

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

ТИГУНОВА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА



УДК 663.18: 577.222

**ХАРАКТЕРИСТИКА НОВИХ ШТАМІВ *CLOSTRIDIUM SP.* –
ПРОДУЦЕНТІВ БІОБУТАНОЛУ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ
АБЕ ФЕРМЕНТАЦІЇ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНИХ СУБСТРАТІВ**

03.00.20 - Біотехнологія

РЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2025

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у лабораторії промислової та харчової біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий консультант: Доктор біологічних наук, професор
Шульга Сергій Михайлович,
Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», заступник директора з наукової роботи

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, професор
Стабніков Віктор Петрович,
Національний університет харчових технологій, завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

доктор біологічних наук, професор
Федорович Дарія Василівна,
Інститут біології клітини Національної академії наук України, провідний науковий співробітник відділу молекулярної генетики і біотехнології

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Циганкова Вікторія Анатоліївна,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря Національної академії наук України, провідний науковий співробітник відділу хімії біоактивних азотовмісних гетероциклічних сполук

Захист відбудеться 23 квітня 2025 р. об 11.00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького (Осиповського), 2а; тел. (044)463 05 32; e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького (Осиповського), 2а та на офіційному сайті <http://ifbg.or.ua/uk/pidgotovka-kadriv/spetsializovana-vchena-rada>

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., доц.



Наталія ПАСТУХОВА

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Сучасні енергетичні потреби людства покриваються за рахунок непоновлювальних ресурсів (Zhang, 2024). Поновлювальні енергетичні джерела складають у загальному балансі витрат близько 14 % (Busch et al., 2023). Можливості їх реального збільшення досить обмежені (Zarkovic et al., 2022). За допомогою механічних, хімічних, термічних, біологічних або комплексних технологічних процесів рослинну біомасу в сучасних умовах трансформують у гази (біогаз), рідке (дизельне паливо, етанол, бутанол) чи тверде (паливні брикети, гранули тощо) біопаливо (Ibitoye et al., 2023). Виробництво рідких органічних продуктів і палива, в першу чергу етанолу та бутанолу, із поновлювальної сировини (біомаси) в останні роки розвивається швидкими темпами (El-Araby, 2024). Біобутанол отримують за допомогою мікробіологічної конверсії класичної ацетон-бутанол-етанольної (АБЕ) ферментації (Jones, 2024). Одним з найбільш важливих факторів не тільки для одержання біобутанолу, але і для всієї промисловості біопалив, є використання дешевих субстратів (Lin et al., 2023).

Найбільш поширеним та практично необмеженим субстратом для мікробіологічної конверсії є лігноцелюлоза (Joshi et al., 2022). Велика кількість лігноцелюлозних відходів утворюється в процесі діяльності людини та створює екологічну проблему – катастрофічне забруднення навколишнього середовища (Ojo, 2023). На жаль, більша частина відходів не утилізується, хоча потенційно вона може бути перероблена (Katam et al., 2023). Для збільшення біоконверсії лігноцелюлозної сировини її попередньо обробляють (Sharma et al., 2023). Для створення ефективної промислової (комерційної) технології отримання біобутанолу з максимальним накопиченням кінцевого продукту важливо мати високопродуктивні штами, знайти оптимальні умови культивування і, звичайно, використовувати дешеві поновлювальні субстрати (Rozina et al., 2024). Крім цих факторів, накопичення цільового продукту можна також збільшити і за рахунок оптимізації метаболічних шляхів двох стадій синтезу біобутанолу (Zhou et al., 2023). Промислове виробництво біопалива відбувається з використанням запатентованих клостридіальних штамів-продуцентів (Jones et al., 2023). Історично майже всі штами клостридій, що продукували біобутанол, були віднесені до *C. acetobutylicum* (Jones, 2024). Лише у декількох штамів *C. acetobutylicum* були детально вивчені біохімічні, генетичні та фізіологічні особливості та знайдено характерні відмінності між ними (Jensen et al., 2024). Отримання нових високопродуктивних штамів мікроорганізмів, які накопичують біобутанол є актуальною проблемою. Вивчення та характеристика нових штамів, відпрацювання умов культивування з метою оптимізації синтезу біобутанолу дасть змогу створити економічну комерційну технологію виробництва біобутанолу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в Державній установі «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» у рамках

