактантов.

Представленная изотерма солубилизации позволяет также определить молярный коэффициент солубилизации (molar solubilization ratio, MSR) как тангенс угла наклона данной прямой (рис. 2). MSR — это количество солубilizата (*n*-гексадекана), которое может быть солубилизировано одним молем мицеллярного раствора трегалолипида и характеризует в целом способность ПАВ солубилизовать *n*-гексадекан.

В качестве параметра взаимодействия между солубилизатом и трегалолипидом рассматривают константу связывания или молярный коэффициент распределения, который рассчитывали по формуле:

$$K_m = \frac{MSR}{S_{KKM} V_B (1 + MSR)}, \quad (2)$$

где MSR — молярный коэффициент солубилизации (моль/моль), S_{KKM} — растворимость *n*-гексадекана при ККМ, V_B — молярный объем воды, $V_B = 0.01805$ дм³/моль при 298 К.

Для лучшего понимания механизма солубилизации необходимо знание термодинамических параметров. С точки зрения термодинамики солубилизация может рассматриваться как распределение *n*-гексадекана между мицеллярной и водной фазами. Свободная энергия солубилизации рассчитывается на основе уравнения:

$$\Delta G_S^0 = R \cdot T \cdot \left(\ln \frac{KKM}{mol_B} \right), \quad (3)$$

где ΔG_S^0 — свободная энергия солубилизации, кДж/моль; R — газовая постоянная, $R = 8.31$ Дж/моль·К; T — температура, К; mol_B — молярность растворителя (воды), $mol_B = 55.5$.

Для описания солубилизирующей способности ПАВ определяют в основном величины MSR и ККМ. Определение величин коэффициента распределения мицелла–вода (K_m) и энергии солубилизации (ΔG_S^0) в научно-исследовательских работах применяется реже. Среди гликолипидных биосурфактантов (табл. 3)

Таблица 3. Сравнительная таблица полученных и литературных данных физико-химических характеристик солубилизации различных по природе веществ

Table 3. Comparative table of data (obtained and from literature) of the physicochemical characteristics of solubilization of different substances by nature

ПАВ Surfactant	Солубилизат Solubilize	MSR, моль/моль MSR, mol/mol	ΔG_S^0 , кДж/моль ΔG_S^0 , kJ/mol	$\lg K_m$	Ссылка Reference
Трегалоллипиды Trehalolipids	Гексадекан Hexadecane	4.7	−35.5	1.065	Данная работа This work
Монорамнолипиды Monorhamnolipids		0.89	–	8.25	[33]
Дирамнолипиды Diramnolipids		3.8	–	–	
Додецилсульфат натрия Sodiumdodecylsulfate	Гексадекан Hexadecane	0.018	−54.5	–	[29]
	Перхлорэтилен Perchloroethylene	0.16	–	–	[30]
Твин-80 Twin-80	Гексадекан Hexadecane	15.1	−64.4	–	[29]
	Гексахлорэтан Hexachloroethane	0.15	–	–	[31]
Тритон X-100 Triton X-100	Гексадекан Hexadecane	40	−64.6	–	[29]
	Гексахлорбутадие Hexachlorobutadiene	1.22	–	–	[31]

выделенные трегалолипиды эффективней солюбилизируют *n*-гексадекан в водных растворах, однако уступают синтетическим ПАВ, а именно ПАВ неионногенной природы (Твин-80 и Тритон X-100). В работах [29–31] показана разница в солюбилизирующей способности разных по химической структуре синтетических ПАВ по отношению к *n*-гексадекану и хлор-производным углеводородам. Для неионногенных ПАВ солюбилизирующая способность *n*-гексадекана выше, чем хлор-производных веществ. Для додецилсульфата натрия, ПАВ ионногенной природы, отмечается более низкая способность к солюбилизации *n*-гексадекана и хлор-производных. Таким образом, значение молярной солюбилизирующей способности может отличаться в зависимости от химической структуры самого солюбилизатора (ПАВ) и солюбилизируемого вещества. В работе [31] продемонстрировали, что растворимость нафталина, фенантрена и пирена линейно возрастала с повышением концентрации рамнолипидного биосурфактанта бактерий рода *Bacillus*. Кроме того, значения молярного коэффициента солюбилизации уменьшались в ряду: нафталин > фенантрен > пирен.

