

ЗМІШАНІ СУБСТРАТИ У ПРИРОДНИХ УМОВАХ І БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСАХ

Т. П. ПИРОГ, М. О. ШУЛЯКОВА, Т. А. ШЕВЧУК

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Отримано 15.04.2013

В огляді наведено дані літератури і результати власних експериментальних досліджень використання суміші субстратів для інтенсифікації технологій мікробного синтезу корисних продуктів бродиння (етанол, молочна кислота, бутандіол), первинних (амінокислоти, *n*-гідроксибензоат, тригліцериди) і вторинних (ловастатин, поверхнево-активні речовини) метаболітів, а також біодеградації ксенобіотиків ароматичної природи (бензол, крезоли, феноли, толуол) та пестицидів (диметоат).

Значну увагу приділено встановленим в останні роки молекулярним механізмам, що лежать в основі явища катаболічної репресії у грампозитивних (*Bacillus subtilis*) і грамнегативних (*Pseudomonas*, *Escherichia coli*) бактерій, а також дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та використанню цих даних для розроблення технологій утилізації рослинної біомаси з одержанням промислово важливих метаболітів.

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.

Підсумовано власні експериментальні дані щодо використання суміші ростових субстратів для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. Встановлено залежність синтезу поверхнево-активних речовин на суміші енергетично надлишкового (гексадекан) і енергетично дефіцитних (гліцерол, етанол) субстратів від способу підготовки інокуляту, концентрації моносубстратів у суміші, а також їх молярного співвідношення.

Ключові слова: змішані субстрати, катаболітна репресія, інтенсифікація біосинтезу, біодеградація ксенобіотиків, утилізація рослинної біомаси, поверхнево-активні речовини.

У 2004 р. ми опублікували огляд [1], в якому підсумували відомі на той час літературні та власні експериментальні дані про використання мікроорганізмами суміші ростових і неростових субстратів. Було докладно розглянуто поняття «ростовий субстрат» і «неростовий субстрат», а також типи трансформації змішаних ростових і неростових субстратів (міксотрофія, діауксія, неростове окиснення, кометаболізм, синтаболізм). Викладено основні положення концепції допоміжного субстрату Бабеля та сутність енергетичної класифікації субстратів, подано дані щодо впливу умов культивування на характер споживання суміші субстратів та використання змішаних субстратів з метою інтенсифікації росту мікроорганізмів. Наведено власні дані авторів стосовно інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів (на прикладі мікробного екзополісахариду етаполану) на суміші

енергетично нерівноцінних ростових субстратів.

Інтерес до використання змішаних субстратів для підвищення синтезу біомаси був найвищим у 80-х рр. ХХ ст., про що свідчила велика кількість відповідних публікацій у ці роки. Саме тоді було розроблено енергетичну класифікацію субстратів Бабеля, яку експериментально підтверджено під час вирощування на змішаних субстратах багатьох мікроорганізмів — представників різних таксономічних та фізіологічних груп. У 90-х рр. ХХ ст. інтерес до цієї проблеми дещо знизився. Це насамперед було пов'язано з тим, що даний підхід не набув реального практичного застосування, оскільки експериментальні дані щодо використання суміші ростових та неростових субстратів було одержано здебільшого для «специфічних» груп мікроорганізмів (фотосинтезуючих, водневих, метаноутворювальних, суль-

фатовідновлювальних, карбоксидбактерій, метилотрофних дріжджів та ін.), які у промисловому масштабі майже не застосовували. Наприкінці 90-х рр. минулого і на початку ХХІ ст. інтерес до проблеми використання мікроорганізмами суміші ростових та неростових субстратів знову відновився, проте лише стосовно обмеженої групи мікроорганізмів, які є об'єктами конкретних впроваджених біотехнологій. Це, насамперед, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, молочнокислі бактерії, бактерії-деструктори важкодоступних хімічних сполук (у тому числі забруднювачів навколишнього середовища).

Мета цього огляду — узагальнення сучасних даних літератури і результатів власних досліджень щодо використання мікроорганізмами змішаних субстратів як у природних умовах, так і в біотехнології.

Загальні механізми та закономірності використання суміші ростових субстратів мікроорганізмами

Метаболічна універсальність мікроорганізмів пов'язана з жорсткою, але водночас гнучкою системою регулювання експресії генів метаболічних шляхів, спрямованою на оптимізацію ефективності споживання субстратів. В умовах, коли кілька можливих джерел вуглецю доступні в концентраціях, що не обмежують ріст, бактерії можуть або кометаболізувати різні джерела вуглецю, або асимілювати переважно одну конкретну сполуку, що забезпечує найшвидший ріст, перешкоджаючи водночас поглинанню та/або експресії генів, необхідних для катаболізму інших сполук [2]. Регуляторні процеси з урахуванням такого вибору кращого джерела вуглецю було названо катаболітною репресією вуглецю (КРВ, carbon catabolite repression, CCR) або катаболітним контролем репресії.

Хоча явище діауксії (послідовного використання субстратів) було виявлено на початку 40-х рр. ХХ ст., а термін «катаболітна репресія» введено Магасаніком у 1970 р., дослідження молекулярних механізмів, що лежать в основі КРВ, триває дотепер. Знання цих механізмів є необхідним для розуміння регуляції обміну речовин і шляхів деградації бактеріями сполук у навколишньому середовищі. Це особливо актуально для речовин, які повільно розкладаються і накопичуються, створюючи екологічні проблеми. КРВ значно впливає на експресію генів, відповідальних за транспорт і метаболізм джерел вуглецю, яким не надається

перевага, а також на експресію факторів вірулентності кількох видів бактерій. Зрештою КРВ має значення для оптимізації біотехнологічних процесів, таких як біотрансформації та біоремедіації [2].

Катаболітна репресія негативно позначається на ефективності процесів синтезу біомаси та цільового продукту на середовищах, що містять суміш субстратів, наприклад лігноцелюлозної сировини. Так, можливість ефективно й одночасно використовувати гексози і пентози є ключовою вимогою до мікроорганізмів для оптимального використання такої сировини [3]. На жаль, така властивість притаманна відносно небагатьом природним штамам. У зв'язку з цим дослідниками активно ведеться пошук шляхів подолання катаболітної репресії із застосуванням методів генної інженерії шляхом індукованих мутацій та модифікацій генів, що кодують протеїни-переносники відповідних вуглеводів, і створення КРВ-негативних мікроорганізмів [3–6].

Розглянемо механізм КРВ на прикладі росту мікроорганізмів на суміші пентоз та гексоз (рис. 1) [5].

Хоча багато мікроорганізмів здатні використовувати пентози, їх катаболізм, як правило, пригнічується глюкозою. Коли субстрати споживаються послідовно, вуглеводи, асиміляція яких репресується (наприклад, пентози), накопичуються в середовищі, доки моносахариди, яким надається перевага (наприклад, глюкоза) повністю метаболізуються (рис. 1, а). Завдяки високій концентрації кінцевих продуктів, що інгібують ензиматичну активність (таких як молочна кислота і етиловий спирт під час спиртового бродіння), коефіцієнт використання залишкових пентоз нижчий, ніж у разі застосування їх як єдиного джерела вуглецю. Окрім того, якщо невелика кількість глюкози залишається в середовищі, пентози не асимілюються (рис. 1, б). Для унеможливлення накопичення пентоз додають нові порції субстратів після повного і послідовного використання доступної глюкози і пентоз (рис. 1, с). Така часта зміна доступних джерел вуглецю спричинює непостійний ріст, робить його важкопередбачуваним і зумовлює затримки між різними фазами росту. Послідовне використання суміші вуглеводів знижує таким чином ефективність біотехнологічних процесів.

Регуляція КРВ у грампозитивних (*Bacillus subtilis*) і грамнегативних (*Escherichia coli*, *Pseudomonas*) бактерій та евкаріотів (дріжджі) відбувається різними шляхами [2, 5, 6].

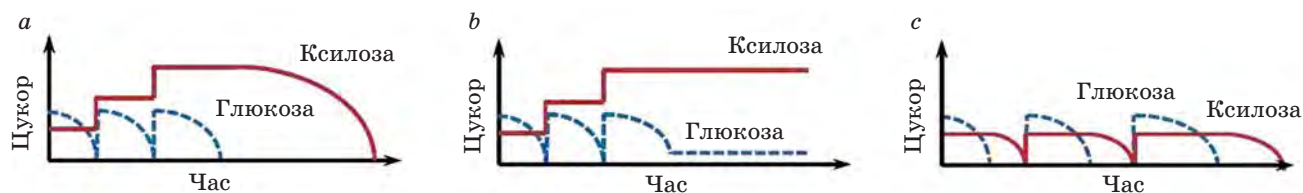


Рис. 1. Принципова схема використання суміші глюкози і ксилози КРВ-позитивними штамами:

- a — пентози (суцільна лінія) накопичуються, тимчасом як глюкоза (пунктирна лінія) повністю споживається. Пентози використовують тільки після вичерпання глюкози;
- b — пентози (суцільна лінія) накопичуються під час споживання глюкози. У зв'язку з неповним споживанням глюкози асиміляція пентоз репресується;
- c — внесення субстратів частинами з послідовною утилізацією глюкози і пентози. Додаткову суміш вуглеводів вносять після повного і послідовного споживання глюкози і пентози [5]

У бактерій вуглеводи транспортуються в клітину за допомогою фосфоенолпіруват-залежної фосфотрансферазної системи (ФТС), перші два ензими якої (EI і HPr) беруть участь у перенесенні всіх моносахаридів, що транспортуються цією системою (глюкоза, фруктоза, маноза, трегалоза), а третій (EII) є вуглеводспецифічним. EII-ензими, як правило, складаються з трьох доменів, включених у різні поліпептиди. У *E. coli* глюкозоспецифічний ензим EII має два поліпептиди: цитоплазматичний EIIA^{Glc} і зв'язаний з мембраною транспортер глюкози EIICB^{Glc}. Фосфатна група послідовно передається від фосфоенолпірувату до глюкози через EI, HPr, EIIA^{Glc} і EIICB^{Glc}. Глюкозоспецифічний ензим EIIA^{Glc} є центральним регулятором КРВ у *E. coli*, а у *B. subtilis* та інших представників *Firmicutes* цю роль відіграє HPr [2].

