

PROSPECTS OF USING MIXTURE SUBSTRATES IN BIOTECHNOLOGY

N. Kudrya, K. Beregova

National University of Food Technologies

Key words:

*Mixed substrates
intensification of
biosynthesis
Biodegradation of
xenobiotics
Surfactants*

Article history:

Received 28.06.2014
Received in revised form
05.07.2014
Accepted 18.07.2014

Corresponding author:

N. Kudrya

E-mail:

npnuht@ukr.net

ABSTRACT

This article summarizes the published data of recent years on the use of mixed substrates by microorganisms. Special attention is paid to improving the biodegradation of xenobiotics (fenatren, benzene, nitrobenzene, toluene, buprofezin, dimethoate, etc.) by making additional substrate. Thus, when putting starch in the culture medium of *Pseudomonas* sp. DFS35-4, the degree of buprofezin destruction reached 75 %; when adding glucose, the amount of observed degradation of sulfamethoxazole and *Rhodococcus rhodochrous* 13808 sulfamethizole increased. The literary data on the impact of cultivation conditions (including natural carbon sources and their concentrations in the mixture) on the synthesis of secondary metabolites having practical value (clavulanic acid, 1,3-propanediol and ethanol) and on biomass is presented in the article.

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ СУМІШІ СУБСТРАТІВ У БІОТЕХНОЛОГІЇ

Н.В.Кудря, Х.А.Берегова

Національний університет харчових технологій

У статті узагальнено літературні дані останніх років про використання мікроорганізмами змішаних субстратів. Значну увагу приділено підвищенню ефективності біодеградації ксенобіотиків мікроорганізмами (фенатрен, бензол, нітробензол, толуол, бупрофезін, диметоат та ін.) за наявності додаткового субстрату (глюкоза, фруктоза, сахароза, цитрат натрію). Так, за внесення крохмалю в середовищі культивування *Pseudomonas* sp. DFS35-4 ступінь деструкції бупрофезину становив 75 %, а за наявності глюкози спостерігалось підвищення ступеня деструкції сульфаметаксазолу та сульфаметіазолу *Rhodococcus rhodochrous* 13808. Наведено літературні дані про вплив умов культивування (зокрема природи джерел вуглецю та їх концентрації у суміші) на синтез практично цінних вторинних метаболітів (клавуланова кислота, 1,3-пропандіол, біоетанол) і біомаси.

Ключові слова: змішані субстрати, біодеградація ксенобіотиків, лігноцелюлоза, інтенсифікація синтезу, поверхнево-активні речовини.

У 2013 р. було опубліковано огляд [22] про використання суміші субстратів для інтенсифікації технологій мікробного синтезу продуктів бродіння (етанол, молочна кислота, бутандіол), первинних (амінокислоти, *n*-гідроксибензоат, тригліцериди) і вторинних (ловастатин, поверхнево-активні речовини) метаболітів, а також біодеградації ксенобіотиків ароматичної природи (бензол, крезол, феноли, толуол).

Розглянуто стратегії виживання гетеротрофних мікроорганізмів у природних оліготрофних середовищах, зокрема одночасне використання кількох субстратів, завдяки чому поліпшуються кінетичні характеристики, що надає їм конкурентної переваги, а також забезпечується значна метаболічна/фізіологічна гнучкість.

На даний час великою проблемою є забруднення довкілля через накопичення великої кількості різних за складом, фізико-хімічними властивостями і концентрацією забруднюючих речовин. Наявність ксенобіотиків у навколишньому середовищі є наслідком їх нецільового використання, недосконалої технологій промислового виробництва багатьох речовин та очисних систем, що призводить до порушення екосистеми і може викликати екологічну кризу [17]. Забруднення в екосистемах найчастіше мають комплексний характер, тому актуальним є пошук таких методів очищення, які б дали змогу видаляти такі комбіновані шкідливі речовини.

Поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) — це речовини, що містять два або більше конденсованих кілець бензолу, можуть бути як природного, так і антропогенного походження [2]. ПАВ через свою токсичну, канцерогенну та мутагенну дію є дуже шкідливими і становлять значну екологічну загрозу [2, 10]. Відносно новою технологією є видалення забруднень із використанням ПАВ-утилізуючих мікроорганізмів [17].

