

INTENSIFICATION OF SYNTHESIS OF PRACTICALLY IMPORTANT MICROBIAL METABOLITES ON SUBSTRATES MIXTURE

T. Pirog, A. Gershtman, Yu. Penchuk

National University of Food Technologies

Key words:

Mixture of growth substrates

Increasing the efficiency of microbial technology

Article history:

Received 05.07.2018

Received in revised form 27.07.2018

Accepted 31.08.2018

Corresponding author:

T. Pirog

E-mail:

npnuht@ukr.net

ABSTRACT

Cultivation of microorganisms on mixture of growth substrates allows to avoid unproductive loss of carbon and energy that occurs when using monosubstrates, and also to improve efficiency of transformation of carbon substrates into biomass and to intensify synthesis of secondary metabolites.

The paper analyzes the modern scientific literature of last two or five years concerning the increase of synthesis on the mixed substrates (including industrial waste) of primary (organic acids, lipids, enzymes), secondary (polyhydroxy-alkanoates, polysaccharides, surface-active substances) metabolites, and also bioethanol and biohydrogen. Using mixture of substrates in microbial technologies enables to increase the rates of synthesis of practically valuable metabolites by 1.5—10 times compared with cultivation producers on corresponding monosubstrates, and in some cases even regulate the composition and properties of final product.

Own experimental data on synthesis intensification on mixture of industrial waste (frying sunflower oil, waste of biodiesel production, molasses) of microbial exopolysaccharide ethapolan (producer *Acinetobacter* sp. IMV B-7005) and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants are presented. Unlike most scientists who empirically establish both the concentration of substrates in the mixture and the choice of monosubstrates, in our studies to increase the carbon transformation of substrates mixture into final product, the molar ratio of monosubstrate concentrations in mixture was established on the basis of theoretical calculations of the energy requirement for process biosynthesis. In addition, using mixture of waste to obtain microbial surfactants will not only reduce cost of final product, but also utilize toxic industrial waste and increase profitability of biodiesel production.

ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ ПРАКТИЧНО ВАЖЛИВИХ МІКРОБНИХ МЕТАБОЛІТІВ НА СУМІШІ СУБСТРАТІВ

Т.П. Пирог, А.Ю. Герштман, Ю.М. Пенчук

Національний університет харчових технологій

Культивування мікроорганізмів на суміші ростових субстратів дає змогу уникнути непродуктивних витрат вуглецю та енергії, які мають місце при використанні моносубстратів, а також підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у біомасу та інтенсифікувати синтез вторинних метаболітів.

У статті проаналізовано сучасну наукову літературу останніх двох-п'яти років щодо підвищення синтезу на змішаних субстратах (у тому числі й промислових відходах) первинних (органічні кислоти, ліпіди, ферменти), вторинних (полігідроксикарбонати, полісахариди, поверхнево-активні речовини) метаболітів, а також біоетанолу і біоводню. Використання суміші субстратів у мікробних технологіях дає змогу збільшити показники синтезу практично цінних метаболітів у 1,5–10 разів порівняно з вирощуванням продуцентів на відповідних моносубстратах, а також у деяких випадках навіть регулювати склад і властивості цільового продукту.

Наведено власні експериментальні дані про інтенсифікацію синтезу на суміші промислових відходів (відпрацьована соняшникова олія, відходи виробництва біодизелю, м'яса) мікробного екзополісахариду етаполану (продуцент *Acinetobacter* sp. IMB B-7005) і поверхнево-активних речовин *Nocardia vacillans* IMB B-7405. На відміну від більшості науковців, які емпірично встановлюють як концентрацію субстратів у суміші, так і вибір моносубстратів, у наших дослідженнях для підвищення трансформації вуглецю суміші субстратів у цільовий продукт встановлювали оптимальне для його утворення молярне співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші на основі теоретичних розрахунків енергетичних потреб процесу біосинтезу. Крім того, використання суміші відходів для одержання мікробних ПАР дасть змогу не тільки знизити собівартість цільового продукту, а й утилізувати токсичні промислові відходи та підвищити рентабельність виробництва біодизелю.

Ключові слова: суміш ростових субстратів, підвищення ефективності мікробних технологій.

Постановка проблеми. Нині технології мікробного синтезу найінтенсивніше розвиваються серед багатьох галузей біотехнології. Практично цінні мікробні метаболіти поступово заміщують традиційні продукти, а в інших випадках є унікальними і не можуть бути отримані хімічним синтезом [1].

Основними недоліками для великомасштабного виробництва більшості продуктів мікробного синтезу є їх собівартість, зумовлена використанням дорогих субстратів і невисокий вихід кінцевого продукту. Тому для розвитку економічно ефективних технологій застосовуються різноманітні підходи:

використання як субстратів відходів інших виробництв, оптимізація умов культивування продуцентів, внесення у середовище екзогенних попередників біосинтезу, визначення можливих «вузьких» місць метаболізму і розробка шляхів їхнього усунення, а також використання суміші ростових і неростових субстратів [2].

Відомо, що використання суміші субстратів дає змогу значно підвищити синтез біомаси, а можливість інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів вперше було встановлено на прикладі мікробного екзополісахариду етаполану [2]. За одночасного споживання суміші субстратів мікроорганізмами часто спостерігають підвищення рівня біомаси, швидкості росту, скорочення тривалості лаг-фази, що можуть бути зумовлені: 1) використанням одного з субстратів як додаткового джерела енергії; 2) одночасним використанням обох субстратів як в енергетичному, так і в конструктивному метаболізмі; 3) розширенням «вузьких місць» метаболізму моносубстрату за рахунок введення допоміжного субстрату [2].

У 2013 р. ми опублікували літературний огляд [3], у якому були підсумовані відомі на той час дані про використання мікроорганізмами суміші ростових субстратів як у природних умовах, так і керованих біотехнологічних процесах. Велика увага була приділена молекулярним механізмам, що лежать в основі явища катаболітної репресії у мікроорганізмів і їх використанню для розробки технологій утилізації рослинної біомаси з одержанням промислово важливих метаболітів, а також стратегії виживання гетеротрофних мікроорганізмів у природних оліготрофних середовищах.