У ентеробактерій та інших представників *Gracilicutes* за наявності глюкози в живильному середовищі протеїн EIIA^{Glc} перебуває зазвичай у нефосфорильованому стані (фосфатні групи передаються на глюкозу через ФТС), він зв'язаний з різними пермеазами нефосфотрансферазної системи і перешкоджає поглинанню вуглеводів (механізм «виключення індуктора»). Ця реакція опосередковується головним чином протеїном-рецептором цАМФ (сАМР ресер-тор protein, CRP), активна форма якого є гомодимером і потребує цАМФ для функціонування [4]. Коли глюкоза асимілюється, спостерігається низький рівень цАМФ, а CRP присутній у мономерній формі, унаслідок чого не може зв'язуватися з ДНК й активувати транскрипцію. Проте після повного вичерпання глюкози фосфорильована форма EIIA^{Glc} взаємодіє з невідомим розчинним фактором і стимулює активність аденілатциклази (КФ 4.6.1.1), яка генерує цАМФ з АТФ [2, 4]. Далі цАМФ зв'язується з CRP, утворюючи комплекс цАМФ-CRP,

що супроводжується індукцією генів, підданих катаболітній репресії [4]. Таким чином, фосфорильовання EIIA^{Glc} може регулювати експресію генів, що беруть участь у метаболізмі вуглеводів двома способами: через «виключення індуктора» та контроль рівня цАМФ. Комплекс цАМФ-CRP контролює активність близько 200 промоторів [2].

Основним транскрипційним регулятором КРВ у *B. subtilis*, як і в багатьох інших грампозитивних бактерій, є протеїн катаболітного контролю А (catabolite control protein A, CsrA), який належить до LacI/GalR родини регуляторів [2]. Залежно від локалізації зв'язку CsrA з ДНК транскрипція може активуватися або пригнічуватися. Зазначимо, що близько 10% геному *B. subtilis* перебуває під впливом CsrA.

Ключовий аспект функціонування CsrA полягає в тому, що ефективно його зв'язування з катаболічно чутливим елементом (КЧЕ) потребує взаємодії з алостеричним кофактором P-Ser₄₆-HPr, що входить до складу ФТС [2]. Взаємодія між CsrA і P-Ser₄₆-HPr, а також можливість комплексного зв'язку із сайтами КЧЕ посилюється за присутності проміжних продуктів гліколізу: фруктозо-1,6-дифосфату або глюкозо-6-фосфату, рівні яких досить високі у разі активного споживання глюкози. Таким чином, у грампозитивних бактерій ФТС відіграє ключову роль у КРВ, але в даному разі регулювальний сигнал передається HPr компонентами ФТС, а не EIIA^{Glc}, як це відбувається в *E. coli* [2].

Слід зауважити, що в механізмах реалізації катаболітної репресії у різних мікроорганізмів спостерігаються значні відмінності. Так, на відміну від *B. subtilis* та *E. coli*, в яких ФТС відіграє ключову роль у КРВ, у представників роду *Pseudomonas* через ФТС у клітину транспортується тільки фруктоза, яка не відіграє важливої ролі в КРВ, як і комплекс цАМФ-CRP. На цей час відомо, що регуляторними факторами або система-

ми, що беруть участь в КРВ, у *Pseudomonas* є протеїни Crc (разом з CbrA, CbrB і CrcZ, які модулюють доступність Crc), термінальні оксидази Cyo і система ФТС^{Ntr}. Метаболічні відмінності між *Pseudomonas* і ентеробактеріями або *Firmicutes* можна пояснити різними способами існування бактерій і, відповідно, різними стратегіями виживання [2].

На відміну від бактерій, у дріжджів транспорт вуглеводів є енергонезалежним і відбувається шляхом полегшеної дифузії за допомогою так званих переносників гексоз (Hxt) і галактози (Gal2), що природно мають різну спорідненість зі «своїми» субстратами [6]. Так, у *S. cerevisiae* Gal2, Hxt1, Hxt2, Hxt4, Hxt5 і Hxt7 каталізують засвоєння ксилози. Проте їх спорідненість із ксилозою значно нижча, ніж з глюкозою, тому поглинання ксилози сильно гальмується глюкозою [6].

Мікробна трансформація змішаних субстратів у природних угрупованнях

Тимчасом як механізми виживання мікроорганізмів в умовах голодування за відсутності вуглецевих субстратів вивчено досить детально, відомості про фізіологію повільного росту в оліготрофних середовищах обмежені. Огляд Egli [7] є першим, в якому детально розглянуто механізми виживання мікроорганізмів в оліготрофних умовах.

Оліготрофія — життя в розбавлених, бідних на поживні речовини середовищах, що характеризуються низькою концентрацією поживних речовин і низькою продуктивністю первинних продуцентів через низьку доступність фосфору та/або азоту. Як наслідок, концентрація продуктів метаболізму, необхідних для гетеротрофного росту, теж невисока [7].

На основі результатів лабораторних досліджень із чистими культурами припустили, що клітини бактерій виробили дві стратегії виживання за таких умов. Перша з них полягає у використанні багатьох різних джерел вуглецю одночасно (тобто спеціалізація щодо певного субстрату відсутня). Одночасне споживання кількох джерел вуглецевого живлення забезпечує можливість швидкого росту за невисокої концентрації окремих субстратів. Друга стратегія передбачає зведення потреб клітини до мінімуму (однак, наразі небагато відомо про механізми, якими можна цього досягти) [7].

Якщо вважати використання суміші ростових субстратів гетеротрофними мікроорганізмами поширеним явищем, постає

питання: які переваги отримує від цього клітина? Чи не є «марнотратним» синтез (дерепресія) транспортних і катаболічних ензимів, для яких, імовірно, субстрати доступні лише в рідкісних випадках? Наявна на цей час інформація свідчить про те, що є принаймні дві важливі переваги у клітин, які споживають кілька вуглецевих субстратів одночасно, а саме:

- 1) поліпшення кінетичних характеристик, що надає конкурентну перевагу;
- 2) значна метаболічна/фізіологічна гнучкість.

Клітини, що використовують суміш субстратів, можуть рости відносно швидко за наявності мізерних концентрацій окремих джерел вуглецю. Таким чином, загадковий факт, що морські бактерії ростуть досить швидко за вкрай низьких концентрацій вуглецю у відкритому океані, можна пояснити ростом на змішаних субстратах. Це було продемонстровано на хемостатній культурі *E. coli*: клітини, здатні до утилізації суміші субстратів, мають конкурентну кінетичну перевагу і навіть можуть витіснити мутантів, які використовують тільки один із двох субстратів суміші.

Якщо мікроорганізми завжди таким чином конкурують за різні субстрати, то концепція «одному організмові — одна ніша» (тобто для кожного субстрату існує один спеціалізований вид бактерій, який може використовувати його найбільш ефективно, витісняючи всі інші штами), очевидно, неприйнятна для розуміння мікробної гетеротрофної конкуренції в середовищах з лімітованими концентраціями джерел вуглецю/енергії.

Наступною кінетичною перевагою в результаті росту на суміші субстратів, імовірно, є вплив порогових концентрацій. Було встановлено, що порогові значення для споживання деяких сполук можуть бути знижені одночасним використанням альтернативних джерел вуглецю.

Широка дерепресія транспортних і катаболічних ензиматичних систем робить клітини метаболічно гнучкими, що виражається в їхній здатності відразу переключитися з одного джерела вуглецю на інший залежно від їх доступності [7]. Наприклад, хемостатна культура *E. coli* під час росту в умовах обмеженої концентрації глюкози може відразу і повністю замінити глюкозу як ростовий субстрат на фруктозу, манозу, мальтозу або рибозу без помітного відставання у швидкості синтезу біомаси. Було показано, що в умовах вуглець-лімітованого росту

наявність альтернативних джерел вуглецю/енергії не тільки не пригнічує, а, навпаки, підтримує індукцію інших катаболічних ензимів, найімовірніше шляхом постачання енергії та будівельних блоків для синтезу нових необхідних протеїнів. Це дає підстави зробити висновок, що одночасне використання суміші джерел вуглецю/енергії підвищує ступінь метаболічної свободи організму і гнучкості у процесах синтезу протеїнів відповідно до потреб і, отже, можливість швидко реагувати на зміну умов навколишнього середовища [7].

Інтенсифікація біотехнологічних процесів з використанням змішаних субстратів

Біодеградація ксенобіотиків. Здатність швидко адаптуватися до нових умов довкілля та доволі широкий набір ензиматичних систем мікроорганізмів дають змогу використовувати різні органічні сполуки як джерело енергії та вуглецю і тим самим піддавати деструкції токсичні, канцерогенні та мутагенні речовини, до складу яких входять і ароматичні сполуки.

Тетрагідрофуран (ТГФ) — хімічно синтезована органічна сполука, яка не трапляється в природному середовищі й широко використовується як реагент у виробництві та переробці полімерів, а також у поліграфічній промисловості [8]. Хоча тривалий час ТГФ вважали сполукою, що не підлягає біологічному розкладу, нині відома таксономічно різноманітна група бактерій, здатних до деградації цієї сполуки. Переважно це представники грамположитивних актиноміцетів родів *Rhodococcus*, *Pseudonocardia* і *Cordyceps sinensis* sp., а нещодавно було вперше встановлено таку здатність і в грамнегативної бактерії *Pseudomonas oleovorans* DT4 [8]. У стічних водах чи відпрацьованих газах підприємств, що містять ТГФ, ця сполука завжди наявна в комплексі з іншими забруднювачами, особливо моноароматичними вуглеводнями, такими як бензол (Б), толуол (Т), етилбензол (Е) і ксилол (К).