Використання додаткового джерела вуглецю для біодеградації ксенобіотиків

На сьогодні відомо багато мікроорганізмів, здатних до деструкції різноманітних відходів і поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ), наприклад, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Rhodococcus* spp., *Paenibacillus* spp. та ін. [10]. Швидкість деградації забруднюючих речовин залежить від їх концентрації, умов навколишнього середовища (рН, температура, кисень) і типів наявних мікроорганізмів. Повільне руйнування ПАВ у ґрунті пов'язане з повільною їх десорбцією з частинок ґрунту, а не з низькою швидкістю засвоєння мікроорганізмами. Поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження можуть підвищити біодоступність ПАВ і метаболічний потенціал мікробної спільноти, що бере участь у їх деградації [10]. Так, за допомогою ПАР *Pseudomonas aeruginosa* SP4 можна збільшити концентрацію ПАВ у водній фазі, а внесення додаткового джерела вуглецю (наприклад, глюкози) або використання суміші забруднюючих речовин дає змогу підвищити швидкість деградації ПАВ через стимуляцію росту мікроорганізмів, відповідальних за їх деструкцію. Встановлено, що за наявності нафталіну у середовищі культивування *Pseudomonas putida* KBM-1 підвищувався ступінь деструкції фенантрени у 5 разів, пірену — у 2 рази. Проте варто відмітити, що інші

дослідження показали протилежний ефект: розкладання антрацену *Rhodococcus* sp. та деградація пірену *Mycobacterium flavescens* інгібувалось наявністю флуорантену в середовищі культивування мікроорганізмів [10].

Нітробензол — токсична нітроароматична сполука, яка найчастіше зустрічається у середовищі з такими сполуками, як анілін і фенол, тому актуальним є пошук методів очищення навколишнього середовища від комплексу цих речовин. Бактеріям *Pseudomonas* sp. АЗ притаманна здатність до розкладу більше 80 % нітробензолу, фенолу, аніліну (концентрація у середовищі по 100 мг/л) та інших ароматичних сполук. При дослідженні деструкції суміші нітробензолу, аніліну та фенолу вільними та іммобілізованими клітинами [18] встановлено, що штам АЗ може одночасно споживати 300 мг/л нітробензолу, 50 мг/л аніліну та 100 мг/л фенолу протягом 20 год, тоді як іммобілізовані клітини здійснювали цей процес всього за 10 год. Лаг-фаза для іммобілізованих клітин була коротшою, ніж для вільних. При підвищенні концентрації аніліну і фенолу до 150 мг/л деградація нітробензолу вільними клітинами інгібувалась, за таких умов протягом 20 год ступіть деструкції нітробензолу становив менше 50 %. Для порівняння, іммобілізовані клітини ефективно руйнують нітробензол протягом 10 год, навіть при підвищенні концентрації аніліну і фенолу до 150 мг/л.

Слід зазначити, що порівняно з іншими субстратами, які знаходились у суміші, найвища швидкість деградації спостерігалась для нітробензолу [18]. Деструкція аніліну і фенолу також відбувалась ефективно, проте анілін розкладався повільніше. Таке явище може пояснюватись наведеними причинами: по-перше, анілін є більш токсичним, а по-друге, він є проміжним метаболітом деградації нітробензолу штамом АЗ. Таким чином, невелика кількість аніліну може безперервно накопичуватись в середовищі під час використання нітробензолу. Іммобілізовані клітини можуть здійснювати деградацію 200, 400 і 600 мг/л нітробензолу протягом 5 год, 9—10 год і 13—14 год відповідно. Наведені результати показують можливість використання іммобілізованих клітин *Pseudomonas* sp. АЗ для очищення стічних вод від нітробензолу у суміші з іншими ароматичними сполуками [18].