Для изученной нами системы величина свободной энергии имеет отрицательное значение ($\Delta G_S^0 = -35.5$ кДж/моль), что указывает на самопроизвольно протекающий процесс солюбилизации. В работе [34] показано, что процессы солюбилизации азотсодержащих гетероциклических веществ (анилина, индола, хинолона), ПАВ химического (додецилсульфата натрия (Твин-80, Span 20 и TX-100)) и биологического (рамнолипид) происхождения являются спонтанными ($\Delta G_S^0 \leq 0$). Значение свободной энергии солюбилизации для рамнолипида заметно ниже, чем для синтетических ПАВ, что доказывает лучшую солюбилизирующую способность рамнолипида и согласуется с нашими данными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для трегалолипидов родококков продемонстрировано их солюбилизирующее действие в отношении гидрофобного *n*-гексадекана с помощью следующих физико-химических величин: молярной солюбилизирующей способности, молярного коэффициента

солюбилизации, коэффициента распределения мицелла–вода и энергии солюбилизации. На основании величины молярного коэффициента солюбилизации можно сделать вывод, что трегалолипиды штамма *R. erythropolis* X5 в большей степени солюбилизируют *n*-гексадекан в водных растворах по сравнению с другими биосурфактантами гликолипидной природы, однако уступают синтетическим ПАВ.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания № FEWG-2024-0003 «Биокаталитические системы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами».

Acknowledgments

This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the government assignment No. FEWG-2024-0003 “Biocatalytic systems based on microorganism cells, subcellular structures, and enzymes in combination with nanomaterials.”

Вклад авторов

И.А. Нечаева — постановка цели работы, методология исследования, написание текста статьи.

А.С. Парфенова — планирование и проведение экспериментов, обработка экспериментальных данных, обсуждение полученных результатов.

А.С. Филиппова — проведение экспериментов, обработка экспериментальных данных.

А.Е. Филонов — научное консультирование, корректировка содержания статьи.

Authors' contributions

I.A. Nechaeva — formulating the research objectives and methodology, and writing the text of the article.

A.S. Parfenova — planning and conducting experiments, processing experimental data, and discussion of the results.

A.S. Filippova — conducting experiments, processing experimental data.