Для досліджень було обрано *P. oleovorans* DT4, якому притаманна висока здатність до розкладу ТГФ: 203,9 мг/(год·г сухої маси) [9]. Спочатку визначали характер деградації чистих сполук та подвійних сумішей за початкової концентрації субстратів 1 мМ. Встановлено, що розклад монособстрату ТГФ починався без затримки, тимчасом як швидкість деградації бензолу становила 29,17 мг/(год·г сухої маси) після 7-годинної

лаг-фази (рис. 2). У суміші цих субстратів наявність ТГФ фактично стимулювала розклад бензолу: швидкість та тривалість процесу становили 39,68 мг/(год·г сухої маси) і 21 год відповідно. Загалом тенденція деградації суміші толуол + ТГФ була схожа до такої для суміші бензол + ТГФ.

Штам *P. oleovorans* DT4 не здатен використовувати *m*-ксилол, *n*-ксилол і етилбензол як єдине джерело вуглецю та енергії, проте може кометаболізувати ці сполуки за наявності ТГФ.

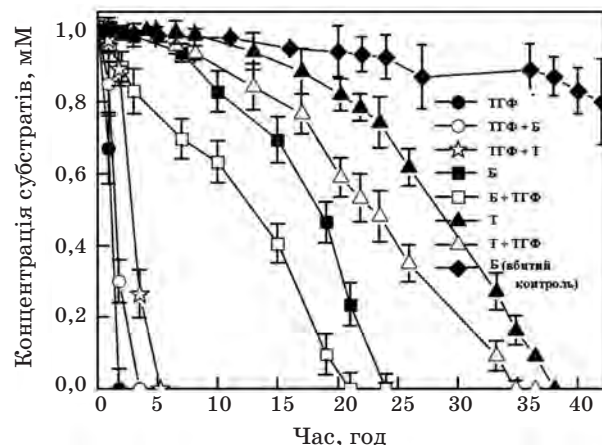


Рис. 2. Вплив та взаємодія ТГФ, бензолу (Б) і толуолу (Т) за їх біодеградації штамом DT4 [8]

стічних води нафтопереробних заводів, різних промислових підприємств хімічного синтезу та видобутку вугілля містять безліч ароматичних речовин, серед яких фенол, крезоли, нітрофенол та ін. [10]. Для дослідження можливості деструкції суміші фенолу і його метильованих похідних (*o*-, *m*-, *p*-крезолу) дослідники обрали штам *Trichosporon cutaneum* R57, для якого раніше було встановлено здатність до розкладання 1 г/л фенолу упродовж 18–20 год [11]. При цьому було показано значну різницю у здатності *T. cutaneum* R57 розкладати ізомери крезолу. Так, деградація 0,1 г/л *m*-крезолу відбувається лише на 85%, 0,1 г/л *p*-крезолу — здійснюється повністю через 24 год, а *o*-крезол взагалі не утилізується [12].

Експерименти з використанням досліджуваного штаму для розкладу сумішей фенолу та *o*-, *m*- і *p*-крезолу показали значні відмінності в деградаційній здатності штаму щодо зазначених ізомерів крезолу (рис 3).

Встановлено, що суміш фенолу та похідних крезолу споживається штамом *T. cutaneum* R57 одночасно, проте наявність ізомерів крезолу призводила до збільшення тривалості деградації фенолу [10]. Тому для

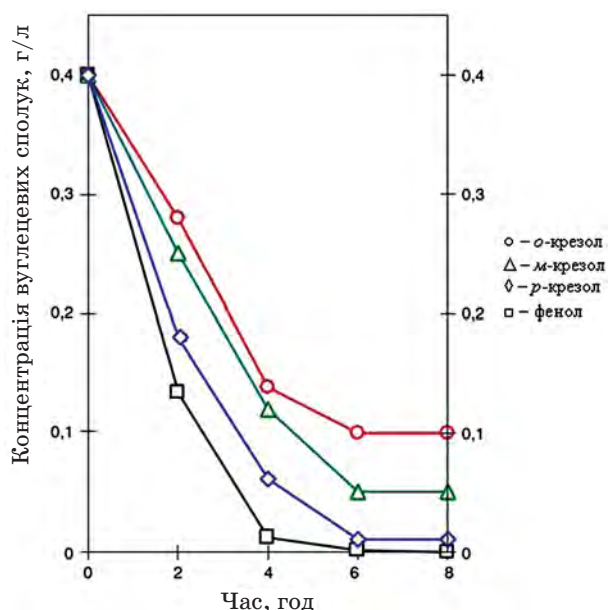


Рис. 3. Деградація суміші фенолу і його метильованих похідних *T. cutaneum* R57. Склад середовища: суміш 0,3 г/л фенолу та 0,1 г/л *o*-, *m*- і *p*-крезолу або 0,4 г/л фенолу як єдине джерело вуглецю [10]

повного розкладання суміші цих субстратів слід зменшити негативний вплив крезолу на процес споживання фенолу мікроорганізмами.

Pseudomonas putida KT2440 (pWWO) здатна використовувати толуол (завдяки наявності TOL плазмиди, що кодує катаболічні шляхи його перетворення), та глюкозу [13]. Під час культивування штаму KT2440 на суміші глюкози і толуолу (16 мМ і 6 мМ відповідно) швидкість споживання кожного окремого субстрату становила близько половини значення швидкості асиміляції у процесі росту на моносубстратах (5,7 і 13,1 моль/мг сухої маси клітин/год для глюкози та 6,4 і 11,9 моль/мг сухої маси клітин/год для толуолу відповідно). При цьому швидкість росту була практично однаковою як на змішаному, так і на моносубстратах. Одночасне споживання глюкози та толуолу було підтверджено аналізом із застосуванням мічених молекул [^{13}C]-глюкози. На основі даних експериментів із використанням вихідного та мутантних штамів і ензиматичних аналізів було встановлено механізми перехресної катаболічної репресії між глюкозою та толуолом [13].

У роботі [14] встановлено здатність *Syntrophus aciditrophicus* до трансформації бензоату (5 мМ) за наявності кротонату (20 мМ) в анаеробних умовах. Показано, що утилізація суміші субстратів відбувається швидше (1,01 доба $^{-1}$) порівняно з моносуб-

стратом бензоатом (0,41 доба $^{-1}$), хоча швидкість росту штаму за таких умов є нижчою (0,007 і 0,025 год $^{-1}$ відповідно). За відсутності кротонату у середовищі деградація бензоату не відбувалась, а зі збільшенням концентрації кротонату до 10 мМ підвищувався й рівень розкладання бензоату — до 81,4% протягом 5 діб або 99,7% упродовж 12 діб [14]. Отримані дані можуть бути основою для розроблення біотехнологій очищення стічних вод, що ґрунтуються на внесенні косубстрату, наприклад кротонату, для стимуляції анаеробної біодеградації.

Диметоат — (О,О-диметил-S-метилкарбамоїлметилфосфодитіоат, $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{PS}_2$) — типовий органофосфорний пестицид, який зазвичай метаболізується розривом подвійного зв'язку між атомом фосфору та сірки у молекулі [15]. Ізольовано штаму *Raoultella* sp. X1, здатний до деградації диметоату через кометаболізм з іншим субстратом. Штаму *Raoultella* sp. X1 є стійким до високих (8 г/л) концентрацій цієї токсичної речовини, проте, як й інші бактерії, досить слабо росте на середовищі, в якому єдиним джерелом вуглецю є диметоат: за концентрації диметоату 200 мг/л ступінь його деградації становить усього 27% після 10 діб культивування. Альтернативними субстратами, які забезпечують найвищі рівні деградації ксенобіотика, є цитрат натрію і малат — 43,8 та 47,5% відповідно [15].

Утилізація рослинної біомаси з одержанням практично цінних продуктів бродиння. Нині виробництво багатьох хімічних речовин та енергії перебуває в залежності від викопного палива, запаси якого обмежені, а ціни постійно зростають. У зв'язку з економічними та екологічними проблемами, зумовленими використанням такого палива, дедалі більшу увагу привертають технології отримання практично цінних продуктів з відновлюваної сировини, зокрема крохмалевмісної та лігноцелюлозної [5, 6, 16–19].

Лігноцелюлозну сировину було визнано перспективною для виробництва палив і промислово важливих метаболітів, серед яких етанол, ксилітол та інші хімічні речовини [17]. Проте основною проблемою для її використання є наявність пентоз (до 50% від загальної маси вуглеводів), що або взагалі не можуть споживатися продуцентами, або зазнали катаболічної репресії. Якщо для мікроорганізмів, здатних використовувати пентози, основним завданням є дерегуляція КРВ, то для пентозо-некомпетентних першочергове значення має функціональна

експресія генів, що кодують синтез транспортерів пентоз та ензимів їх біотрансформації (рис. 4) [6].

Молочна кислота та етиловий спирт є перспективними заміниками викопного палива і основою для отримання багатьох хімічних речовин, наприклад етиллактату та полілактату. Етиллактат — органічний розчинник, який нині привертає багато уваги через можливість застосування в харчовій і фармацевтичній промисловості; полілактат є основою для виробництва біодеградувальних пластмас, використовуваних для одержання одноразового посуду та в текстильній промисловості [16].

Lactobacillus pentosus JH5XP5 — представник групи гетероензиматичних лактобактерій, має унікальний фенотип, що виявляється у відсутності катаболітної репресії та здатності до одночасного використання змішаних вуглеводів (пентози з глюкозою) з утворенням лактату, ацетату та етанолу (табл. 1).