Незважаючи на досить короткий проміжок часу від моменту публікації огляду [3], у літературі з'явилися нові відомості про синтез мікробних метаболітів на суміші субстратів, причому й на змішаних промислових відходах.

З огляду на вищевикладене **мета** цього огляду — аналіз сучасної наукової літератури про підвищення синтезу різноманітних продуктів мікробного походження на змішаних субстратах, яка з'явилась після опублікування літературного огляду [3] або не увійшла до нього.

Синтез поверхнево-активних речовин на суміші субстратів. Зазначимо, що в останні кілька років, як і раніше, інформація про використання змішаних субстратів для утворення мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) є обмеженою [4—13].

Софороліпіди. У [4] зазначається, що використання суміші гідрофобних і гідрофільних субстратів для біосинтезу ПАР дріжджами є більш ефективним, ніж культивування продуцентів на відповідних моносубстратах. Так, максимальну концентрацію біомаси (27 г/л) та софороліпіду (38,6 г/л) штам *Starmerella bombicola* MTCC 1910 утворював на суміші глюкози (100 г/л) та соняшникової олії (100 г/л). Ці показники були на 45% вищими, ніж на моносубстраті глюкози, а на середовищі з олією утворювались лише сліди софороліпідів.

Інший штам дріжджів *Wickerhamiella domercqiae* CGMCC 1576 синтезував софороліпіди на суміші олеїнової кислоти (6%) та глюкози (80 г/л) [6]. Максимальна концентрація ПАР (41 г/л) досягалася після 144 год культивування.

У [10] повідомляється, що вихід ПАР вдалося підвищити майже в 10 разів (до 20 г/100 г субстрату) у разі культивування штаму *Candida bombicola* NRRL

Y-17069 на суміші шроту від виробництва соняшникової олії (50 г/л) та нерафінованої соєвої олії (50 г/л). У подальших дослідженнях автори здійснювали поверхнєве культивування продуцента на такому самому змішаному субстраті, що супроводжувалося збільшенням виходу софороліпідів до 49,5г/100г субстрату. В [11] штам NRRL Y-17069 культивували на суміші відпрацьованого моторного мастила (50 г/л) та відходів від виробництва соняшникової олії (50 г/л). Максимальна концентрація синтезованих ПАР (26,4 г/л, або 13,2г/100г субстрату) досягалась після 96 год культивування. Як і в [10], при зміні способу культивування з глибинного на поверхневий, вихід цільового продукту вдалося збільшити до 45,8г/100г субстрату.

Daverey зі співавт. [12] досліджували синтез софороліпідів дріжджами *Candida bombicola* NRRL Y-17069 на суміші депротейнізованої сироватки (90 г/л), глюкози (10 г/л) та олеїнової кислоти (100 г/л). Концентрація ПАР становила 23,3 г/л, у той час як на середовищі без глюкози була на 56% нижчою. Встановлено, що показники біосинтезу залежали від співвідношення вмісту глюкози та сироватки в середовищі культивування. Так, максимальна кількість софороліпідів досягалась за співвідношення концентрацій сироватки і глюкози 9:1. Під час культивування штаму NRRL Y-17069 у ферментері на середовищі такого самого складу кількість ПАР становила 25,5 г/л, а регуляція рН в процесі культивування дозволила збільшити цей показник до 33,3 г/л. Крім того, заміна олеїнової кислоти на дешевші соняшникову та оливкову олію супроводжувалася зниженням концентрації ПАР до 2,6 та 6,2 г/л відповідно. У [12] зазначається, що необхідність стадії депротейнізації молочної сироватки значно знижує ефективність даної технології.

Інші гліколіпіди. У [5] повідомляється, що штам дріжджів *Pichia caribbica* на середовищі з 100 г/л ксилози та 4% олеїнової кислоти синтезував 7,48 г/л ксилоліпідів.

Faria із співавт. [7] досліджували можливість використання ксилози як моносубстрату, так і в суміші з глюкозою для біосинтезу манозилеритритоліпідів дріжджами *Pseudozyma antarctica* PYCC 5048T, *Pseudozyma rugulosa* PYCC 5537T, *Pseudozyma aphidis* PYCC 5535T. Лише у разі культивування штаму PYCC 5535T на суміші субстратів концентрація ПАР була удвічі вищою, ніж на моносубстраті ксилозі [7].

У [8] п'ять штамів дріжджів культивували на суміші глюкози з гліцерином, соєвою олією, оливковою олією та відходами після її виробництва. Максимальна концентрація гліколіпідів (2,6 г/л) досягалася за культивування штаму *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 в середовищі, що містило суміш глюкози (1 г/л) та оливкової олії (20 г/л).

Karpenko із співавт. [9] повідомляють про біосинтез рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на суміші гліцерину з пересмаженою олією та відходами виробництва соняшникової олії. Концентрація ПАР, синтезованих на суміші гліцерину з відходами виробництва соняшникової олії, була на 30—70% вищою, ніж на моносубстратах. У разі використання суміші гліцерину з пересмаженою олією показники синтезу були на 20% вищими, ніж на гліцерині. Максимальна концентрація рамноліпідів (10,5 г/л) досягалась за умов росту продуцента в середовищі з 30 г/л гліцерину та 15 г/л відходів вироб-

ництва соняшникової олії. Проте зазначимо, що синтез ПАР досліджувався не на «класичній» суміші субстратів, оскільки відходи виробництва олії вносили у середовище після 72 год культивування.

Ліпопептиди. Заслугує на увагу дослідження [13], в якому описано процес виділення штамів мікроорганізмів, здатних до автотрофної фіксації вуглецю. Автори повідомляють про культивування ізольованих штамів упродовж 8 діб у простому мінеральному середовищі з 50 мМ NaHCO_3 і 1% глюкози як джерелами вуглецю. Встановлено, що штам *Bacillus* sp. SS105 виявився автотрофом і здатним до синтезу ПАР ліпопептидної природи. За умов росту на середовищі з 50 мМ NaHCO_3 як автотрофним джерелом вуглецю та мелясою (15% об'ємна частка) штам SS105 синтезував 2,65 г/л ПАР. Автори зазначають, що в подальшому розробка такої технології одержання ПАР дасть змогу утилізувати вуглекислий газ, що накопичується в земній атмосфері.