Для вивчення впливу додаткового субстрату на деградацію ароматичних сполук було обрано *Ralstonia pickettii* РКО1 як модельний організм [4]. Штам РКО1 здатний використовувати бензол, толуол, фенол і *m*-крезол як єдине джерело вуглецю й енергії. Початковий етап метаболізму бензолу у *R. pickettii* РКО1 включає його гідроксилування у фенол, який потім додатково гідроксилується до катехіну до розриву кільця в мета-положенні діоксигеназою. На першому етапі *R. pickettii* РКО1 (попередньо вирощений на середовищі з сукцинатом) культивували з сумішшю бензолу і толуолу при початковій концентрації 1 мМ кожного, при цьому спостерігалась деградація обох субстратів одночасно [4]. Варто зазначити, що швидкість росту біомаси, за використання суміші бензолу і толуолу, підтримувалась постійно під час експоненційної фази росту і становила 0,25 год⁻¹ порівняно з показниками росту *R. pickettii* РКО1 на відповідних моносубстратах. За вирощування штаму РКО1 на суміші сукцинату і бензолу (1 мМ кожен) спостерігалось явище діауксії: при цьому протягом перших 3—4 год (лаг-фаза) не спосте-

рігалося підвищення рівня біомаси. Однак деструкція бензолу починалась під час лаг-фази, що супроводжувалось накопиченням фенолу. Після культивування не було знайдено проміжних продуктів метаболізму бензолу, що свідчить про повне споживання субстрату [4].

При періодичному культивуванні *R. pickettii* РК01 з використанням бензолу як єдиного джерела вуглецю максимальна швидкість росту становила $0,18 \text{ год}^{-1}$, тоді як додавання сукцинату підвищило швидкість росту до $0,5 \text{ год}^{-1}$. За надлишку сукцинату у суміші спостерігався діаоксичний ріст, тоді як при хемостатному культивуванні споживання кожного монособстрату в суміші відбувалося одночасно. З наведених даних можна зробити висновок, що використання сукцинату як додаткового джерела вуглецю штамом РК01 є перспективним напрямком для інтенсифікації утилізації суміші ароматичних сполук [4].

Деструкція бупрофезіну (інсектицид) відбувається за рахунок ґрунтових мікроорганізмів, проте чистих культур, що розкладають цю речовину, не було знайдено, тому пізніше [5] зі зразка ґрунту, забрудненого бупрофезіном, був виділений штам *Pseudomonas* sp. DFS35-4. Ефективність деструкції інсектициду штамом DFS35-4 залежить від додаткових джерел вуглецю (цитрату натрію, крохмалю, ацетату натрію, галактози, мальтози, сахарози) [5]. Найвищий ступінь деструкції бупрофезіну штамом DFS35-4 (50 мг/л) спостерігався за використання додаткового джерела вуглецю — цитрату натрію з концентрацією 2 г/л і становив 80% через 3 доби експерименту. Ступінь деструкції бупрофезіну за використання крохмалю становив 75% , ацетату натрію — 65% , галактози та сахарози — 42% , а мальтози і глюкози — 26% (по 2 г/л кожного) [5]. Варто зазначити, що *Pseudomonas* sp. DFS35-4 найефективніше одночасно метаболізує суміш бупрофезіну та цитрату натрію, при цьому процес деструкції відбувається за широкого діапазону концентрацій, а також за високих значень рН і температур. Наведені результати підтверджують, що використання додаткового субстрату для біоремедіації бупрофезін-забруднених ділянок за допомогою *Pseudomonas* sp. DFS35-4 [5] є перспективним.