A.E. Filonov — scientific consulting, editing the article.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Alizadeh-Sani M., Hamishehkar H., Khezerlou A., Azizi-Lalabadi M., Azadi Y., Nattagh-Eshtivani E. Bioemulsifiers Derived from Microorganisms: Applications in the Drug and Food Industry. *Adv. Pharm. Bull.* 2018;8(2):191–199. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.023>
2. Adu S.A., Naughton P.J., Marchant R., Banat I.M. Microbial Biosurfactants in Cosmetic and Personal Skincare Pharmaceutical Formulations. *Pharmaceutics*. 2020;12(11):1099. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111099>
3. Fenibo E.O., Ijoma G.N., Selvarajan R., Chikere C.B. Microbial Surfactants: The Next Generation Multifunctional Biomolecules for Applications in the Petroleum Industry and Its Associated Environmental Remediation. *Microorganisms*. 2019;7(11):581. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110581>
4. Pasternak G., Askitosari T.D., Rosenbaum M.A. Biosurfactants and Synthetic Surfactants in Bioelectrochemical Systems: A Mini-Review. *Front. Microbiol.* 2020;11:358. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00358>
5. Kumar A., Singh S.K., Kant C., Verma H., Kumar D., Singh P.P., et al. Microbial Biosurfactant: A New Frontier for Sustainable Agriculture and Pharmaceutical Industries. *Antioxidants*. 2021;10(9):1472. <https://doi.org/10.3390/antiox10091472>
6. Gouthami K., Mallikarjunaswamy A.M.M., Bhargava R.N., Ferreira L.F.R., Rahdar A., Saratale G.D., Bankole P.O., Mulla S.I. Microbial Biodegradation and Biotransformation of Petroleum Hydrocarbons: Progress, Prospects, and Challenges. In: *Genomics Approach to Bioremediation. Genomics Approach to Bioremediation: Principles, Tools, and Emerging Technologies*. 2023. P. 229–247. <https://doi.org/10.1002/9781119852131.ch13>
7. Eras-Muñoz E., Farré A., Sánchez A., Font X., Gea T. Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. *Bioengineered*. 2022;13(5):12365–12391. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>
8. Claus S., Jenkins Sánchez L., Van Bogaert I.N.A. The role of transport proteins in the production of microbial glycolipid biosurfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2021;105(5):1779–1793. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11156-7>
9. Sobrinho H.B.S., Luna J.M., Rufino R.D., Porto A.L.F., Sarubbo L.A. Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications. In: *Recent Developments in Biotechnology*. 1st ed. Houston, USA: Studium Press LLC; 2013. P. 303–330.
10. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Самойленко В.А., Шкидченко А.Н. и др. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения: пат. РФ № 2378060. Заявка № 200712540313; заявл. 05.07.2007; опубл. 10.01.2010. [Filonov A.E., Kosheleva I.A., Samoilenko V.A., Shkidchenko A.N., et al. *Biological preparation for cleaning of soils from contaminations with oil and oil products, method of its production and application*: RU Pat. 2378060. Publ. 10.01.2010 (in Russ.).]
11. Delegan Y., Valentovich L., Petrikov K., Vetrova A., Akhremchuk A., Akimov V. Complete Genome Sequence of *Rhodococcus erythropolis* X5, a Psychrotrophic Hydrocarbon-Degrading Biosurfactant-Producing Bacterium. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019;8(48). <https://doi.org/10.1128/mra.01234-19>
12. Каримова В.Т., Дмитриевна Е.Д., Нечаева И.А. Влияние гуминовых веществ торфов Тульской области на рост микроорганизмов деструкторов нефти *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5. *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки*. 2017;2:60–68.
- [Karimova V.T., Dmitrieva E.D., Nechaeva I.A. The effect of humic substances from different origin peats of the Tula region on the growth of microbial degraders of oil *Rhodococcus erythropolis* S67 and *Rhodococcus erythropolis* X5. *Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki = News of the Tula State University. Natural Sciences*. 2017;2:60–68 (in Russ.).]
13. Luong T.M., Ponamoreva O.N., Nechaeva I.A., Petrikov K.V., Delegan Ya.A., Surin A.K., Linklater D., Filonov A.E. Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at low temperature. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018;34(2):20. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2401-8>
14. Лыонг Т.М., Нечаева И.А., Петриков К.В., Пунтус И.Ф., Понаморева О.Н. Бактерии-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus* – потенциальные продуценты биосурфактантов. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2016;6(1–16):50–60. [Lyuong T.M., Nechaeva I.A., Petrikov K.V., Puntus I.F., Ponamoreva O.N. Oil-degrading microorganisms of genus *Rhodococcus* – potential producers of biosurfactants. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2016;6(1–16):50–60 (in Russ.).]
15. Леонова Т.И., Акатова Е.В., Пунтус И.Ф. Выделение гликолипидных биосурфактантов, продуцируемых бактериями *Rhodococcus* sp. 3-2, методом экстракции. *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки*. 2021;(2):33–41. <https://doi.org/10.24412/2071-6176-2021-2-33-41> [Leonova T.I., Akatova E.V., Puntus I.F. Isolation of glycolipid biosurfactants produced by bacteria *Rhodococcus* sp. 3-2 by extraction method. *Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki = News of the Tula State University. Natural Sciences*. 2021;(2):33–41 (in Russ.). <https://doi.org/10.24412/2071-6176-2021-2-33-41>]
16. Yang X., Tan F., Zhong H., Liu G., Ahmad Z., Liang Q. Sub-CMC solubilization of *n*-alkanes by rhamnolipid biosurfactant: the Influence of rhamnolipid molecular structure. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2020;192:111049. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111049>
17. Лыонг 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*. 2017;7(2–21):72–79. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-2-72-79> [Lyuong T.M., Nechaeva I.A., Petrikov K.V., Filonov A.E., Ponamoreva O.N. Structure and physicochemical properties of glycolipid biosurfactants, produced by oil-degrading bacteria *Rhodococcus* sp. X5. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(2–21):72–79 (in Russ.). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-2-72-79>]
18. 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. *J. Microbiol. Methods*. 2001;46(2):149–156. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00259-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00259-7)
19. Ratnikava M.S., Charniauskaya M.I., Bukliarevich N.A., Myamin U.Y., Meloni F., Lussu R., Titok M.A. *Rhodococcus erythropolis* strain A29-K1 – an effective producer of surface active compounds. In: *Biotechnology of Microorganisms: Proc. International Scientific-Practical Conference*. 2019. P. 163–165.