Зазначимо, що використання суміші субстратів є доцільним лише за умови, коли концентрація ПАР, синтезованих на суміші субстратів, є порівняною з показниками на моносубстратах. Проте автори праць [5, 6, 8, 11, 13] не наводять таких даних, а у працях [4, 10] моносубстрати та їх суміші не були еквімолярні за вуглецем, що ставить під сумнів ефективність такої технології.

Крім того, у [4—13] дослідники емпірично визначали концентрацію субстратів у суміші. За таких умов підвищення показників синтезу цільових продуктів на суміші субстратів навіть у рази порівняно з культивуванням на моносубстратах не є показовим, адже основним критерієм ефективності змішаних субстратів є максимальна конверсія вуглецю в цільовий продукт.

У зв'язку з цим для біосинтезу ПАР штамом *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 ми здійснювали попередній теоретичний розрахунок співвідношення концентрацій моносубстратів (гліцерин та глюкоза) у суміші [14]. Згідно з «енергетичною» класифікацією субстратів Бабеля [2] гліцерин є енергетично дефіцитним субстратом, а глюкоза залежно від шляху катаболізму може бути або енергетично дефіцитним (гліколіз, шлях Ентнера-Дудорова), або енергетично надлишковим (пентозофосфатний цикл). У подальших дослідженнях було встановлено, що у штаму IMB B-7405 глюкоза залучається до метаболізму через пентозофосфатний цикл. На основі теоретичних розрахунків було встановлено, що молярне співвідношення концентрацій глюкози і гліцерину в середовищі повинно становити 0,394:1, або 1:2,5 [14]. Експериментальні дослідження підтвердили теоретичні розрахунки. Максимальний синтез ПАР спостерігався за співвідношення компонентів суміші 1:2,5—1,4, що є близьким до теоретично розрахованого значення.

На наступному етапі [15] глюкозу та очищений гліцерин замінювали на відповідні промислові відходи (мелясу та технічний гліцерин, який є відходом виробництва біодизелю). За умов росту штаму IMB B-7405 на середовищі з 5% технічного гліцерину та 1% меляси концентрація ПАР досягала 6,4 г/л. Подальше збільшення концентрації будь-якого з компонентів суміші призводило до зниження концентрації цільового продукту, що було спричинене недостатнім співвідношенням C/N у середовищі. Тому на наступному етапі у середовищі з 5—7% технічного гліцерину підвищували удвічі (до 1 г/л) концен-

трацію джерела азоту. Такий прийом дав змогу підвищити концентрацію ПАР до 7,5 г/л [15].

Подальші дослідження показали можливість інтенсифікації синтезу ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 на суміші токсичних промислових відходів (відпрацьованої соняшникової олії та технічного гліцерину). Спочатку на основі теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів і біомаси *N. vaccinii* IMB B-7405 на енергетично дефіцитному субстраті (гліцерин) встановлено, що молярне співвідношення концентрацій рафінованої соняшникової олії та очищеного гліцерину у суміші, за якого досягається максимальний синтез ПАР, повинно становити 0,16:1. Експериментальні дослідження показали, що найвищі показники синтезу ПАР спостерігалися за молярних співвідношень концентрацій цих субстратів 0,14:1—0,19:1, максимально наближених до теоретично розрахованого. Далі рафіновану олію і очищений гліцерин замінювали на відповідні промислові відходи. За молярного співвідношення концентрацій відпрацьованої олії та технічного гліцерину 0,078:1 у суміші (з урахуванням 50% вмісту гліцерину у складі відходів виробництва біодизелю) та використання інокуляту, вирощеного на технічному гліцерині, кількість синтезованих ПАР становила 5,1—5,4 г/л, що в 1,6—2,3 рази вище порівняно з культивуванням *N. vaccinii* IMB B-7405 на відповідних моносубстратах

Узагальнені дані про синтез поверхнево-активних речовин на змішаних субстратах наведено у табл. 1.

Таблиця 1. Використання суміші субстратів для біосинтезу поверхнево-активних речовин

ПАР	Продуцент	Суміш субстратів, г/л	Концентрація ПАР, г/л	Зміна концентрації ПАР (г/л) від контролю*, %	Література
1	2	3	4	5	6
Софороліпіди	<i>Starmerella bombicola</i> MTCC 1910	глюкоза, 100 + рафінована соняшникова олія, 100	38,6	глюкоза, 145 соняшникова олія, 1600	[4]
	<i>Wickerhamiella domercqiae</i> CGMCC 1576	глюкоза, 80 + олеїнова кислота, 6% (об'ємна частка)	41	—	[6]
	<i>Candida bombicola</i> NRRL Y-17069	шрот від виробництва соняшникової олії, 50 + нерафінована соєва олія, 50	20г/100г субстрату	шрот, 1000	[10]
		відпрацьоване моторне мастило, 50 + відходи виробництва соняшникової олії, 50	26,4	—	[11]

1	2	3	4	5	6
Софороліпіди	<i>Candida bombicola</i> NRRL Y-17069	депротеїнізована сироватка, 90 + глюкоза, 10 + олеїнова кислота, 100	23,3	середовище без глюкози, 156	[12]
Інші гліколіпіди	<i>Pichia caribbica</i>	ксилоза, 100 + олеїнова кислота, 4% (об'ємна частка)	7,48	—	[5]
Інші гліколіпіди	<i>Pseudozyma antarctica</i> PYCC 5048T	глюкоза, 20 + ксилоза, 20	4,9	ксилоза, 102 глюкоза, 91	[7]
	<i>Pseudozyma rugulosa</i> PYCC 5537T		3,0	ксилоза, 107 глюкоза, 91	
	<i>Pseudozyma aphidis</i> PYCC 5535T		2,2	ксилоза, 208 глюкоза, 74	
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> CCMA 0358	глюкоза, 1 + оливкова олія, 20	2,6	—	[8]
	<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	гліцерин, 30 + пересмажена олія, 15	9,7	гліцерин, 120	[9]
		гліцерин, 30 + відходи виробництва соняшникової олії, 15	10,5	гліцерин, 130 відходи, 170	
Ліпопептид	<i>Bacillus</i> sp. SS105	NaHCO ₃ , 50 мМ (автотрофне джерело вуглецю), + м'яса, 15% (об'ємна частка)	2,65	—	[13]
Трегалозоміколат	<i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405	технічний гліцерин, 7% (об'ємна частка) + м'яса, 1% (об'ємна частка)	7,5 г/л	технічний гліцерин, 320 м'яса, 290	[15]

Примітки: *контроль (100%) показники синтезу на моносубстратах; «—» — дані не наведено.