взаємопов'язаних цільової комплексної науково-технічної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії» (2013-2017 рр.) і цільової програми наукових досліджень НАН України «Біопаливні ресурси і біоенергетика» (2018-2022 рр.) та відомчих тематик лабораторії промислової та харчової біотехнології «Удосконалення технології біобутанолу з використанням альтернативних субстратів та вітчизняних штамів-продуцентів» (2013-2017 рр., № державної реєстрації 0113U005527); «Удосконалення технології отримання бутанолу на основі біомаси ріпаку з використанням вітчизняних штамів-продуцентів бактерій» (2018-2019 рр., № державної реєстрації 0118U005353), «Оцінка продуктивного потенціалу та біохімічного складу рослин і відбір цінних генотипів як вихідних форм для подальших селекційних робіт. Кількісна оцінка виходу компонентів рідких палив при переробленні соку та лігноцелюлозної частини зразків рослин. Удосконалення відібраних штамів-продуцентів біобутанолу з подальшим підвищенням біоконверсії субстрату» (2018-2022 рр., № державної реєстрації 0220U000419), «Створення штамів надпродуцентів вторинних метаболітів (амінокислот, спиртів, вітамінів)» (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U101489), «Інтенсифікація накопичення бутанолу з використанням різного виду рослинної сировини як субстрату та вітчизняних штамів-продуцентів» (2020-2022 рр., № державної реєстрації 0120U101706), «Розроблення технології ультразвукової дезінтеграції рослинної біомаси незернової частини врожаю сільськогосподарських культур» (2020-2022 рр., № державної реєстрації 0223U002212), «Кавітаційне оброблення лігноцелюлозної біосировини в отриманні біопалив другого покоління», яка виконувалась на замовлення Міністерства освіти і науки України (2023-2024 рр., № державної реєстрації 0123U102837) та фінансувалася за рахунок зовнішнього інструменту – допомоги Європейського Союзу для виконання зобов'язань України у Рамковій програмі Європейського Союзу з наукових досліджень та інновацій «Горизонт 2020».

Мета даної роботи схарактеризувати штами-продуценти *Clostridium* sp. та дослідити процес АБЕ ферментації за використанням лігноцелюлозних субстратів.

Для досягнення поставленої мети сформульовані такі завдання:

1. Здійснити секвенування повного геному штаму-продуценту *Clostridium* sp. UCM В-7570 і провести мапування.
2. Виділити з природних джерел лігнолітичний штам для оцукровування і спільного культивування з *Clostridium* sp. UCM В-7570.
3. Розробити дизайн конструкції рекомбінантного штаму-продуценту для підвищення накопичення бутанолу.
4. Визначити макрокомпоненти різних видів незернової рослинної біомаси придатних для ферментації АБЕ з отриманням бутанолу.
5. Вивчити можливість використання попередньо підготовленої лігноцелюлозної біомаси як субстрату для отримання бутанолу.
6. Визначити види і оптимальні параметри попередньої підготовки

лігноцелюлозної сировини для культивування штамів-продуцентів бутанолу;

7. Провести іммобілізацію штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM В-7570 на різних носіях для підвищення накопичення бутанолу.
8. Вивчити вплив стресових факторів на зміну метаболічних шляхів для підвищення накопичення бутанолу.

Об'єкт дослідження – процес накопичення бутанолу штамми-продуцентами *Clostridium*.

Предмет дослідження – особливості накопичення бутанолу штамми *Clostridium* за використання лігноцелюлозних субстратів та оптимізації умов культивування.

Методи дослідження – мікробіологічні (культивування мікроорганізмів, вивчення їх морфології методами світлової мікроскопії, виділення та визначення морфологічних особливостей колоній), хроматографічні (визначення концентрації розчинників за допомогою газової хроматографії), спектрофотометричні (визначення концентрації біомаси бактерій, визначення концентрації масляної кислоти), молекулярно-генетичні (виділення ДНК, горизонтальний гель-електрофорез ДНК, полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР), секвенування ДНК, конструювання рекомбінантного штаму), фізичні (іммобілізація), фізико-хімічні (кислотний, лужний, ензиматичний, ультразвуковий, термобаричний гідролізи), біоінформатичні (аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, анотація генів, моделювання біосинтетичних шляхів *in silico*, філогенетичний аналіз амінокислотних та нуклеотидних послідовностей) та статистична обробка результатів.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше досліджено штам-продуцент бутанолу *Clostridium* sp. UCM В-7570, секвеновано його геном та проведено філогенетичний аналіз. Інформацію про геном штаму передано до Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI, США) BioProject ID: PRJNA844305, BioSample accession: SAMN28812949. У базі даних GenBank зазначеному геному присвоєно реєстраційний номер CP112872.