L. pentosus JH5XP5 було успішно використано в комплексному процесі одночасного оцукрювання і зброджування вуглеводів гідролізату рисової соломи. Встановлено, що глюкоза, ксилоза, арабіноза гідролізату споживались одночасно і до повного їх вичерпання. Концентрація кінцевих продуктів після закінчення процесу на 180-ту год становила (г/л): молочна кислота — 43,0; оцтова кислота — 15,7; етанол — 12,1 [16].

Бактерії роду *Klebsiella* є відомими продуцентами 2,3-бутандіолу із суміші глюкози і ксилози [4]. У попередніх дослідженнях було одержано мутантний штам *Klebsiella*

oxytoca ME-XJ-8 — надсинтетик 2,3-бутандіолу і встановлено оптимальний склад середовища для отримання високих концентрацій продукту із суміші глюкози і ксилози [18]. Проте суттєвим недоліком цього процесу було послідовне споживання субстратів. Для подолання катаболітної репресії слід було отримати рекомбінантний штам *K. oxytoca* ME-CRPin, що експресує модифікований протеїн CRP, який не потребує для функціональної димеризації наявності цАМФ [4]. Оскільки відомо, що за повного гідролізу лігноцелюлозної сировини, наприклад кукурудзяної соломи, утворений розчин містить в основному глюкозу і ксилозу в співвідношенні приблизно 2:1 (об/об) [19], то для модифікації використання цієї сировини як субстрату з метою одержання 2,3-бутандіолу потрібно було перевірити здатність рекомбінантного штаму синтезувати цільовий продукт на такій суміші. Експерименти показали, що як для вихідного, так і рекомбінантного штаму вихід 2,3-бутандіолу при цьому практично не відрізнявся (0,44 г/г). Проте найвища концентрація спирту (23,9 г/л) досягалася на 34-ту год росту рекомбінантного штаму, що на 10 год раніше порівняно з вихідним [4].

У промисловому виробництві етанолу з вуглеводної сировини перевагу завжди надавали дріжджам *S. cerevisiae*, але їхнім недоліком є здатність до асиміляції тільки певного спектра вуглеводів — гексоз і дисахаридів, а такі пентози, як арабіноза і ксилоза, що містяться у целюлозо-деревних матеріалах, вони споживати не можуть [20–23]. Це й спонукало дослідників до кон-

А Мікроорганізми з природною здатністю до споживання пентоз



Б Мікроорганізми, не здатні споживати пентози

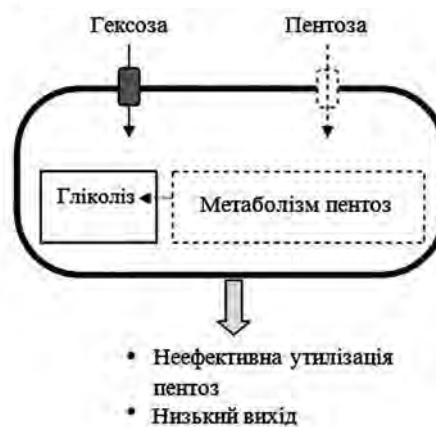


Рис. 4. А — група мікроорганізмів, що охоплює *E. coli* та деякі *Bacillus*. У зв'язку з КРВ поглинання пентоз відбувається лише після повного вичерпання глюкози; В — група мікроорганізмів, у яких відсутнє ефективне поглинання пентоз і/або ензими їх метаболізму [6]

Таблиця 1. Споживання моно- та змішаних субстратів та утворення продуктів *L. pentosus* JH5XP5 [16]

Джерело вуглецю, ступінь використання, %		Продукти, мМ		
		Лактат	Ацетат	Етанол
Моноsubstrати				
Пентози	Ксилоза (55)	89	86	2
	Арабіноза (39)	76	76	3
	Рибоза (45)	71	68	0
Гексози	Галактоза (27)	23	1	61
	Глюкоза (68)	57	3	134
	Фруктоза (100)	33	44	0
Суміші з глюкозою				
Пентози	Ксилоза (64%) + Глюкоза (69)	97	53	80
	Арабіноза (70%) + Глюкоза (55)	88	56	55
	Рибоза (85%) + Глюкоза (37)	90	70	37
Гексози	Галактоза (44%) + Глюкоза (79)	74	5	145
	Фруктоза (33%) + Глюкоза (91)	74	33	96

струювання такого штаму *S. cerevisiae*, який би містив ензиматичні системи для ефективного синтезу етанолу з пентоз.

Так, раніше було сконструйовано рекомбінантний штам *S. cerevisiae* OC2-ABGL4, що експресує β -глюкозидазу і здатен до ефективної утилізації ксилози [24]. Наявність β -глюкозидази дає змогу дріжджам трансформувати целобіозу, яку вони не можуть використовувати як джерело вуглецю, у глюкозу. Це уможливило контроль позаклітинної концентрації глюкози і унеможливило катаболітну репресію. У наступних дослідженнях приділяли увагу асиміляції дріжджами суміші целобіози та ксилози. Для цього на основі отриманого раніше штаму *S. cerevisiae* OC2-ABGL4 було створено новий — OC2-ABGL4Xyl2, зі вбудованими чотирма копіями генів β -глюкозидази і двома генами асиміляції ксилози та ауксотрофний за гістидином, урацилом і триптофаном [22]. Наявність ауксотрофних маркерів дає змогу відбирати трансформанти без використання антибіотиків або необхідності експресії гетерогенних протеїнів, а включення копій цільових генів до хромосоми є перевагою перед плазмідними транс-

формантами, які потребують постійної наявності антибіотиків для підтримання плазмід. Встановлено, що сконструйований штам *S. cerevisiae* OC2-ABGL4Xyl2 повністю асимілює суміш глюкози і ксилози (80 г/л + 60 г/л) та целобіози і ксилози (90 г/л + 60 г/л) упродовж 48 год з утворенням 55,8 і 57,4 г/л етанолу відповідно [22].

Метаболізм ксилози рекомбінантними штамми *S. cerevisiae* залежить від аерації: у більшості випадків за присутності кисню передусім спостерігається підвищення показників росту, а не синтезу етанолу [23]. Транскриптомний аналіз підтвердив залучення пентози до реакцій окиснювального метаболізму [25]. Методом індукованого мутагенезу з використанням бромистого етидію було отримано мутантний штам *S. cerevisiae* YSX3 з обмеженою дихальною активністю (дихально-дефіцитний штам, або ДД-мутант), який за культивування на ксилозі утворював більше етанолу (0,25 г/г) порівняно з вихідним (0,15 г/г) [25]. Відразу ж постало питання: як довго можна підтримувати бродіння без росту клітин у разі використання ксилози як єдиного джерела вуглецю? Аби відповісти на нього, автори досліджували зброджувальну здатність штамів при послідовних пересівах на моно- і змішаних субстратах [23]. За таких умов ДД-мутант показав стабільний вихід етанолу (0,21, 0,46 і 0,35 г/г) на ксилозі, глюкозі і суміші глюкози та ксилози відповідно [23].

У роботі [21] було висловлено припущення про те, що для підтримання низької концентрації гексози у середовищі й унеможливлення катаболітної репресії мікроорганізми, що споживають пентози, можуть культивуватися спільно з дріжджами, що зброджують гексози. Для перевірки цього припущення досліджували можливість використання консорціуму *E. coli* ZSC113 і *S. cerevisiae* для одержання етанолу з рослинної біомаси. У штам *E. coli* було введено мутації, що унеможливили використання глюкози як субстрату [26]. Штам *S. cerevisiae* утилізує тільки гексози і не має систем для споживання пентоз. Як контрольні використовували природний штам кишкової палички *E. coli* K-12 і рекомбінантні дріжджі *S. cerevisiae* RWB218, здатні метаболізувати ксилозу. Особливість цих досліджень полягала у застосуванні методу динамічного моделювання балансу потоків для вивчення можливості використання змішаних культур субстратселективних мікроорганізмів для поліпшення утилізації суміші глюкози і ксилози та конвертування цих субстратів

у цільовий продукт — етанол. На основі теоретичних розрахунків було визначено оптимальну початкову концентрацію інокуляту для кожного із штамів і час переходу від аеробних до анаеробних умов культивування, що підвищує синтез етанолу. Так, найвищої продуктивності утворення етанолу (1,0 г/л/год) має бути досягнуто у разі використання інокуляту з 0,088 г/л *S. cerevisiae* і 0,012 г/л *E. coli* ZSC113 та переходу до анаеробних умов через 6 год (рис. 5). Дані, що їх наведено у цій роботі, є лише першим кроком у розробленні технології використання мікробних консорціумів для ефективного споживання пентоз і гексоз лігноцелюлозної біомаси [21].