Біосинтез інших мікробних метаболітів на змішаних субстратах. Стратегія використання суміші субстратів використовується не лише для отримання ПАР, а й для інших практично цінних мікробних метаболітів: ліпідів [16—24], екзополісахаридів [25—27], пілігидроксисалканоатів [28—30], ферментів [31—33], органічних кислот [34—38], пропандіолу [39, 40], біостанолу [41], біоводню [42, 43].

Ліпіди. Продуктивність синтезу ліпідів старою та молодою культурою гетеротрофних мікроводоростей *Chlorella protothecoides* на середовищі з глю-

козою та дріжджовим екстрактом становила 2,07 і 1,61 г/л/добу відповідно, у той час як при використанні суміші відходів пивоваріння і технічного гліцерину цей показник підвищувався до 2,12 і 1,81 г/л/добу [16]. У праці [17] показано, що використання суміші апельсинового жому та відходу біодизельного виробництва для синтезу метану зменшує інгібуючий вплив компонентів цих субстратів і забезпечує правильний баланс поживних речовин.

Аналогічний підхід було використано Louhasakul та Cheirsilp [18]. Змішування слабкокислих стічних вод після виробництва пальмової олії та лужного технічного гліцерину дало змогу виключити використання титрувальних агентів для доведення pH до оптимального рівня, а кількість синтезованих ліпідів *Yarrowia lipolytica* TISTR 5151 була у 1,55 раза більшою, ніж під час росту дріжджів тільки на відходах виробництва пальмової олії [18].

У [19] використовували суміші летких жирних кислот для біосинтезу мікробних ліпідів штамом *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. Максимальна концентрація ліпідів (4,93 г/л) та біомаси (8,68 г/л) спостерігалась за використання суміші оцтової, пропіонової і масляної кислот у співвідношенні (г/л) 15:5:10, та була вищою ніж на середовищі з 30 г/л оцтової кислоти як моно-субстрату (концентрація ліпідів 4,18 г/л та біомаси 7,21 г/л. Ці ж автори для біосинтезу ліпідів на суміші жирних кислот використовували інший штам — *Cryptococcus curvatus* MUCCL 29819 [20]. Як і в попередніх дослідженнях [19], найбільший вплив на концентрацію синтезованих ліпідів спричиняв вміст оцтової кислоти у суміші жирних кислот. Так, максимальна концентрація ліпідів (1,77 г/л) та біомаси (4,4 г/л) досягалась на суміші (г/л) оцтової, пропіонової і масляної кислот у співвідношенні 6:3:1.

Ganatsios із співавт. [21] досліджували синтез ліпідів *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 на суміші м'яса та апельсинового соку з загальною концентрацією вуглеводів 40 г/л. Встановлено, що за таких умов культивування концентрація ліпідів становила 0,25 г/г біомаси та була вищою, ніж за використання 40 г/л глюкози як єдиного джерела вуглецю (0,23 г/г біомаси).

Автори дослідження [22] зазначають, що у процесі культивування *Rhodospiridium toruloides* DSMZ 4444 на суміші 30 г/л глюкози та 30 г/л гліцерину спостерігали типову диморфію, тому концентрація синтезованих ліпідів (11 г/л) практично не відрізнялася від такої на моно-субстраті глюкозі.

У [23] для біосинтезу ліпідів штамом дріжджів *Wickerhamomyces anomalus* використовували суміш глюкози та відпрацьованої після смаження картоплі, риби та м'яса олії. Автори зазначають, що додавання відпрацьованих олій призвело до зниження загального вмісту накопичуваних ліпідів, проте на 4—7% підвищило концентрацію біомаси.

У [24] описується синтез штамом дріжджів *Yarrowia lipolytica* JMY4086 ліпідів на суміші м'яса та технічного гліцерину. На початку культивування в поживному середовищі містилась лише м'яса, за рахунок якої відбувалось накопичення біомаси продуцента. На 48 год починали додавати технічний гліцерин зі швидкістю 8 г/год до загального вмісту в середовищі 100 г/л. Максимальна концентрація ліпідів накопичувалась після 100 год культивування та становила 16 г/л.

Екзополісахариди. У [25] досліджували синтез пулулану на суміші гідролізату картопляного крохмалю з сахарозою, глюкозою, фруктозою. Під час культивування *Aureobasidium pululans* 201253 у ферментері на середовищі з 80 г/л крохмалю і 20 г/л сахарози концентрація пулулану становила 55 г/л та була вищою, ніж на моносубстраті крохмалі (35 г/л) та суміші крохмалю, глюкози та фруктози (39 г/л), проте нижчою, ніж за використання сахарози як моносубстрату (69 г/л). Автори зазначають, що попри те, що оптимальним субстратом для біосинтезу пулулану є сахароза, використання суміші сахарози і гідролізату крохмалю дасть змогу знизити собівартість кінцевого продукту.

У праці [26] встановлено, що у процесі вирощування *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20343 на середовищі, що містило суміш соєвого борошна (або борошна фави) з сахарозою суттєво підвищувалася в'язкість культуральної рідини, що засвідчує підвищення рівня синтезу екзополісахаридів (глюкану та фруктану) порівняно з іншими метаболітами (манітол, молочна та оцтова кислота).