Відомо, що наявність додаткового джерела вуглецю в середовищі існування таких мікроорганізмів може прискорити руйнування пестицидів. Так, високий рівень деструкції диметон-S-метилу (пестицид) спостерігався за додаткового внесення фруктози у середовище *Corynebacterium glutamicum* [12]. Із зразків ґрунту, що містили різні концентрації диметоату ($5\text{—}200 \text{ мг/г}$), були виділені бактерії, ідентифіковані на основі послідовності гена 16S рРНК як *Raoultella* sp. Після трьох послідовних пересівів, методом накопичувальних культур, серед отриманих окремих колоній для подальшої ідентифікації й характеристики було обрано штам X1, що витримував найвищу концентрацію диметоату (8 г/л) [12]. На наступному етапі досліджували ефект різних додаткових субстратів на деградацію диметоату *Raoultella* sp. X1, до яких відносилися крохмаль, метіонін, треонін, сорбіт, маніт, глюкоза, сахароза, галактоза, трегалоза, піровиноградна кислота, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, цитрат натрію, кетоглутарова кислота, янтарна кислота, яблучна кислота. Експерименти показали, що штам X1 не здатний до використання крохмалю, метіоніну і треоніну як додаткового джерела вуглецю, у той час як цукри, цукрові спирти та піруват споживалися

Raoultella sp. X1, проте не сприяли деструкції диметоату. Встановлено, що асиміляція диметоату штамом X1 відбувалась з використанням таких додаткових субстратів, як аспартат, глутамат натрію, цитрат натрію, сукцинат і малат, а максимальні показники деградації становили 43—47 % [12].

Як додаткове джерело вуглецю було обрано цитрат натрію через низьку вартість сировини. Висловлено припущення, що неоптимальні концентрації компонентів середовища можуть значно впливати на процес деградації, тому на наступному етапі досліджували вплив різних концентрацій джерел вуглецю, азоту та фосфору на споживання суміші диметоату з цитратом натрію. Встановлено, що максимальний ступінь деградації пестициду (75 %) спостерігався за таких концентрацій компонентів середовища: 1,30% — цитрат натрію, 0,06% — нітрат натрію, 0,12% — одноосновний фосфат калію [12].

Фармацевтична промисловість передбачає використання широкого спектра хімічних речовин з різною структурою і функціями, при цьому більшість із них, потрапляючи в навколишнє середовище, негативно впливають на флору і фауну [9]. Більшість досліджень з біодеградації лікарських речовин ґрунтується на видаленні цих сполук за допомогою активного мулу. Проте досліджено, що мікроорганізми, здатні до біодеградації цих фармацевтичних сполук, швидше ростуть на більш простих джерелах вуглецю. Для чистоти експерименту були створені умови, близькі до природних, де кількість забруднюючих речовин значно нижча порівняно з концентрацією звичайного субстрату, також у середовище культивування додатково вносили глюкозу (3 г/л) як додаткове джерело вуглецю [9]. Для дослідження використовували такі сполуки: карбамазепін (9,5 ppm), сульфаметізол (43,4 ppm), сульфаметоксазол (31,6 ppm), метропролол (107,8 ppm), а також мікроорганізми-деструктори — *Rhodococcus rhodochrous* 13808, *Pseudomonas putida* 12633, *Pseudomonas fluorescens* 13525, *Bacillus subtilis* 6051, *Aspergillus niger* 16888 і *Sphingomonas herbicidovorans* 700291 [9].

Встановлено, що *S. herbicidovorans* 700291, *B. subtilis* 6051, *P. fluorescens* 13525 не здатні до руйнування карбамазепіну. Проте у разі вирощування *A. niger* 16888 концентрація карбамазепіну швидко знижувалась протягом 5—10 діб порівняно з *R. rhodochrous* 13808, де спостерігали зменшення кількості карбамазепіну на 15 добу. Варто зазначити, що жоден з обраних мікроорганізмів не був здатний до росту в середовищі із забруднюючими речовинами без додаткового джерела вуглецю [9]. Також було встановлено, що метропролол не піддається деструкції всіма мікроорганізмами, які використовувалися. За умов росту штаму 13808 на суміші сульфаметіазолу з глюкозою його деструкція була помітно вища порівняно з використанням сульфаметаксазолу і глюкози, незважаючи на подібність цих сполук. Таке явище може пояснюватись відмінними продуктами метаболізму субстратів, що знаходились у культуральній рідині [9].