Біосинтез первинних і вторинних метаболітів. Розглянемо приклад інтенсифікації синтезу первинного метаболіту — амінокислоти L-валіну *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 на суміші ростових субстратів [27]. За умов росту *C. glutamicum* на суміші глюкози та глютамату, глюкози й етанолу, ацетату та етанолу відбувається послідовна утилізація субстратів [28, 29]. Відомо, що поглинання глюкози у цих бактерій здійснюється за допомогою ФТС, яка містить глюкозоспецифічну пермеазу ЕП^{Glc}, кодова-

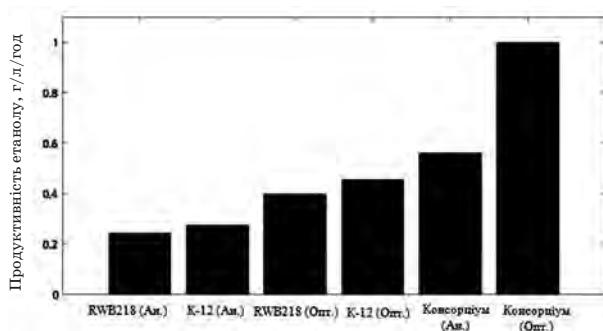


Рис. 5. Порівняння прогнозованої продуктивності утворення етанолу на суміші глюкози і ксилози різними комбінаціями штамів, інокуляту та умов росту:

рекомбінантний штам *S. cerevisiae* RWB218 за анаеробного культивування [RWB218 (Ан.)]; анаеробна культура дикого штаму *E. coli* K-12 [K-12 (Ан.)]; ріст RWB218 з оптимізованою зміною аеробно-анаеробних умов культивування [RWB218 (Опт.)]; ріст K-12 з оптимізованим часом перемикаання аеробно-анаеробних умов [K-12 (Опт.)]; консорціум культур нативного штаму *S. cerevisiae* і рекомбінантного штаму *E. coli* ZSC113 за анаеробного культивування зі внесенням оптимальних кількостей інокуляту [Консорціум (Ан.)]; ріст змішаної культури дріжджів *S. cerevisiae* і *E. coli* ZSC113 за умов внесення оптимальних кількостей інокуляту і зміною аеробного-анаеробного культивування [Консорціум (Опт.)] [21]

ну геном *ptsG*. За наявності глюкози в суміші, наприклад з ацетатом, швидкість споживання глюкози знижується майже вдвічі порівняно з ростом бактерій на моносубстраті глюкозі (4,31 та 10,01 ммоль С/г сухої маси·год), що пояснюється репресією транскрипції *ptsG* специфічним регулятором SugR. Проте на суміші з мальтозою цей показник збільшується у 2 рази (до 7,86 ммоль С/г сухої маси·год), що свідчить про незалежність шляху поглинання мальтози від SugR [30]. Експерименти показали, що з додаванням мальтози до середовища з глюкозою експресія *ptsG* збільшувалась на 125% порівняно з експресією на середовищі з моносубстратом глюкозою [27]. Таким чином, введенням мальтози в суміш глюкози з іншими субстратами можна регулювати швидкість поглинання глюкози і, відповідно, кількість утвореного продукту. Було показано, що наявність 0,5% мальтози у середовищі з ацетатом і глюкозою сприяє ефективному використанню глюкози завдяки зростанню експресії *ptsG* і супроводжується підвищенням синтезу L-валіну (рис. 6).

Синтез ароматичних сполук у *Pseudomonas putida* S12, серед яких важливе місце посідає *n*-гідроксibenзоат, здійснюється через перетворення тирозину або фенілаланіну [31]. Ключові попередники цих ароматичних амінокислот — фосфоенолпіруват (ФЕП), який утворюється з гліцеральдегід-3-фосфату, синтезованого у процесі гліколізу або в пентозофосфатному циклі (ПФЦ), і еритрозо-4-фосфат (Е4Ф), утворення якого відбувається виключно у ПФЦ. Низька активність ензимів ПФЦ у *P. putida*, а отже й утворення Е4Ф та ФЕП може бути «вузьким місцем» для ефективного синтезу ароматичних вуглеводнів [31]. Було висловлено припущення, що ефективність синтезу Е4Ф та ФЕП можна підвищити стимуляцією

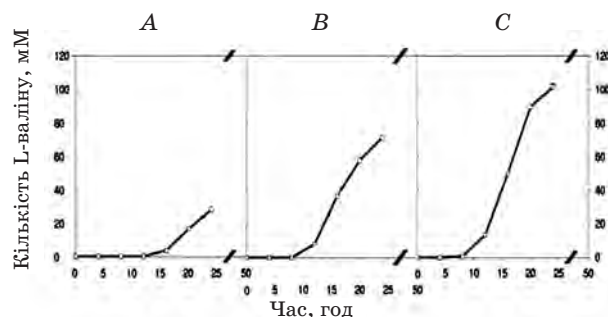


Рис. 6. Синтез L-валіну на суміші 4,5% глюкози і 2,0% ацетату (A); 4,5% мальтози і 2,0% ацетату (B); 4,0% глюкози, 0,5% мальтози і 2,0% ацетату (C) [27]

ПФЦ з використанням пентоз як субстрату. Проте оскільки *P. putida* S12 не притаманна здатність до утилізації пентоз, дослідникам довелося методами генної інженерії надати їй таких властивостей [32]. У результаті отримали рекомбінантний штам *P. putida* S12pal_hylB7. Дослідження синтезу *n*-гідроксibenзоату проводили, використовуючи моносубстрати ксилозу, гліцерол, глюкозу та їх суміші. За культивування *P. putida* S12pal_hylB7 у хемостаті на гліцеролі або глюкозі як лімітуючому субстраті з періодичним внесенням ксилози синтез цільового продукту підвищувався порівняно з відповідними моносубстратами [31].

У роботі [33] досліджували можливість використання гліцеролу як моносубстрату, так і в суміші з вуглеводами (декстроза, ксилоза) для синтезу тригліцеридів *Rhodotorula glutinis* ATCC 204091. Культивування дріжджів на суміші гліцеролу та декстрази супроводжувалося збільшенням як концентрації біомаси, так і вмісту в ній ліпідів порівняно з використанням моносубстратів.

Ловастатин ($C_{24}H_{36}O_5$, Мевінолін, Монаколін К) — конкурентний інгібітор (S)-3-гідроксиметилглутарил-КоА-редуктази, що широко використовується як препарат для зниження ендогенного рівня холестеролу в організмі людини [34]. Цей вторинний метаболіт синтезується грибами *Aspergillus terreus* і *Monascus ruber* у вигляді β -гідроксикислоти. Попередні дослідження було присвячено оптимізації умов біосинтезу ловастатину на моносубстратах [35, 36]. Зокрема, було встановлено, що найбільш придатними є субстрати, що повільно метаболізуються, такі як лактоза, фруктоза і гліцерол. При цьому варто зазначити, що синтез ловастатину *A. terreus* часто супроводжується утворенням як побічного продукту (+)-геодину, що наразі ще недостатньо вивчений. Беручи до уваги, що синтез ловастатину пов'язаний з ростом культури, а (+)-геодину — ні [35], було зроблено припущення, що внесення різних субстратів у різні фази росту може впливати на утворення цих метаболітів. Спочатку як основне джерело вуглецю використовували лактозу, а гліцерол періодично (кожні 48 год) додавали до середовища. Встановлено, що за таких умов першорядне значення мав час введення додаткового джерела вуглецю: найвища концентрація ловастатину (122,4 мг/л) спостерігалась у варіанті, в якому додавання гліцеролу здійснювали на 48-й год росту, коли лактоза ще була наявна у середовищі. У разі використання як основного субстрату гліцеролу найвищий

рівень ловастатину (104,5 мг/л) було зафіксовано при внесенні лактози на 72-й год росту. Варто зазначити, що за культивування *A. terreus* на лактозі як моносубстраті максимальна концентрація ловастатину не перевищувала 110 мг/л [37].

На наступному етапі досліджували вплив додаткового внесення одного або обох субстратів у певний період росту *A. terreus* на суміші лактози та гліцеролу [34]. Так, було встановлено, під час росту на суміші субстратів з додаванням лактози або гліцеролу рівень ловастатину не перевищував 150 мг/л, тимчасом як почергова (кожні 48 год) зміна лактози і гліцеролу як додаткового субстрату супроводжувалася підвищенням концентрації продукту до 161,8 мг/л.

Застосування суміші субстратів для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) використовують у багатьох галузях народного господарства, зокрема для підвищення нафтовидобутку, надання специфічних смакових і структурних властивостей продуктам харчування, створення нових високоефективних форм фармацевтичних препаратів, а також у процесах біоремедіації екосистем [38–46]. Такого широкого застосування мікробні ПАР набули завдяки біодеградабельності, низькій токсичності, стабільності фізико-хімічних властивостей у широкому діапазоні рН і температури тощо [40–48].

Незважаючи на комерційно привабливі властивості мікробних ПАР та їх значні переваги порівняно із синтетичними аналогами, факторами, що стримують впровадження технологій мікробних ПАР у світі, є великі витрати на біосинтез (сировина, енергетика), виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо висока концентрація синтезованих ПАР [47, 49, 50].

Донедавна у літературі було небагато повідомлень про використання змішаних субстратів для синтезу поверхнево-активних речовин, однак наразі такий відносно простий шлях інтенсифікації синтезу ПАР привертає дедалі більше уваги.

Одними з практично цінних ПАР мікробного походження є манозилеритритолліпіди (МЕЛ), що синтезуються дріжджами роду *Pseudozyma* за росту переважно на рослинних оліях (соевій, шафрановій та ін.) [51, 52].

Morita зі співавт. [51] показали, що додавання манози, еритритолу або глюкози до

основного джерела вуглецю (олії шафрану) більшою чи меншою мірою стимулювало синтез МЕЛ *P. siamensis* CBS 9960 (рис. 7).

Разом з тим ці самі автори в одній із попередніх публікацій повідомляють, що для іншого штаму (*P. antarctica* JCM 10317), культивування якого проводили на гліцеролі замість рослинної олії, додавання глюкози як другого джерела вуглецю виявилось неефективним [52]. Проте, як і для *P. siamensis* CBS 9960, з додаванням манози та еритритолу спостерігалось збільшення виходу продукту майже на 50 %.

Іншим прикладом успішного використання суміші субстратів для інтенсифікації біосинтезу ПАР стало культивування *Rhodococcus* spp. MTCC 2574 на манітолі з додатковим внесенням гексадекану як індуктора [53]: за таких умов концентрація ПАР підвищилася в 3,4 раза (до 10,9 г/л). Варто відзначити, що концентрація гексадекану в середовищі значно перевищувала концентрацію основного джерела вуглецю — манітолу (63,8 г/л та 1,6 г/л відповідно), що свідчить про необхідність внесення вуглеводнів для ефективнішого біосинтезу ПАР.