Наші дослідження [27] дали змогу встановити умови культивування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005, які б забезпечували максимальні показники синтезу мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану на суміші м'яса та соняшникової олії. На основі теоретичних розрахунків енерговитрат на синтез етаполану та біомаси визначено, що оптимальне молярне співвідношення концентрацій енергетично дефіцитного (сахароза) та надлишкового (соняшникова олія) субстратів у суміші становить 1:0,9. Експерименти показали, що найвищі показники синтезу ЕПС спостерігалися за молярного співвідношення моносубстратів у суміші 1:1,1, максимально наближеного до теоретично розрахованого. Підвищення концентрації м'яса та рафінованої олії у суміші з 1,0 до 1,5% супроводжувалося збільшенням кількості синтезованих ЕПС і ЕПС-синтезувальної здатності у 1,2 і 1,3 раза відповідно. Встановлено можливість заміни рафінованої олії у суміші з м'ясом на різні типи відпрацьованої (після смаження картоплі, м'яса, овочів та змішану). Найвищі показники синтезу ЕПС (концентрація ЕПС 14 г/л, ЕПС-синтезувальна здатність 3,5 г ЕПС/г біомаси) спостерігалися за умови використання змішаної відпрацьованої олії як для одержання посівного матеріалу, так і біосинтезу ЕПС [27]. Одержані нами результати засвідчують можливість створення універсальної технології одержання мікробного екзополісахариду етаполану на суміші відходів (м'яса та відпрацьованої олії), незалежної від типу та постачальника відпрацьованої олії.

Полігідроксиалканоати. Одним із відомих і широко використовуваних мікробних полімерів є полігідроксиалканоати (ПГА). Завдяки високій біосумісності та біодеградабельності такі полімери широко використовуються в різних сферах діяльності людини [28]. Так, сополімер полі(3-гідроксибутират-со-4-гідроксибутират) [P(ЗНВ-со-4НВ)] застосовується у фармацевтиці та як біоматеріал в медицині. Унікальні властивості цього сополімеру зумовлені наявністю у його складі мономеру 4-гідроксибутирату (4НВ), оскільки він не спричиняє запалення тканин, підвищує загальну біосумісність та покращує фізичні властивості кінцевого продукту. Тож зусилля науковців спрямовані не лише на інтенсифікацію синтезу полімеру, а й на збільшення вмісту в ньому мономеру 4-гідроксибутирату (4НВ).

Одним із продуцентів сополімеру [P(3НВ-со-4НВ)] є штам бактерій *Cupriavidus* sp. USMAA1020 [28]. Як субстрати для біосинтезу використовували суміш олеїнової кислоти з попередниками 4-гідроксибутирату (4НВ) (γ-бутиролактон, 1,4-бутандіол, 1,6-гександіол) та суміші лише попередників мономеру. Встановлено, що за використання суміші олеїнової кислоти з кожним із попередників концентрація синтезованого сополімеру збільшилась в 3—8 разів, але при цьому вміст мономеру 4-гідроксибутирату (4НВ) у складі цільового продукту знизився на 40—50% порівняно з сополімером, одержаним на середовищі з попередниками 4-гідроксибутирату як моносубстратах.

Тому на наступному етапі досліджень автори досліджували синтез сополімеру [P(3НВ-со-4НВ)] лише на суміші попередників 4-гідроксибутирату. За таких умов культивування концентрація синтезованого сополімеру була на 30—50% нижчою, ніж за використання суміші попередників мономеру 4НВ та олеїнової кислоти, проте вміст цільового мономеру у складі сополімеру підвищувався до 50—70%, що у 2—2,5 раза більше ніж на відповідних попередниках як моносубстратах. Сополімер з максимальним вмістом (70%) цільового мономеру був отриманий на суміші γ-бутиролактону та 1,6-гександіолу, проте концентрація синтезованого полімеру становила лише 0,3 г/л. Отже, більш оптимальним варіантом є використання суміші 1,4-бутандіолу і 1,6-гександіолу, що дає можливість отримати 5,4 г/л сополімеру з вмістом 4НВ 40% [28]. У наступних дослідженнях [29] автори встановили можливість підвищення концентрації синтезованого на суміші 1,4-бутандіолу і 1,6-гександіолу сополімеру до 8,6 г/л (вміст 4НВ 35%). Крім того, у [30] було показано можливість отримання сополімеру на суміші γ-бутиролактону та 1,6-гександіолу з вмістом 4НВ 92% за рахунок використання генно модифікованих штамів *Cupriavidus* sp. USMAA1020_{phaC2-4} та *Cupriavidus* sp. USMAA1020_{phaC1020}.

Ферменти. Salakkam із співавт. [31] використовували суміш макухи соєвих бобів і відвареного рису як субстрату для твердо-фазової ферментації *Aspergillus oryzae* TISTR 3087. За масового співвідношення макухи соєвих бобів з відвареним рисом 75:25 активність протеази становила 33 од/г, що у 11 раз більше, ніж за використання соєвих бобів як моносубстрату.

У [32] досліджували синтез ліпази штамом *Yarrowia lipolytica* SM7 на суміші технічного гліцерину (40 г/л) з оливковою та соєвою олією (5% мас). Як зазначають автори, додавання олійних субстратів дало змогу зняти репресію синтезу ліпази гліцерином та інтенсифікувати її утворення. Так, на суміші субстратів активність ліпази становила 22,45—25,1 од/мл, у той час як на моносубстраті гліцерині всього 4 од/мл.

Максимальний синтез фітази (1881,26 од/г міцелію) *Sporotrichum thermophile* досягався на середовищі з 2,5% Tween 80 і 1,0% дріжджового екстракту [33]. У той же час під час культивування продуцентана суміші цукрової тростини і пшеничних висівок вдалося підвищити активність ферменту в 11,6 раза.

Органічні кислоти. Zheng зі співавт. [34] повідомляють про використання залишків Софори жовтуватої (*Sophora flavescens*) у суміші з змішаними харчовими відходами для біосинтезу *L*-молочної кислоти *Lactobacillus casei* CICC 6106. Максимальна концентрація *L*-молочної кислоти становила 48,4 г/л за

співвідношення софори і змішаних харчових відходів 1:1,5 і була в 2—4 рази вищою, ніж на відповідних моносубстратах.

Propionibacterium acidipropionici CGMCC1.2225 [35] синтезував 21,9 г/л пропіонової кислоти на суміші гліцерину та глюкози у молярному співвідношенні 4:1. За умов росту штаму на моно субстратах концентрація цільового продукту не перевищувала 11,5—18,1 г/л.