Синтез різноманітних практично-цінних метаболітів на змішаних субстратах

Підвищення ефективності технологій біосинтезу різноманітних продуктів є важливим напрямком у дослідженнях сьогодення, і одним із підходів до інтенсифікації процесу є використання дешевих ростових субстратів, наприклад,

відходів виробництв [1]. Таким субстратом може бути технічний гліцерин, оскільки він утворюється у великих кількостях при виробництві біодизелю. Враховуючи обсяги виробництва біодизелю у світі — понад 11 млн. т у 2008 р. із щорічним подальшим збільшенням на 8—10%, а також кількість утворюваного технічного гліцерину — 10% від об'єму біодизелю, стає зрозумілим, що для ефективного використання цього відходу як субстрату в біотехнологічних процесах його вміст у середовищі культивування продуцентів практично цінних мікробних метаболітів має бути якомога вищим [16].

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 — важливий промисловий штам, який культивують на середовищі з гліцерином, що є єдиним джерелом вуглецю й енергії, при виробництві клавуланової кислоти. Проте використання одного субстрату має низку недоліків, одним з яких є синтез побічних продуктів (цефаміцин) за рахунок вуглецю гліцерину [6]. Відомо, що мікроорганізми добре метаболізують більшість амінокислот, але лише деякі з них сприяють підвищенню синтезу практично-цінних вторинних метаболітів [6]. Так, орнітин та аргінін є попередниками синтезу штамом ATCC 27064 клавуланової кислоти. Варто зазначити, що додавання аргініну в середовище культивування *S. clavuligerus* ATCC 27064 призводило до накопичення глутамату, що негативно впливало на синтез цільового продукту. У [6] встановлено, що додавання лейцину, ізолейцину, серину та валіну, проте не аргініну, сприяло підвищенню синтезу клавуланової кислоти, а додаткове внесення орнітину в середовище з гліцерином дозволило накопичити достатню кількість аргініну, що, у свою чергу, привело до інгібування синтезу побічних продуктів за рахунок головного джерела вуглецю.

За допомогою простої дворівневої повнофакторної центральної композиційної конструкції досліджено вплив концентрацій у суміші гліцерину і орнітину в середовищі вирощування *S. clavuligerus* ATCC 27064 на синтез клавуланової кислоти за періодичного та безперервного культивування [6]. Так, було обрано співвідношення 40:1, а саме 80 мМоль гліцерину до 2,1 мМоль орнітину. В результаті експерименту встановлено, що за періодичного культивування в колбах на качалках максимальна концентрація кінцевого продукту (390 мг/л) була у 1,3 раза вище порівняно з отриманими раніше даними (311 мг/л) [6]. Для масштабування у біореакторі кількість субстратів зменшували на 20 %, при цьому концентрація клавуланової кислоти після культивування становила 650 мг/л, що у 1,7 раза вище порівняно з вирощуванням штаму ATCC 27064 у колбах. Наведені значення показують перспективність використання оптимізованого молярного співвідношення суміші субстратів для синтезу практично цінних вторинних метаболітів [6].

1,3-пропандіол є важливою речовиною, що використовується при виробництві полімерів [11]. Відомими продуцентами цієї сполуки є бактерії родів *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* та *Lactobacillus*. Джерелом вуглецю, для більшості є гліцерин, метаболізм якого добре вивчений у модельного мікроорганізму *Klebsiella pneumoniae*. Крім цього, відомо, що ключову роль у біосинтезі 1,3-пропандіолу відіграє НАДН [11]. Дослідження було спрямо-

ване на інтенсифікацію синтезу 1,3-пропандіолу за рахунок збільшення кількості відновлювальних еквівалентів, що спричиняється використанням суміші гліцерину та ксилози. Ксилоза останнім часом привертає все більшу увагу дослідників завдяки своїй низькій вартості та простоті отримання, оскільки її велика кількість утворюється при кислотному гідролізі геміцелюлози [11]. Була розглянута можливість використання ксилози як додаткового джерела вуглецю в середовищі культивування *K. pneumoniae* ME-303. Початкові концентрації гліцерину і ксилози у середовищі культивування штаму ME-303 становили 30 г/л та 8 г/л відповідно, при цьому протягом процесу підтримувались на рівні 15—20 г/л і 5—8 г/л відповідно [11]. Встановлено, що максимальна концентрація 1,3-пропандіолу після культивування на наведеному середовищі в колбах на качалці становила 11,06 г/л, що на 26,4 % вище порівняно з вирощуванням на моноsubstrаті гліцерині. Варто відмітити, що ксилоза досить швидко споживається протягом перших 16 год, після чого не використовується *K. pneumoniae* ME-303 [11].