Штам *Brevibacterium aureum* MSA13 синтезує новий поверхнево-активний ліпopeпид — бревифактин [54]. Додавання 1% оливкової олії під час культивування *B. aureum* на мелясі супроводжувалося збільшенням показників утворення бревифактину на 33–47% порівняно з культивуванням штаму на середовищі без олії.

Софороліпіди (СЛ) набули застосування в різних галузях промисловості, таких як фармацевтична, медична, косметична, виробництво мийних засобів тощо [41, 44, 55–57]. Синтез софороліпідів також можна інтенсифікувати, використовуючи для вирощування продуцентів змішані субстрати, зокрема гідрофобні й гідрофільні [40]. Так,



Рис. 7. Синтез МЕЛ *P. siamensis* CBS 9960 за умов росту на змішаних субстратах [51]

культивування *Candida lipolytica* UCP0988 на суміші олії канолі (10%) та глюкози (10%) дало змогу підвищити концентрацію синтезованих СЛ до 8 г/л [40], вирощування *C. bombicola* ATCC 22214 на глюкозі (оптимальна початкова концентрація 30 г/л) з періодичним внесенням рапсової олії та підтриманням оптимального рН упродовж 8 діб супроводжувалося підвищенням кількості синтезованих СЛ у 1,8 раза [56].

У роботі [55] описано підвищення синтезу софороліпідів *Starmerella bombicola* NRRLY-17069 (телеоморф штаму *C. bombicola* ATCC 22214) на суміші гідрофільних субстратів (глюкоза та депротеїнізована сироватка у концентрації 10 та 90 г/л відповідно). За таких умов спостерігали підвищення кількості синтезованих СЛ до 14,88 г/л порівняно з 5,62 г/л СЛ на сироватці як моносубстраті (100 г/л). Проте подальші дослідження показали необхідність введення у середовище гідрофобного компонента. За культивування *S. bombicola* у дослідному ферментері (1 л) на середовищі оптимізованого складу (90 г/л депротеїнізованої сироватки, 10 г/л глюкози, 2 г/л дріжджового екстракту і 100 г/л олеїнової кислоти) утворювалося 26 г/л, а за умови контролю рівня рН — до 33 г/л софороліпідів [55].

Слід зазначити, що за умов росту продуцентів на суміші субстратів, як і на моносубстратах, ефективність біосинтезу залежить від рН середовища, температури, співвідношення вуглецю й азоту, наявності тих чи інших іонів металів у середовищі тощо. Крім того, як свідчать дані літератури [58], важливими факторами, що впливають на синтез вторинних метаболітів за таких умов, є концентрація кожного із субстратів у суміші, їх співвідношення, а також час внесення додаткового субстрату.

У дослідженні синтезу рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa* SP4 на пальмовій олії за внесення глюкози як допоміжного субстрату Pansiripat і спіавт. [59] показали, що штам повністю утилізував доданий гідрофільний субстрат за всіх співвідношень олії та гексози, проте найвищий вихід ПАР спостерігали за співвідношення моносубстратів 40:1 відповідно. Автори повідомляють, що кількість олії в усіх варіантах середовищ була однаковою (6 г/л), а глюкози, відповідно, з кожним новим співвідношенням збільшувалась, тому зниження показників синтезу могло бути зумовлено інгібуючим впливом надлишкового субстрату. Таким чином, було показано можливість використання змішаного вуглецевого суб-

страту для синтезу рамноліпідів *P. aeruginosa* SP4, але, аналогічно до даних роботи [58], синтез ПАР залежав саме від концентрації внесених субстратів. Так, для синтезу софороліпідів оптимальним змішаним субстратом була суміш меляси (50 г/л) із соєвою олією (50 г/л). Однак це не дає підстав вважати ефективним співвідношення концентрацій моносубстратів 1:1, оскільки підвищення вмісту кожного з них у суміші 100 і 150 г/л супроводжувалося зниженням показників синтезу ПАР [58].

Утім, автори робіт [58–60], повідомляючи про підвищення синтезу вторинних метаболітів на суміші субстратів, не враховують кількість вуглецю, що міститься у змішаному і моносубстратах. Разом з тим не можна порівнювати ефективність використання суміші субстратів, якщо концентрація вуглецю в ній не еквімолярна такій у моносубстратах.

Цікавим аспектом у використанні змішаних джерел вуглецю є залежність біосинтезу ПАР від послідовності внесення кожного із субстратів. Субстрати, які додатково вносяться у середовище на різних фазах росту продуцентів, називають «додатковими джерелами вуглецю» і не вживають термін «змішані субстрати». Це дійсно так, оскільки з початку процесу і упродовж певного часу культивування здійснюється на середовищах з моносубстратами. Змішаними ж джерелами вуглецю доцільно називати такі, в яких обидва субстрати вносяться одночасно.

У роботі [60] автори повідомляють, що внесення глюкози на початку культивування *P. putida* 300-B, а гексадекану — в середині експоненційної фази приводило до збільшення синтезу рамноліпідів порівняно з умовами, у яких ці два субстрати вносили одночасно. Подібний ефект спостерігали за використання замість гексадекану пересмажених олій, а також відходів їх рафінації (табл. 2).

Відомо, що використовуючи різні підходи до регуляції біосинтезу (у тому числі й внесення додаткових джерел вуглецю), можна не лише підвищити вихід продукту, а й модифікувати структуру отримуваних метаболітів, збільшити молекулярну масу, поліпшуючи тим самим їхні властивості [61, 62].

Так, софороліпіди складаються із залишків софорози, з'єднаних глікозидними зв'язками з жирними кислотами. Вони можуть бути двох типів: кислі й лактонові. Перші мають вільну карбоксильну групу, а другі становлять макроцикл — лактон, замкнутий через 4'-ОН-групу софорози [61, 62].

Таблиця 2. Показники синтезу рамноліпідів *P. putida* 300-B за різних комбінацій змішаних субстратів [60]

Досліджуваний субстрат (10 г/л)	Концентрація рамноліпідів, г/л	
	За одночасного внесення з глюкозою*	За внесення в експоненційній фазі росту**
n-Гексадекан	2,2	2,6
Парафін	2,4	3,5
Пересмажена соєва олія	3,4	4,1
Відходи рафінації соєвої олії	2,1	2,7
Пересмажена кукурудзяна олія	2,8	4,0
Відходи рафінації кукурудзяної олії	2,2	2,9

Примітка. * Внесення глюкози разом із досліджуваним субстратом на початку культивування. Концентрація глюкози 1 г/л.

** Внесення глюкози на початку культивування, а гідрофобного субстрату — в експоненційній фазі росту.

Встановлено, що незалежно від джерела вуглецю в середовищі (глюкоза, суміш глюкози та соєвої олії, глюкози та гексадекану) синтезується суміш софороліпідів [62].

Прикладом впливу на структуру цільового продукту можна також вважати культивування продуцента софороліпідів *C. bombicola* ATCC 22214 на глюкозі з додаванням пальмітинової (C16:0), стеаринової (C18:0), олеїнової (C18:1) або лінолевої (C18:2) кислот [61]. Припускають, що природа жирної кислоти в середовищі може впливати на структуру бокових ланцюгів синтезованих СЛ. Експерименти показали, що в разі внесення в середовище з глюкозою жирних кислот концентрація СЛ досягала (г/л): пальмітинової — 42; стеаринової — 77; олеїнової — 98; лінолевої — 40. Як і передбачали, у складі бічних ланцюгів містилися переважно ті жирні кислоти, що їх використовували як додаткові субстрати. Встановлено, що незалежно від природи жирної кислоти, понад 92% утворених молекул СЛ перебували в конформації лактону, а в разі використання олеїнової кислоти — усі 100% [61].

Наші дослідження підтвердили можливість застосування суміші ростових субстратів (гексадекан, гліцерол, етанол) для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних

речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 [63–66]. Показано, що за умов росту досліджуваних штамів на суміші енергетично надлишкового (гексадекан) і енергетично дефіцитних (етанол, гліцерол) субстратів показники синтезу ПАР були в 1,5–3,5 раза вищі, ніж на відповідних моносубстратах. Встановлено залежність синтезу ПАР від способу підготовки інокуляту і концентрації моносубстратів у суміші.

У роботах [40, 51–56, 58, 60] дослідники емпірично визначали як концентрацію субстратів у суміші, так, власне, і вибір моносубстратів. Звертає на себе увагу надзвичайно висока (іноді 100 г/л) концентрація використовуваних субстратів. У цьому разі підвищення синтезу ПАР на суміші субстратів навіть у разі порівняння з культивуванням на моносубстратах не є показовим, адже основним критерієм ефективності змішаних субстратів є максимальна конверсія вуглецю в цільовий продукт, як це було встановлено нами раніше для мікробного екзополісахариду етаполану [38, 67].

Для підвищення трансформації вуглецю суміші субстратів у цільовий продукт необхідним є встановлення оптимального для його синтезу молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші [38, 67]. 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. Для розрахунку оптимального співвідношення моносубстратів потрібно знати шляхи їх метаболізму, структуру синтезованих ПАР, а також співвідношення Р/О.

Наші дослідження показали, що у штамів IMB Ac-5017 і IMB B-7241 катаболізм енергетично дефіцитного субстрату гліцеролу до дигідроксіацетонфосфату (інтермедіат гліколізу) може здійснюватися двома шляхами: через гліцерол-3-фосфат і дигідроксіацетон [68]. Окиснення гліцеролу до дигідроксіацетону в обох штамів каталізується піролохінолінхінонзалежними гліцеролдегідрогеназами і нітрозоз-*N,N*-діметиланілінзалежними алкогольдегідрогеназами. Як анаплеротичні шляхи за умов росту на гліцеролі в *R. erythropolis* IMB Ac-5017 функціонують гліоксилатний цикл і фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксилазна реакція, у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 — тільки ФЕП-карбоксилазна реакція.