20. Petrikov K., Delegan Y., Surin A., Ponamoreva O., Puntus I., Filonov A., Boronin A. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: formation and structure. *Process Biochem.* 2013; 48(5–6):931–935. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.008>
21. White D.A., Hird L.C., Ali S.T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. *J. Appl. Microbiol.* 2013;115(3):744–755. <https://doi.org/10.1111/jam.12287>
22. Yin H., Qiang J., Jia Y., Ye J., Peng H., Qin H., Zhang N., He B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochem.* 2009;44(3):302–308. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.11.003>
23. Balan S.S., Mani P., Kumar C.G., Jayalakshmi S. Structural characterization and biological evaluation of Staphylosan (dimannooleate), a new glycolipid surfactant produced by a marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS-15. *Enzyme Microb. Technol.* 2019;120:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.09.008>
24. Tian Z.J., Chen L.Y., Li D.H., Pang H.Y., Wu S., Liu J.B., Huang L. Characterization of a Biosurfactant-producing Strain *Rhodococcus* sp. HL-6. *Romanian Biotechnol. Lett.* 2016;21(4):11650–11659.
25. Philp J.C.M.S., Kuyukina M., Ivshina I., Dunbar S., Christofi N., Lang S., Wray V. Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002;59(2):318–324. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1018-4>
26. Tuleva B., Cohen R., Stoev G., Stoineva I. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain. *J. Appl. Microbiol.* 2008;104(6):1703–1710. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03680.x>
27. 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.* 2019;127(5):1442–1453. <https://doi.org/10.1111/jam.14390>
28. Дремук А.П., Киенская К.И., Авраменко Г.В., Назаров В.В., Белова И.А. Особенности солюбилизирующего действия растворов бинарных и тройных смесей поверхностно-активных веществ на основе алкилполиглюкозида. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2017;7(1): 49–55. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-50-56>
- [Dremuk A.P., Kienskaya K.I., Avramenko G.V., Nazarov V.V., Belova I.A. Features of the solubilization action of the binary and ternary surfactant mixtures based on alkyl glucoside. *Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2017;7(1):49–55 (in Russ.). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-50-56>
29. Заруева Е.С., Нечаева И.А., Понаморева О.Н. Солюбилизация *n*-гексадекана в минеральной водной среде в присутствии поверхностно-активных веществ. *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки.* 2020;(1):3–12. [Zarueva E.S., Nechaeva I.A., Ponamoreva O.N. Solubilization of *n*-hexadecane in a mineral medium with surfactants. *Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki = News of the Tula State University. Natural Sciences.* 2020;(1):3–12 (in Russ.).]
30. Harendra S., Vipulanandan C. Effects of surfactants on solubilization of perchloroethylene (PCE) and trichloroethylene (TCE). *Ind. Eng. Chem. Res.* 2011;50(9):5831–5837. <https://doi.org/10.1021/ie102589e>
31. Rodrigues R., Betelu S., Colombano S., Masselot G., Tzedakis T., Ignatiadis I. Influence of temperature and surfactants on the solubilization of hexachlorobutadiene and hexachloroethane. *J. Chem. Eng. Data.* 2017;62(10): 3252–3260. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.7b00320>
32. Li S., Pi Y., Bao M., Zhang C., Zhao D., Li Y., Sun P., Lu J. Effect of rhamnolipid biosurfactant on solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollut. Bull.* 2015;101(1):219–225. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.059>
33. Zhong H., Liu Y., Liu Z., Jiang Y., Tan F., Zeng G., Yuan X., Yan M., Niu Q., Liang Y. Degradation of pseudo-solubilized and mass hexadecane by a *Pseudomonas aeruginosa* with treatment of rhamnolipid biosurfactant. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 2014;94:152–159. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.012>
34. Yang Z., Cui J., Yin B. Solubilization of Nitrogen Heterocyclic Compounds Using Different Surfactants. *Water, Air, Soil Pollut.* 2018;229(9):304. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3917-8>