Окрім 1,3-пропандіолу, у процесі біосинтезу утворюється велика кількість побічних продуктів, таких як 2,3-бутандіол, оцтова кислота, етанол, янтарна кислота та молочна кислота [11]. Цікавим є те, що інтенсифікація синтезу 1,3-пропандіолу супроводжувалась підвищенням концентрації і побічних продуктів, а особливо 2,3-бутандіолу. Результат може бути обумовлений такими причинами [11]:

- низьке значення рН (6,5), що сприяло біосинтезу 2,3-бутандіолу (за відсутності його контролю в колбах на качалках при періодичному культивуванні штаму ME-303);

- більша частина вуглецю субстратів та отримуваної енергії була направлена на біосинтез побічних продуктів;

- безпосереднє перетворення ксилози на 2,3-бутандіол.

На наступному етапі досліджувалась інтенсифікація синтезу 1,3-пропандіолу у ферментері за умов контролю рН у середовищі. Встановлено, що підтримання значення рН 7,0 є несприятливим для синтезу побічних продуктів і приводить до зниження їх концентрації в 2 рази. У разі культивування *K. pneumoniae* ME-303 у ферментері (гліцерин — 30 г/л, ксилоза — 8 г/л) максимальна концентрація утвореного 1,3-пропандіолу становила 13,2 г/л, що на 9,4 % вище порівняно з вирощуванням бактерій на гліцерині [11].

Використання біоетанолу може значно знизити залежність людства від викопного палива, а також зменшити викиди CO₂ як основного парникового газу [7]. Проте промислове виробництво біопалива часто критикують за використання джерел живлення як сировини. Наприклад, у Бразилії використовують цукровий очерет, в Америці — кукурудзу, а в Європі — пшеницю і ячмінь, що може призвести до ескалації цін на продукти харчування у зв'язку з конкуренцією на ринку [7]. З наведених вище причин розширення виробництва біопалива повинно ґрунтуватись на використанні лігноцелюлозних, сільськогосподарських і промислових відходів, що може значно здешевити біосинтез. Важливим є те, що найчастіше у сільськогосподарських відходах містяться суміші речовин, тому інтерес науковців сьогодення спрямований на дослідження можливості використання різної лігноцелюлозної сировини та їх сумішей для підвищення синтезу біоетанолу [7].

У [7] досліджено вплив пшеничної соломи, обробленої парою та попередньо оцукреного пшеничного борошна як джерел вуглецю на концентрацію й вихід етанолу після культивування *Saccharomyces cerevisiae*. Співвідношення пшеничної соломи та борошна такі: 0,8:4,2, 1,5:3,5, 2,0:3,0 і 2,5:2,5, також використовували відповідні монособстрати. Встановлено, що у перші 2 год культивування на пшеничній соломі продуктивність синтезу біоетанолу становила 1,6 г/л/год, тоді як за використання суміші борошна і соломи — 4,7 г/л/год. Максимальна продуктивність (6,7 г/л/год) на кінець культивування (72 год) спостерігалась за використання оцукреного пшеничного борошна, тоді як найвища концентрація етанолу 56,5 г/л за вирощування на суміші субстратів у співвідношенні 2,5:2,5 [7].

Біосинтез поверхнево-активних речовин на суміші субстратів

Мікробні ПАР можуть широко використовуватись у різноманітних галузях промисловості (природоохоронні технології, харчова промисловість, сільське господарство, медицина), оскільки мають низку переваг перед синтетичними аналогами [3, 15]. Промислове виробництво мікробних ПАР у світі стримується великими витратами на біосинтез, виділення і очищення цільового продукту, а також низькою концентрацією синтезованих ПАР. Одним із підходів до підвищення ефективності їх біосинтезу є використання суміші енергетично нерівноцінних субстратів, що дає змогу уникнути непродуктивних втрат вуглецю й енергії, а також підвищити конверсію вуглецю у практично цінні вторинні метаболіти [1].