Вперше виділено з природних джерел новий лігнолітичний штам *Streptomyces graminifolii* IFBG Ave1, визначено нуклеотидну послідовність гена 16S рРНК та проведено філогенетичний аналіз штаму. Послідовність гена 16S рРНК зареєстровано в базі даних GenBank за номером PQ283992.

Розроблено дизайн конструкції нового рекомбінантного штаму-продуценту бутанолу. Проведено метаболомний аналіз конструкції штаму *Clostridium* sp. UCM В-7570 та показано, що видалення великої субодиниці гліцеролдегідратази (*dhaB*) за допомогою адаптованої ніказної системи *Streptomyces pyogenes* типу II CRISPR/Cas9 формує мутант з бутанолом як основним продуктом.

На основі першого комплексного аналізу відкритих масивів даних комунальних підприємств, проведеного на прикладі міста Києва, визначено основні групи та види рослин, що утворюють лігноцелюлозну сировину

комунального походження та проаналізовано хімічний склад цих видів. Показано можливий потенціал біомаси як сировини для конвертування до бутанолу.

Удосконалено технологію отримання біобутанолу на основі виявлення фізіологічних та біохімічних властивостей одержаних штамів мікроорганізмів. Показано можливість використання як альтернативних субстратів різної рослинної сировини (біомаси ячменю, ріпаку, сої, пшениці, сорго цукрового, міскантусу, дрововидного проса, лігноцелюлозних відходів комунального походження, бульб топінамбуру, яблучних вичавок) та відходів промисловості – технічного та гліцерину-сирцю, скопу для культивування штамів-продуцентів бутанолу.

Вперше проведено іммобілізацію штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 на різних носіях та визначено оптимальний носій іммобілізації для підвищення накопичення бутанолу у процесі культивування. Визначено оптимальні способи попередньої підготовки сировини для підвищення накопичення бутанолу.

Обґрунтовано можливість використання адаптивного стресу для підвищення накопичення цільового продукту за рахунок зміни метаболічних шляхів у клітинах мікроорганізмів, опосередковано через дію стресових факторів. Отримані результати дозволяють проводити зміни метаболічних шляхів мікроорганізмів за рахунок зміни умов культивування під впливом стресових факторів. Можливо також використовувати стресові фактори і їх комбінації для підвищення рівня накопичення цільового продукту.

Практичне значення одержаних результатів. У ході виконання роботи автором схарактеризовано штам-продуцент бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 та отримано лігнолітичний *Streptomyces graminifolii*. Штами поповнили «Колекцію штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України». Штам *Clostridium* sp. UCM B-7570 депоновано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (Ukrainian Collection of Microorganisms).

Секвеновано геном *Clostridium* sp. UCM B-7570. Показано, що в геномі містяться всі кластери генів, які відповідають за накопичення бутанолу, ацетону, етанолу і пропандіолу-1,3. Розроблено модель-конструкцію рекомбінантного штаму-продуцента бутанолу, яка може бути більш ефективною у виробництві.

Розроблено та протестовано різні способи попередньої підготовки лігноцелюлозної біомаси та визначено оптимальний спосіб для кожного виду біомаси. Отримано два патенти на винахід: на пристрій для ультразвукового оброблення та на спосіб ультразвукової дезінтеграції незернової біомаси сільськогосподарських культур.

Результати дисертаційної роботи можуть бути використані як теоретичне підґрунтя під час розробки різного роду технологій біопалива, знайти практичне впровадження у процесі комплексного та раціонального

використання біологічних ресурсів і експериментального обґрунтування можливості використання клостридій для одержання біопалива. Крім того, результати дослідження макрокомпонентного складу сировини потенційно можуть становити інтерес для державних та комерційних установ, діяльність яких пов'язана зі створенням інноваційних джерел енергії.