Автори праці [32] повідомляють про синтез штамом *Y. lipolytica* SM7 лимонної кислоти на суміші технічного гліцерину (40 г/л) з оливковою, соєвою олією та моторним мастилом (5% мас.). Встановлено, що використання суміші технічного гліцерину з оливковою та соєвою олією збільшувало концентрацію цитрату на 41 та 90% відповідно. Максимальна концентрація лимонної кислоти (2,3 г/л) досягалася на суміші технічного гліцерину та соєвої олії. Додавання ж до технічного гліцерину моторного мастила знижувало концентрацію цільового продукту на 58%.

Candida viswanathii іре-1 синтезує α,ω -додекандіонову кислоту на суміші ксилози і глюкози [36]. Здатність штаму до одночасного споживання гексоз і пентоз дала змогу розробити авторам ефективний процес біосинтезу α,ω -додекандіонової кислоти на суміші гідролізату соломи та н-додекану. За таких умов культивування концентрація цільового продукту була на 40% вищою, ніж на моносубстраті глюкозі.

У [37] досліджували синтез бурштинової кислоти за умов росту *Enterobacter* sp. LU1 на суміші гліцерину і лактози. Концентрація сукцинату становила 35 г/л за вмісту гліцерину і лактози у суміші 50 і 25 г/л відповідно.

У процесі вирощування *Rhizopus* sp. IAFB781 на середовищі з 40 г/л гліцерину або ксилози концентрація фумарової кислоти становила 6,1 і 19,8 г/л відповідно [38]. У той же час використання суміші цих субстратів дало змогу підвищити концентрацію цільового продукту до 28 г/л.

Пропандіол. У [39] автори повідомляють про синтез 1,3-пропандіолу штамом *Klebsiella pneumoniae* BA11 на суміші гліцерину та глюкози. Проте зазначається, що додавання глюкози в середовище культивування не вплинуло на концентрацію синтезованого цільового продукту, а лише збільшило на 3—5% концентрацію біомаси порівняно з культивуванням продуцента на гліцерині.

Використання глюкози, ксилози та арабінози як ко-субстратів при культивуванні *Clostridium diolis* DSM 15410 на середовищі з гліцерином супроводжувалося збільшення виходу 1,3-пропандіолу (1,3-ПД) на 28%, 19% і 18 % відповідно [40]. Під час росту штаму DSM 15410 на гліцерині і суміші цукрів (глюкози, ксилози, арабінози у масовому співвідношенні 1:1:1) також спостерігали підвищення на 19% (до 13,9 г/л) концентрації 1,3-ПД, що свідчить про можливість використання суміші гліцерину та лігноцелюлозних гідролікатів для отримання 1,3-ПД. Це припущення було підтверджене експериментально: за культивування *C. diolis* DSM 15410 на суміші технічного гліцерину та гідролізату кукурудзяних стебел рівень синтезу 1,3-ПД становив 42,9 г/л, що на 31% вище, ніж під час росту на гліцерині як моносубстраті [40].

Узагальнені дані про утворення різних продуктів мікробного синтезу на змішаних субстратах наведено у табл. 2.

Таблиця 2. Використання суміші субстратів для біосинтезу практично цінних метаболітів

Цільовий продукт	Продуцент	Суміш субстратів, г/л	Показники синтезу	Зміна показників синтезу порівняно з контролем*, %	Література
1	2	3	4	5	6
Ліпіди	<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	оцтова кислота, 15 + пропіонова кислота, 5+ масляна кислота, 10	4,93 г/л	оцтова кислота — 118	[19]
	<i>Cryptococcus curvatus</i> MUCL 29819	оцтова кислота, 2,4 + пропіонова кислота, 1,2 + масляна кислота, 0,4	1,77 г/л	—	[20]
	<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	меляса+апельсиновий сік, 40 за вуглеводами	0,25 г/г біомаси	глюкоза — 109	[21]
	<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSMZ 4444	глюкоза, 30 гліцерин, 30	11 г/л.	—	[22]
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	глюкоза, 10 + відпрацьована олія, 5 (після смаження картоплі, риби та м'яса)	0,62 г/л	глюкоза — 103	[23]
	<i>Yarrowia lipolytica</i> JMY4086	меляса, 245 + технічний гліцерин, 100**	16 г/л	—	[24]
	<i>Yarrowia lipolytica</i> SM7	технічний гліцерин, 40 + оливкова олія, 5 (% мас)	6,13 г/л	гліцерин — 117	[32]
Пулулан	<i>Aureobasidium pululans</i> 201253	крохмаль, 80 + сахароза, 20	55 г/л	крохмаль — 157 сахароза — 79	[25]
Протеаза	<i>Aspergillus oryzae</i> TISTR 3087	залишки соєвих бобів + відварений рис (концентрація вуглеводів 19,6 мг/г субстрату)	33 од/г	соєві боби — 1170	[31]

1	2	3	4	5	6
Ліпаза	<i>Yarrowia lipolytica</i> SM7	технічний гліцерин, 40 + соєва олія, 5 (% мас)	22,45 од/мл	гліцерин — 560	[32]
Біоетанол	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 29007	манітолу, 16 + гліцерин, 20	32,1 г/л	гліцерин — 617	[41]
Біоводень	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> KKU-ED1	ксілоза, 5 + арабіноза, 5	3,5 л/л,	ксілоза — 249 арабіноза — 193	[42]
	Консорціум мікроорганізмів	технічний гліцерин, 15 + жмих від виробництва пальмової олії, 2 (% мас)	0,27 л/л	гліцерин — 540	[43]
Молочна кислота	<i>Lactobacillus casei</i> CICC 6106	жмих софори жовтуватої (<i>Sophora flavescens</i>) 4 (% мас) + змішані харчові відходи 6 (% мас)	48,4 г/л	жмих софори — 480 харчові відходи — 133	[34]
Пропіонова кислота	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> CGMCC1.2225	гліцерин, 3,2 % + глюкоза, 0,8 % (об'ємна частка)	21,9 г/л	гліцерин — 121 глюкоза — 190	[35]
Лимонна кислота	<i>Yarrowia lipolytica</i> SM7	технічний гліцерин, 40 + оливкова олія, 5% (об'ємна частка)	2,3 г/л	гліцерин — 192	[32]
Пропандіол	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BA11	гліцерин, 6% + глюкоза, 0,6% (об'ємна частка)	9,3 г/л	гліцерин — 112 глюкоза — 930	[39]
Полігидрокси-алканоат	<i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	1,4-бутандіол, 0.5 % + 1,6-гександіол, 0,2 (% мас)	5,4 г/л	1,4-бутан діол — 340 1,6-гексан діол — 675	[28]

Примітки: *контроль (100%) — показники синтезу на моносубстратах; ** — кінцева концентрація субстрату; «—» — дані не наведено.