У [13] досліджено можливість інтенсифікації синтезу ПАР *Pseudomonas aeruginosa* SP4 з використанням пальмової олії як джерела вуглецю та додаткового субстрату — глюкози. Такий вибір обумовлювався тим, що для бактерій роду *Pseudomonas* ключову роль у синтезі ПАР відіграє джерело вуглецю, оскільки вони можуть споживати як гідрофільні субстрати — гліцерин, глюкоза, маніт, етанол, так і гідрофобні — н-алкани і рослинні олії. З літератури відомо, що нерозчинні у воді субстрати сприяють синтезу ПАР бактерій роду *Pseudomonas*, а додатковий гідрофільний субстрат витрачається на енергетичні потреби клітини [13].

За допомогою методу критичного розпаду міцел досліджували оптимальне співвідношення пальмової олії та глюкози (60:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, відповідно) у середовищі культивування *P. aeruginosa* SP4. Встановлено, що максимальне споживання пальмової олії (78 %) спостерігалось за співвідношення з глюкозою 40:1, при цьому поверхневий натяг культуральної рідини знизився до 28—30 мН/м. Варто зазначити, що підвищення частки глюкози у середовищі культивування не призводило до подальшого зниження поверхневого натягу, тому що клітини штаму SP4 не використовували пальмову олію, що значно знижувала концентрацію синтезованих ПАР [13].

Із промислових косметичних відходів у Таїланді ізольований штам дріжджів, ідентифікований як *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52 T. Штам здатний до синтезу ПАР [14]. Варто зазначити, що штам JP52 T використовує для біосинтезу ПАР ті ж самі джерела вуглецю, що і *P. aeruginosa* SP4, тобто пальмову олію та глюкозу, проте, на відміну від штаму SP4, оптимальне співвідношення субстратів

у суміші становило 1:1. Так, за умов росту *C. samutprakarnensis* JP52 T на відповідній суміші з концентрацією субстратів по 2 % (глюкоза — масова частка, пальмова олія — за об'ємом) протягом 7 днів поверхневий натяг культуральної рідини знизився з 55 до 30 мН/м [14].

Висновок

Отже, аналіз літературних даних показує, що використання додаткового джерела вуглецю може сприяти синтезу практично-цінних вторинних метаболітів і деструкції забруднюючих речовин. Такі результати засвідчують перспективність культивування мікроорганізмів у промислових масштабах на сумішах субстратів.

Література

1. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу.— К.: Наукова думка, 2010. — 327 с.
2. Baboshin M., Golovleva L. Multisubstrate kinetics of PAH mixture biodegradation: analysis in the double-logarithmic plot // Biodegradation. — 2011. — Vol. 22, №1. — P. 13—23.
3. Bhardwaj G., Cameotra S., Chopra H. Utilization of oleo-chemical industry by products for biosurfactant production // AMB Express. — 2013. — Vol.3, №1. doi: 10.1186/2191-0855-3-68.
4. Bucheli-Witschel M., Hafner T., Rüegg I., Egli T. Benzene degradation by *Ralstonia pickettii* PKO1 in the presence of the alternative substrate succinate // Biodegradation. — 2009. — Vol. 20, №3. — P. 419—431.
5. Chen K., Liu X., Li R., Liu Y., Hu H., Li S., Jiang J. Isolation of a buprofezin co-metabolizing strain of *Pseudomonas* sp. DFS35-4 and identification of the buprofezin transformation pathway// Biodegradation. — 2011. — Vol. 22, №6. — P. 1135—1142.
6. Dominguesa L., Teodorob J., Hokkab C., Badinob A., Araujoa M. Optimisation of the glycerol-to-ornithine molar ratio in the feed medium for the continuous production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*// Biochem. Eng. J. — 2010. — Vol. 53, №1. — P. 7—11.
7. Erdei B., Barta Z., Sipos B., Réczey K., Zacchi M. Ethanol production from mixtures of wheat straw and wheat meal // Biotechnol. Biofuels — 2010. doi:10.1186/1754-6834-3-16.
8. Garcia Sanchez R., Karhumaa K., Fonseca C., Sánchez Nogué V., Almeida J., Larsson C., Bengtsson O., Bettiga M., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M. Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering// Biotechnol. Biofuels. — 2010. — Vol. 15, №3. — P. 13.
9. Gauthier H., Yargeau V., Cooper D. Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism // Sci. Total. Environ. — 2010. — Vol. 408, №7. — P. 1701—1706.