Об авторах

Нечаева Ирина Александровна, к.б.н., доцент, доцент кафедры биотехнологии, Естественно-научный институт, ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет» (300012, Россия, Тула, пр-т Ленина, д. 92). E-mail: nechaeva1902@gmail.com. Scopus Author ID 22958438500, ResearcherID ABF-1379-2020, SPIN-код РИНЦ 5627-7670, <https://orcid.org/0000-0003-2736-080X>

Парфенова Анастасия Сергеевна, магистрант кафедры биотехнологии, Естественно-научный институт, ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет» (300012, Россия, Тула, пр-т Ленина, д. 92). E-mail: asya17.parfenoa@mail.ru. SPIN-код РИНЦ 3154-4258, <https://orcid.org/0000-0002-4894-4591>

Филиппова Анастасия Сергеевна, младший научный сотрудник, лаборатория экологической и медицинской биотехнологии БиоХимТехЦентра; магистрант кафедры биотехнологии, Естественнонаучный институт, ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет» (300012, Россия, Тула, пр-т Ленина, д. 92). E-mail: stasya.filippova.01@gmail.com. SPIN-код РИНЦ 6966-6230, <https://orcid.org/0000-0002-4894-4591>

Филонов Андрей Евгеньевич, д.б.н., профессор кафедры биотехнологии, Естественно-научный институт, ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет» (300012, Россия, Тула, пр-т Ленина, д. 92); ведущий научный сотрудник лаборатории биологии плазмид, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Российская академия наук (ИБФМ РАН) – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (142290, Россия, Пушкино, пр-т Науки, д. 5). E-mail: filonov.andrey@rambler.ru. Scopus Author ID 35608598500, ResearcherID E-8335-2014, SPIN-код РИНЦ 2615-4487, <https://orcid.org/0000-0003-4800-7706>

About the authors

Irina A. Nechaeva, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Biotechnology Department, Institute of Natural Science, Tula State University (92, Lenina pr., Tula, 300012, Russia). E-mail: nechaeva1902@gmail.com. Scopus Author ID 22958438500, ResearcherID ABF-1379-2020, RSCI SPIN-code 5627-7670, <https://orcid.org/0000-0003-2736-080X>

Anastasia S. Parfenova, Master Student, Biotechnology Department, Institute of Natural Science, Tula State University (92, Lenina pr., Tula, 300012, Russia). E-mail: asya17.parfenova@mail.ru. RSCI SPIN-code 3154-4258, <https://orcid.org/0000-0002-4894-4591>

Anastasia S. Filippova, Junior Researcher, Laboratory of Environmental and Medical Biotechnology, BioChemTechCenter; Master Student, Biotechnology Department, Institute of Natural Science, Tula State University (92, Lenina pr., Tula, 300012, Russia). E-mail: stasya.filippova.01@gmail.com. RSCI SPIN-code 6966-6230.

Andrey E. Filonov, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Biotechnology Department, Institute of Natural Science, Tula State University (92, Lenina pr., Tula, 300012, Russia); Leading Researcher, Laboratory of Plasmid Biology, Pushchino Scientific Center for Biological Research, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences (5, Nauki pr., Pushchino, Moscow oblast, 142290, Russia). E-mail: filonov.andrey@rambler.ru. Scopus Author ID 35608598500, ResearcherID E-8335-2014, RSCI SPIN-code 2615-4487, <https://orcid.org/0000-0003-4800-7706>