Висновок

Отже, представлені результати показують доцільність використання суміші ростових субстратів для підвищення синтезу практично важливих

мікробних метаболітів, а також засвідчують необхідність правильного вибору субстратів і коректного визначення молярного співвідношення їх концентрацій для забезпечення максимальної інтенсифікації процесу.

Література

1. Erickson B., Nelson J., Winters P. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnol. J.* 2012, 7(2), 176—185. doi: 10.1002/biot.201100069.
2. Pidhorskyy V., Iutinska G., Pirog T. Intensification of microbial synthesis technologies. K.: Nauk. Dumka, 2010. 327 p. Ukrainian.
3. Pirog T.P., Shulyakova M.A., Shevchuk T.A. Mixed substrates in environment and biotechnological processes. *Biotechnologia Acta.* 2013, 6 (6), 2844. doi: 10.15407/biotech6.06.028. Ukrainian.
4. Vedaraman N., Venkatesh N. The effect of medium composition on the production of sophorolipids and the tensiometric properties by *Starmerella bombicola* MTCC 1910. *Pol. J. Chem.* 2010. 12(2), 9—13. doi:10.2478/v10026-010-0011-4.
5. Joshi-Navare K., Singh P.K., Prabhune A.A. New yeast isolate *Pichia caribbica* synthesizes xylolipid biosurfactant with enhanced functionality. *Eur. J Lipid Sci. Technol.* 2014. 116(8), 1070-1079. doi:10.1002/ejlt.201300363.
6. Ma X., Li H., Song X. Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576. *J. Colloid Interface Sci.* 2012. 376(1), 165—172. doi:10.1016/j.jcis.2012.03.007.
7. Faria N. T., Santos M. V., Fernandes P., Fonseca L. L., Fonseca C., Ferreira F. C. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, from pentoses and D-glucose/D-xylose mixtures by *Pseudozyma* yeast strains. *Process Biochem.* 2014. 49(11), 1790—1799. doi:10.1016/j.procbio.2014.08.004.
8. Souza, K.S.T., Gudiña, E.J., Azevedo, Z., de Freitas, V., Schwan, R.F., Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2017, 154, 373—382. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.041.
9. Karpenko I., Midyana G., Karpenko O., Novikov V. Influence of food industry wastes as substrates on the yield of biosurfactants of the strain *Pseudomonas* sp. PS-17. *Ecol. Eng. Environ. Protec.* 2016, 6, 44—51.
10. Rashad M.M., Nooman M.U., Ali M.M., Al-Kashe, A.S., Mahmoud, A.E. Production, characterization and anticancer activity of *Candida bombicola* sophorolipids by means of solid state fermentation of sunflower oil cake and soybean oil. *Grasas Aceites.* 2014, 65(2). doi: http://dx.doi.org/10.3989/gya.098413.
11. Rashad M.M., Al-Kashef A.S., Nooman M.U., El-din-Mahmoud A.E. Co-utilization of motor oil waste and sunflower oil cake on the production of new sophorolipids by *Candida bombicola* NRRL Y-17069. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2014, 5(4), 1515—1528.
12. Daverey A., Pakshirajan K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2010, 79(1), 246—253. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.04.002.
13. Maheshwari N., Kumar M., Thakur I.S., Srivastava S. Recycling of carbon dioxide by free air CO₂ enriched (FACE) *Bacillus* sp. SS105 for enhanced production and optimization of biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 2017, 242, 2—6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.124>.
14. Pirog T., Shevchuk T., Beregova K., Kudrya N. Intensification of surfactants synthesis under cultivation *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on a mixture of glucose and glycerol. *Biotechnologia Acta.* 2015, 8 (6), 23—31. doi: 10.15407/biotech8.06.023.
15. Pirog T.P., Kudrya N.V., Shevchuk T.A., Beregova K.A., Iutynska G.O. Bioconversion of crude glycerole and molasses mixture in biosurfactants of *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Mikrobiol. Z.* 2015, 77(3), 28—35. Russian. doi: <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj77.03.028>.