10. *Haritash A.K., Kaushik C.* Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review // *J. of Hazardous Materials.* — 2009. — Vol. 169, № 1—3. — P. 1—15.

11. *Jin P., Lu S., Huang H., Luo F., Li S.* Enhanced reducing equivalent generation for 1,3-propanediol production through cofermentation of glycerol and xylose by *Klebsiella pneumoniae*// *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 165, № 7—8. — P. 1532—1542.

12. *Liang Y., Zeng F., Qiu G., Lu X., Liu X., Gao H.* Co-metabolic degradation of dimethoate by *Raoultella* sp. X1// *Biodegradation.* — 2009. — Vol. 20, № 3. — P. 363—73.

13. *Pansiripata S., Pornsunthorntaweeta O., Rujiravanita R., Kitiyanana B., Somboonthanate P., Chavadej S.* Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effect of oil-to-glucose ratio // *Biochem. Eng. J.* — 2010. — Vol. 49, № 2. — P. 185—191.

14. *Poomtien J., Thaniyavarn J., Pinphanichakarn P., Jindamorakot S., Morikawa M.* Production and Characterization of a Biosurfactant from *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52 // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2013. — Vol. 77, № 12. — P. 2362—2370.

15. *Sachdev D., Cameotra S.* Biosurfactants in agriculture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2013. — Vol. 97, № 3. — P. 1005—1016.

16. *Silva G., Mack M., Contiero J.* Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // *Biotechnol. Adv.* — 2009. — Vol. 27, № 1 — P. 30—39.

17. *Wick L.Y., Pasche N.M., Bernasconi S.* Characterization of Multiple-Substrate Utilization by Anthracene-Degrading *Mycobacterium frederiksbergense* LB501T // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 69, № 10 — P. 6133—6142.

18. *Wu Z., Liu Y., Liu H., Xia Y., Shen W., Hong Q., Li S., Yao H.* Characterization of the nitrobenzene-degrading strain *Pseudomonas* sp. a3 and use of its immobilized cells in the treatment of mixed aromatics wastewater// *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2012. — Vol. 28, № 8. — P. 2679—2687.

19. *Пирог Т. П., Шулякова М. О., Шевчук Т. А.* Змішані субстрати у природних умовах і біотехнологічних процесах // *Biotechnol. Acta.* — 2013. — Vol. 6, № 6. — P. 28—44.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СМЕСИ СУБСТРАТОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Н.В. Кудря, К.А. Береговая

Национальный университет пищевых технологий

В статье обобщены литературные данные последних лет по использованию микроорганизмами смешанных субстратов. Значительное внимание уделено повышению эффективности биodeградации ксенобиотиков микроорганизмами (фенатрен, бензол, нитробензол, толуол, бупрофезин, диметоат и др.) за счет внесения дополнительного субстрата. Так, при внесении крахмала в среду

культивирования *Pseudomonas* sp. DFS35-4 степень деструкции бупрофезина достигал 75%, а в присутствии глюкозы наблюдали повышение степени деструкции сульфаметаксазола и сульфаметиазола *Rhodococcus rhodochrous* 13808. Приведены литературные данные о влиянии условий культивирования (в частности природы источников углерода и их концентрации в смеси) на синтез практически ценных вторичных метаболитов (клавулановая кислота, 1,3-пропандиол, биоэтанол) и биомассы.

Ключевые слова: смешанные субстраты, биodeградация ксенобиотиков, лигноцеллюлоза, интенсификация синтеза, поверхностно-активные вещества.