Раніше було встановлено [69–71], що під час росту на гексадекані у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 функціонує повний цикл трикарбонових кислот (ЦТК), однак низька активність 2-оксоглутаратдегідрогенази (активність 10–20 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну) свідчить, що ЦТК виконує переважно біосинтетичну роль; поповнення пулу С₄-дикарбонових кислот здійснюється у гліоксилатному циклі. У синтезі вуглеводів беруть участь обидва ключові ензими гліоксигенезу: ФЕП-карбоксикиназа і ФЕП-синтетаза. Ензиматичні дослідження також підтвердили здатність штаму IMB Ac-5017 до синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів (активність трегалозофосфатсинтази 66–679 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну).

Здійснюючи теоретичні розрахунки, ми зробили такі припущення: 1) гексадекан використовується переважно як джерело енергії, а на синтез біомаси і трегалозоміколатів витрачається вуглець гліцеролу; 2) міколовою кислотою у складі трегалозоміколатів є 3-гідрокси-2-додеканоїлдокозанова кислота, яка містить 34 атоми вуглецю; 4) співвідношення Р/О дорівнює 2 [66].

Теоретичний розрахунок енергетичних потреб синтезу трегалозоміколатів *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на суміші енергетично надлишкового гексадекану і енергетично дефіцитного гліцеролу показав, що оптимальним для синтезу ПАР є молярне співвідношення субстратів 1:7. За таких умов спостерігали збільшення синтезу ПАР у 2,6–3,5 раза порівняно з показниками на відповідних моносубстратах [66].

Ензиматичні дослідження свідчать, що підвищення синтезу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на суміші гексадекану і гліцеролу зумовлено збільшенням в 1,3–2,4 раза активності ензимів їх біосинтезу, а також одночасним функціонуванням двох анаплеротичних шляхів (гліоксилатного циклу і ФЕП-карбоксилазної реакції) [66].

Таким чином, наведені сучасні літературні та власні експериментальні дані щодо використання мікроорганізмами суміші ростових субстратів як у природних умовах, так і в спрямованих біотехнологічних процесах показують, що культивування мікроорганізмів на змішаних ростових субстратах супроводжується підвищенням біосинтезу цільового продукту.

Детальне вивчення репресії катаболічних шляхів дасть змогу краще зрозуміти природу споживання суміші субстратів та інтенсифікувати процеси використання змі-

шаних субстратів, що, у свою чергу, дозволить підвищити вихід практично цінних мікробних метаболітів (амінокислот, ПАР, етанолу, 2,3-бутандіолу тощо). Особливу увагу слід приділити й розкладанню ксенобіотичних речовин, які у великих кількостях утворюються в ході антропогенної діяльності і біодеградація яких ускладнена наявністю інших компонентів. Відповідно, правильно підібрані умови дадуть можливість вирішити цю проблему накопичення токсичних речовин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т. П., Коваленко М. О. Використання мікроорганізмами суміші ростових та неростових субстратів // Мікробіол. журн. — 2004. — Т. 66, № 6. — С. 80–100.
2. Rojo F. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment // FEMS Microbiol. Rev. — 2010. — V. 34, N 5. — P. 658–684.
3. Sasaki M., Jojima T., Kawaguchi H. et al. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — V. 85, N 1. — P. 105–115.
4. Ji X. J., Nie Z. K., Huang H. et al. Elimination of carbon catabolite repression in *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production from glucose-xylose mixtures // Ibid. — 2011. — V. 89, N 4. — P. 1119–1125.
5. Kim J. H., Block D. E., Mills D. A. Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass // Ibid. — 2010. — V. 88, N 5. — P. 1077–1085.
6. Jojima T., Omumasaba C. A., Inui M., Yukawa H. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook // Ibid. — 2010. — V. 85, N 3. — P. 471–480.
7. Egli T. How to live at very low substrate concentration // Water Res. — 2010. — V. 44, N 17. — P. 4826–4837.
8. Zhou Y. Y., Chen D. Z., Zhu R. Y., Chen J. M. Substrate interactions during the biodegradation of BTEX and THF mixtures by *Pseudomonas oleovorans* DT4 // Bioresour. Technol. — 2011. — V. 102, N 12. — P. 6644–6649.
9. Chen J. M., Zhou Y. Y., Chen D. Z., Jin X. J. A newly isolated strain capable of effectively degrading tetrahydrofuran and its performance in a continuous flow system // Ibid. — 2010. — V. 101, N 16. — P. 6461–6467.
10. Alexieva Z., Gerginova M., Manasiev J. et al. Phenol and cresol mixture degradation by the yeast *Trichosporon cutaneum* // Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 35, N 11. — P. 1297–1301.
11. Alexieva Z., Gerginova M., Zlateva P., Peneva N. Comparison of growth kinetics and phenol metabolizing enzymes of *Trichosporon cutaneum* R57 and mutants with modified degradation abilities // Enz. Microb. Technol. — 2004. — V. 3, N 4. — P. 242–247.
12. Zlateva P., Gerginova M., Manasiev Y. et al. Kinetic parameters determination of the phenolic derivatives assimilation by *Trichosporon cutaneum* R57 // Biotechnol. Biotechnol. Equip. — 2005. — V. 19, N 1. — P. 93–97.
13. Del Castillo T., Ramos J. L. Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways // J. Bacteriol. — 2007. — V. 189, N 18. — P. 6602–6660.
14. Mouttaki H., Nanny M. A., McInerney M. J. Use of benzoate as an electron acceptor by *Syntrophus aciditrophicus* grown in pure culture with crotonate // Environ. Microbiol. — 2008. — V. 10, N 12. — P. 3265–3274.
15. Liang Y., Zeng F., Qiu G. et al. Co-metabolic degradation of dimethoate by *Raoultella* sp. X1 // Biodegradation. — 2009. — V. 20, N 3. — P. 363–373.
16. Kim J. H., Block D. E., Shoemaker S. P., Mills D. A. Atypical ethanol production by carbon catabolite derepressed lactobacilli // Bioresour. Technol. — 2010. — V. 101, N 22. — P. 8790–8797.
17. Kumar S., Gummadi S. N. Metabolism of glucose and xylose as single and mixed feed in *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: production of industrially important metabolites // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2011. — V. 89, N 5. — P. 1405–1415.
18. Ji X. J., Huang H., Du J. et al. Development of an industrial medium for economical 2, 3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca* // Bioresour. Technol. — 2009. — V. 100, N 21. — P. 5214–5218.
19. Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production // Science. — 2007. — V. 315, N 5813. — P. 801–804.
20. Bera A. K., Sedlak M., Khan A., Ho N. W. Establishment of L-arabinose fermentation in glucose/xylose co-fermenting recombinant

- Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) by genetic engineering // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 87, N 5. — P. 1803–1811.
21. Hanly T. J., Henson M. A. Dynamic flux balance modeling of microbial co-cultures for efficient batch fermentation of glucose and xylose mixtures // Biotechnol. Bioeng. — 2011. — V. 108, N 2. — P. 376–385.
 22. Saitoh S., Hasunuma T., Tanaka T., Kondo A. Co-fermentation of cellobiose and xylose using beta-glucosidase displaying diploid industrial yeast strain OC-2 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 87, N 5. — P. 1975–1982.
 23. Kim S. R., Lee K. S., Choi J. H. et al. Repeated-batch fermentations of xylose and glucose-xylose mixtures using a respiration-deficient *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism // J. Biotechnol. — 2010. — V. 150, N 3. — P. 404–407.
 24. Nakamura N., Yamada R., Katahira S. et al. Effective xylose/cellobiose co-fermentation and ethanol production by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of β -glucosidase on its cell surface // Enzyme Microbiol. Technol. — 2008. — V. 43, N 3. — P. 233–236.
 25. Jin Y. S., Laplaza J. M., Jeffrie T. W. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — V. 70, N 11. — P. 6816–6825.
 26. Eiteman M., Lee S., Altman E. A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively // J. Biol. Eng. — 2008. — V. 2, N 3. — P. 8–13.
 27. Krause F. S., Henrich A., Blombach B. et al. Increased glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by use of maltose, and its application for the improvement of L-valine productivity // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — V. 76, N 1. — P. 370–374.
 28. Arndt A., Aachter M., Ishige T. et al. Ethanol catabolism in *Corynebacterium glutamicum* // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 15, N 4. — P. 222–233.
 29. Kotrbova-Kozak A., Kotrba P., Inui M. et al. Transcriptionally regulated *adhA* gene encodes alcohol dehydrogenase required for ethanol and *n*-propanol utilization in *Corynebacterium glutamicum* R // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 76, N 6. — P. 1347–1356.
 30. Engels V., Wendisch V. F. The DeoR-type regulator SugR represses expression of *ptsG* in *Corynebacterium glutamicum* // J. Bacteriol. — 2007. — V. 189, N 8. — P. 2955–2966.
 31. Meijnen J. P., Verhoef S., Briedjal A. A. et al. Improved *p*-hydroxybenzoate production by engineered *Pseudomonas putida* S12 by using a mixed-substrate feeding strategy // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2011. — V. 90, N 3. — P. 885–893.
 32. Verhoef S., Ballerstedt H., Volkers R. J. et al. Comparative transcriptomics and proteomics of *p*-hydroxybenzoate producing *Pseudomonas putida* S12: novel responses and implications for strain improvement // Ibid. — 2010. — V. 87, N 2. — P. 679–690.
 33. Easterling E. R., French W. T., Hernandez R., Licha M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis* // Bioresour. Technol. — 2009. — V. 100, N 1. — P. 356–361.
 34. Pecyna M., Bizukoje M. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* with the simultaneous use of lactose and glycerol in a discontinuous fed-batch culture // J. Biotechnol. — 2011. — V. 151, N 1. — P. 77–86.
 35. Bizukoje M., Ledakowicz S. Simultaneous biosynthesis of (+)-geodin by a lovastatin producing fungus *Aspergillus terreus* in batch and fed-batch culture in the stirred tank bioreactors // Ibid. — 2007. — V. 132, N 4. — P. 453–460.
 36. Jia Z., Zhang X., Zhao Y., Cao X. Enhancement of lovastatin production by supplementing polyketide antibiotics to the submerged culture of *Aspergillus terreus* // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2010. — V. 160, N 7. — P. 2014–2025.
 37. Bizukoje M., Ledakowicz S. Amacrokinetic modelling of the biosynthesis of lovastatin by *Aspergillus terreus* // J. Biotechnol. — 2007. — V. 130, N 4. — P. 422–435.
 38. Підгорський В. С., Ігуминська Г. О., Пірог Т. П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.
 39. Bordoloi N. K., Konwar B. K. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. — 2008. — V. 63, N 1. — P. 73–82.
 40. Sarubbo L. A., Farias C. B., Campos-Takaki G. M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica* // Curr. Microbiol. — 2007. — V. 54, N 1. — P. 68–73.
 41. Banat I. M., Franzetti A., Gandolfi I. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // J. Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 87, N 2. — P. 427–444.
 42. Abdel-Mawgoud A. M., Lüpigne F., Düziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles // Ibid. — 2010. — V. 86, N 5. — P. 1323–1336.
 43. Müller M. M., Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production // Ibid. — 2011. — V. 91, N 2. — P. 251–264.
 44. Nguyen T. T., Sabatini D. A. Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications // Int. J. Mol. Sci. — 2011. — V. 12, N 2. — P. 1232–1244.
 45. Singh A., Van Hamme J. D., Ward O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology Part2 Application aspects // Biotechnology Advances — 2007. — V. 25. — P. 99–121.
 46. Raaijmakers J. M., de Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics // FEMS Microbiol. Rev. — 2010. — V. 34, N 6. — P. 1037–1062.