16. Feng X., Walker T.H., Bridges W.C., Thornton C., Gopalakrishnan K. Biomass and lipid production of *Chlorella protothecoides* under heterotrophic cultivation on a mixed waste substrate of brewer fermentation and crude glycerol. *Bioresour. Technol.* 2014, 166, 17—23. doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.120.
17. Martin M.A., Fernández R., Serrano A., Siles J.A. Semi-continuous anaerobic co-digestion of orange peel waste and residual glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Waste Manag.* 2013, 33(7), 1633—1639. doi: 10.1016/j.wasman.2013.03.027.
18. Louhasakul Y., Cheirsilp B. Industrial waste utilization for low-cost production of raw material oil through microbial fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013, 169(1), 110—122.
19. Liu J., Yuan M., Liu J.N., Huang, X.F. Bioconversion of mixed volatile fatty acids into microbial lipids by *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. *Bioresour. Technol.* 2017, 241, 645—651. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.085.
20. Liu J., Yuan M., Liu J.N., Lu L.J., Peng K.M., Huang X.F. Microbial conversion of mixed volatile fatty acids into microbial lipids by sequencing batch culture strategy. *Bioresour. Technol.* 2016, 222, 75—81. doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.100.
21. Ganatsios V., Koutinas A.A., Bekatorou A., Panagopoulou, V., Banat I.M., Terpou A. Kopsahelis N. Porous cellulose as promoter of oil production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* using mixed agroindustrial wastes. *Bioresour. Technol.* 2017, 244, 629—634. doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.163.
22. Bommarreddy R.R., Sabra W., Zeng A.P. Glucose-mediated regulation of glycerol uptake in *Rhodospiridium toruloides*: insights through transcriptomic analysis on dual substrate fermentation. *Engineering in Life Sciences.* 2017, 17(3), 282—291. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600010>.
23. Arous F., Atitallah I.B., Nasri M., Mechichi T. A sustainable use of low-cost raw substrates for biodiesel production by the oleaginous yeast *Wickerhamomyces anomalus*. *3 Biotech.* 2017, 7(4):268. doi: 10.1007/s13205-017-0903-6.
24. Rakicka M., Lazar Z., Dulermo T., Fickers P., Nicaud J.M. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnol. Biofuels.* 2015, 8:104. doi: 10.1186/s13068-015-0286-z.
25. An C., Ma S.J., Chang F., Xue W.J. Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose. *Braz. J. Microbiol.* 2017, 48(1), 180—185. doi: 10.1016/j.bjm.2016.11.001.
26. Xu Y., Coda R., Shi Q., Tuomainen P., Katina K., Tenkanen M. Exopolysaccharides production during the fermentation of soybean and fava bean flours by *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20343. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65(13), 2805—2815. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05495.
27. Pirog T.P., Voronenko A.A., Ivakhniuk M.O. Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan biosynthesis on mixture of molasses and sunflower oil. *Biotechnologia Acta*, 2017, V. 10, N 4. C. 25—33. <https://doi.org/10.15407/biotech10.04.025>.
28. Huong K., Mohd Yahya A.R., Amirul A.A. Pronounced synergistic influence of mixed substrate cultivation on single step copolymer P(3HB-co-4HB) biosynthesis with a wide range of 4HB monomer composition. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2014, 89(7), 1023—1129. <https://doi.org/10.1002/jctb.4195>
29. Huong K.H., Kannusamy S., Lim S.Y., Amirul A.A. Biosynthetic enhancement of single-stage Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by manipulating the substrate mixtures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 42(9), 1291—1297. doi: 10.1007/s10295-015-1657-y.
30. Syafiq I.M., Huong K.H., Shantini K. Synthesis of high 4-hydroxybutyrate copolymer by *Cupriavidus* sp. transformants using one-stage cultivation and mixed precursor substrates strategy. *Enzyme Microb. Technol.* 2017, 98, 1—8. doi: 10.1016/j.enzmtec.2016.11.011.
31. Salakkam A., Kingpho Y., Najunhom S., Aiamsanthi K., Kaewlao S., Reungsang A. Bioconversion of soybean residue for use as alternative nutrient source for ethanol fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2017, 125, 65—72. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.020>.

32. Magdouli S., Guedri T., Tarek R., Brar S.K., Blais J.F. Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 2017, 243, 57—68. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.074.
33. Kumari A., Satyanarayana T., Singh B. Mixed substrate fermentation for enhanced phytase production by thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* and its application in beneficiation of poultry feed. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016, 178(1), 197—210. doi: 10.1007/s12010-015-1868-8.
34. Zheng J., Gao M., Wang Q., Wang J., Sun X., Chang Q., & Tashiro Y. Enhancement of l-lactic acid production via synergism in open co-fermentation of *Sophora flavescens* residues and food waste. *Bioresour. Technol.* 2017, 225, 159—164. doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.055.
35. Liu Y.G., Zhang R.B., Zhang F., Zhang J. Zhu J. Glycerol/glucose co-fermentation: one more proficient process to produce propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici*. *Curr. Microbiol.* 2011, 62(1), 152—158. doi: 10.1007/s00284-010-9683-5.
36. Cao W., Liu B., Luo J., Yin J., Wan Y. α , ω -Dodecanedioic acid production by *Candida viswanathii* ipe-1 with co-utilization of wheat straw hydrolysates and n-dodecane. *Bioresour. Technol.* 2017, 243, 179—187. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.082.
37. Podleśny M., Jarocki P., Wyrostek J., Czernecki T., Kucharska J., Nowak A., Targoński Z. *Enterobacter* sp. LU1 as a novel succinic acid producer — co-utilization of glycerol and lactose. *Microb. Biotechnol.* 2017, 10(2), 492—501. doi: 10.1111/1751-7915.12458.
38. Kowalczyk S., Komoń-Janeczara E., Glibowska A., Kuzdrański A., Czernecki T., Targoński Z. A co-utilization strategy to consume glycerol and monosaccharides by *Rhizopus* strains for fumaric acid production. *AMB Express*. 2018, 8(1):69, doi: 10.1186/s13568-018-0601-8.
39. Sen B., Dabir A.P., Lanjekar V.B., Ranade D.R. Isolation and partial characterization of a new strain of *Klebsiella pneumoniae* capable of high 1,3 propanediol production from glycerol. *Global J. Environ. Sci. Manage.* 2015, 1(2), 99—108. doi: 10.7508/gjesm.2015.02.001.
40. Xin B., Wang Y., Tao F., Li L., Ma C., Xu P. Co-utilization of glycerol and ligno-cellulosic hydrolysates enhances anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium diolis*. *Sci. Rep.* 2016, 6. doi: 10.1038/srep19044.
41. Thap L.P., Le S.J., Yang X.G., Yoo H.Y., Kim S.B., Park C., Kim S.W. Co-fermentation of carbon sources by *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007 to enhance the production of bioethanol. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2014, 37(6), 1073—1084. doi: 10.1007/s00449-013-1079-z.
42. Saripan A.F., Reungsang A. Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KCU-ED1: Culture conditions optimization using mixed xylose/arabinose as substrate. *Electronic J. Biotechnol.* 2013, 16(1), doi: 10.2225/vol16-issue1-fulltext-1.
43. Kanchanasuta S., Pisutpaisal N. Improvement of glycerol waste utilization by co-feed-stock with palm oil decanter cake on biohydrogen fermentation. *Int. J. Hydrogen Energ.* 2017, 42(5), 3447—3453. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.12.134.