47. Пирог Т. П., Ігнатенко С. В. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 4. — С. 29–38.
48. Wan Nawawi W. M., Jamal P., Alam M. Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production // Bioresour. Technol. — 2010. — V. 101, N 23. — P. 9241–9247.
49. Makkar R. S., Cameotra S. S., Banat I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production // AMB Express — 2011. — 1: 5. doi: 10.1186/2191-0855-1-5.
50. Thavasi R., Jayalakshmi S., Banat I. M. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil // Bioresour. Technol. — 2011. — V. 102, N 3. — P. 3366–3372.
51. Morita T., Konishi M., Fukuoka T. et al. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and their interfacial properties // J. Biosci. Bioeng. — 2008. — V. 105, N 5. — P. 493–502.
52. Morita T., Konishi M., Fukuoka T. et al. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317 // Ibid. — 2007. — V. 104, N 1. — P. 78–81.
53. Mutalik S. R., Vaidya B. K., Joshi R. M. et al. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574 // Bioresour. Technol. — 2008. — V. 99, N 16. — P. 7875–7880.
54. Seghal K. G., Anto T. T., Selvin J. et al. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture // Ibid. — 2010. — V. 101, N 7. — P. 2389–2396.
55. Daverey A., Pakshirajan K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization // Colloids Surf. B. Biointerfaces. — 2010. — V. 79, N 1. — P. 246–253.
56. Kim Y. B., Yun H. S., Kim E. K. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture // Bioresour. Technol. — 2009. — V. 100, N 23. — P. 6028–6032.
57. Van Bogaert I. N., Saerens K., De Muynck C. et al. Microbial production and application of sophorolipids // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 76, N 1. — P. 23–34.
58. Daverey A., Pakshirajan K. Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium // Appl. Bioch. Biotechnol. — 2010. — V. 160, N 7. — P. 2090–2101.
59. Pansiripat S., Pornsunthorntawe O., Rujiravanit R. et al. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effect of oil-to-glucose ratio // Biochem. Eng. J. — 2010. — V. 49, N 1. — P. 185–191.
60. Raza Z. A., Khan M. S., Khalid Z. M. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant // Proc. Biochem. — 2007. — V. 42, N 4. — P. 686–692.
61. Ashby R. D., Solaiman D. K., Foglia T. A. Property control of sophorolipids: influence of fatty acid substrate and blending // Biotechnol. Lett. — 2008. — V. 30, N 6. — P. 1093–1100.
62. Hu Y., Ju L. K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS // Enzyme Microb. Technol. — 2001. — V. 29. — P. 593–601.
63. Білець І. В., Конон А. Д., Пирог Т. П. Вплив молярного співвідношення концентрацій моно-субстратів у суміші на синтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Харч. пром-сть. — 2011. — № 10. — С. 127–132.
64. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Конон А. Д. и др. Синтез поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 в среде с глицерином // Микробиол. журн. — 2012. — Т. 74, № 1. — С. 20–27.
65. Шулякова М. О., Пирог Т. П., Шевчук Т. А. Деякі закономірності синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 на суміші ростових субстратів // Микробиол. біотехнол. — 2012. — № 1 (17). — С. 57–65.
66. Пирог Т. П., Конон А. Д., Шевчук Т. А., Білець І. В. Інтенсифікація синтезу поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на смеси гексадекана и глицерина // Микробиология. — 2012. — Т. 81, № 5. — С. 611–618.
67. Пирог Т. П., Коваленко М. А., Кузьминская Ю. В., Криштаб Т. П. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на смеси этанола и глюкозы // Там же. — 2003. — Т. 72, № 3. — С. 348–355.
68. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Шулякова М. А. Метаболизм глицерина у продуцентів поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 // Микробиол. журн. — 2012. — Т. 74, № 4. — С. 29–36.
69. Пирог Т. П., Корж Ю. В., Шевчук Т. А., Тарасенко Д. А. Особливості С₂-метаболізму и интенсифікація синтезу поверхностно-активних речовин у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, ростущего на етанолі // Микробиология. — 2008. — Т. 77, № 6. — С. 749–757.
70. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Клименко Ю. О. Особливості окиснення алканів у *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 — продуцента поверхнево-активних речовин // Микробиол. журн. — 2009. — Т. 71, № 4. — С. 9–13.
71. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Клименко Ю. О., Тарасенко Д. О. Особливості синтезу трегалозоміколатів за різних умов росту *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі і гексадекані // Харч. пром-сть. — 2009. — № 8. — С. 11–14.

СМЕШАННЫЕ СУБСТРАТЫ В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Т. П. Пирог
М. А. Шулякова
Т. А. Шевчук

Национальный университет
пищевых технологий, Киев, Украина

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

В обзоре представлены данные литературы и результаты собственных экспериментальных исследований об использовании смеси субстратов для интенсификации технологий микробного синтеза полезных продуктов брожения (этанол, молочная кислота, бутандиол), первичных (аминокислоты, *n*-гидроксibenzoат, триглицериды) и вторичных (ловастатин, поверхностно-активные вещества) метаболитов, а также биodeградации ксенобиотиков ароматической природы (бензол, крезолы, фенолы, толуол) и пестицидов (диметоат).

Значительное внимание уделено установленным в последние годы молекулярным механизмам, лежащим в основе явления катаболической репрессии у грамположительных (*Bacillus subtilis*) и грамотрицательных (*Pseudomonas*, *Escherichia coli*) бактерий, а также дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и использованию этих данных для разработки технологий утилизации растительной биомассы с получением промышленно важных метаболитов.

Рассмотрены стратегии выживания гетеротрофных микроорганизмов в природных олиготрофных условиях, в частности одновременное использование нескольких субстратов, благодаря чему улучшаются кинетические характеристики и усиливается конкурентное преимущество, а также обеспечивается значительная метаболическая/физиологическая гибкость.

Суммированы собственные экспериментальные данные об использовании смеси ростовых субстратов для интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. Установлена зависимость синтеза поверхностно-активных веществ на смеси энергетически избыточного (гексакан) и энергетически дефицитных (глицерол, этанол) субстратов от способа подготовки инокулята, концентрации моносубстратов в смеси, а также их молярного соотношения.

Ключевые слова: смешанные субстраты, катаболическая репрессия, интенсификация биосинтеза, биodeградация ксенобиотиков, утилизация растительной биомассы, поверхностно-активные вещества.

MIXED SUBSTRATES IN ENVIRONMENT AND BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES

T. P. Pirog
M. O. Shulyakova
T. A. Shevchuk

National University of Food Technologies,
Kyiv, Ukraine

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

The modern literature and own experimental data on the use of substrates' mixtures for intensification of microbial synthesis technologies of practically valuable fermentation products (ethanol, lactic acid, butanediol), primary (amino acids, *n*-hydroxybenzoate, triglycerides) and secondary (lovastatin, surfactants) metabolites as well as for intensification of biodegradation of aromatic xenobiotics (benzene, cresols, phenols, toluene) and pesticides (dimethoate) are presented.

Special attention is paid on the molecular mechanisms that were established in recent years and underlying the phenomenon catabolic repression in Gram-positive (*Bacillus subtilis*) and Gram-negative (*Pseudomonas*, *Escherichia coli*) bacteria and yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and on the use of these data to develop technologies for utilization of plant biomass to produce industrially important metabolites.

The survival strategies of heterotrophic microorganisms in natural oligotrophic environments are considered, including the simultaneous use of multiple substrates, allowing improved kinetic characteristics that give them a competitive advantage, also provided significant metabolic/physiological flexibility.

The own experimental data on the use of mixtures of growth substrates for the intensification of surfactants' synthesis of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 are summarized. The dependence of the synthesis of surfactants in a mixture of energy excess (hexadecane) and energy deficient (glycerol, ethanol) substrates on the way of inoculum preparation, concentration of mono-substrates in the mixture, and their molar ratio were determined.

Key words: mixed substrates, catabolic repression, intensification of biosynthesis, biodegradation of xenobiotics, utilization of plant biomass, surfactants.