Матеріали дослідження можуть використовуватись широким колом наукової спільноти, науково-педагогічними працівниками, студентами, аспірантами, фахівцями-біотехнологами у навчальному процесі підготовки бакалаврів, магістрів, докторів філософії.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням. Автором самостійно сформульовано концепцію роботи, розроблено структуру, обґрунтовано мету та задачі роботи, розроблено дизайн дослідження, проведено пошук і аналіз джерел літератури, сформульовано основні положення та висновки. Експериментальна частина була виконана автором особисто або за безпосередньої участі.

Обговорення особливостей проведення досліджень, отриманих результатів та матеріалів до публікації проводилось з науковим консультантом доктором біологічних наук, професором С.М. Шульгою.

Наукові роботи опубліковано у співавторстві з д.б.н., проф., академіком НАН України Я.Б. Блюмом, д.с.-г.н., проф., членом-кореспондентом НАН України Д.Б. Рахметовим, д.б.н., проф. С.М. Шульгою, д.т.н., проф. В.В. Братішком, д.т.н., с.н.с. С.Г. Прийомовим, к.х.н., с.д. Т.В. Ткаченко, к.б.н. Л.Б. Зеленою, к.б.н. Г.С. Андріяш та н.с. Н.Є. Бейко. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи було апробовано на фахових конференціях: 7th Congress of the all-Ukrainian public organization «Ukrainian society of cell biology» with international representation (Україна, Львів, 2024), International Scientific Conference Engineering for Rural Development (Jelgava, Latvia, 2024, 2023, 2022, 2021); XXIV міжнародній науково-практичній конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI столітті» (Україна, Київ, 2023); Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» (Україна, Київ, 2022); XVI International SummerSchool Conference Biology, Biotechnology, Biomedicine (Україна, Одеса, 2021); Всеукраїнській науково-практичній конференції пам'яті академіка Академії наук вищої освіти, професора Анатолія Володимировича Касперського «Актуальні проблеми та перспективи розвитку фундаментальних, прикладних, загальнотехнічних та безпекових наук» (Україна, Київ, 2021); XV з'їзд товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (Україна, Одеса, 2017).

Публікації. За матеріалами дослідження опубліковано 9 статей у наукових фахових виданнях, включених на дату опублікування до переліку

наукових фахових видань України, 5 статей у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus (три – у виданнях **Q2-Q3**, дві статті – у виданнях **Q4**), розділи в двох монографіях, два патенти на винахід, 32 тез доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Структура дисертаційної роботи включає вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати досліджень, узагальнення, висновки та список використаних літературних джерел, який нараховує 387 найменувань, додатки. Дисертація викладена на 346 сторінках, робота містить 35 таблиць та 92 рисунки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету та задачі досліджень, викладено наукову новизну та практичну цінність одержаних результатів, наведено відомості про апробацію результатів дисертаційної роботи.

Аналіз джерел літератури з проблематикою дослідження викладено у **першому розділі**, особлива увага приділяється дослідженню альтернативних видів біопалива та детальній характеристиці ацетон-бутанол-етанольного бродіння як мікробіологічного способу отримання біобутанолу. Наведено узагальнену інформацію щодо ресурсного потенціалу відновлювальних джерел сировини для ферментації. Окреслено переваги та перспективи використання метаболічної інженерії солвентогених клостридій для підвищення накопичення біобутанолу. Описано стратегії вдосконалення виробництва біобутанолу з лігноцелюлозної сировини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для досліджень використовували штами-продуценти бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570, *C. acetobutylicum* UCM B-7407, *C. tyrobutylicum* IFBG C4B, *Aspergillus awamori* UCM F-100017, *A. niger* IFBG 4, *A. oryzae* IFBG 49-B з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» (ІХБГ), подрібнену лігноцелюлозну сировину комунального походження; сік, багасу та незернову біомасу сорго цукрового (*Sorghum saccharatum* (L.) Moench) сорту Energodar (НБС, ІХБГ), hybrid AMBR-1 (НБС, ІХБГ), hybrid-720 (Alta Seeds Advanta US), hybrid ST-207 (RAGT Semences), міскантусу цукроквіткового сорт Снігопад *Miscanthus sacchariflorus* (НБС) та дроговидного проса *Panicum virgatum* L. (НБС), які було отримано з фітосировини рослин, вирощених на інтродукційно-селекційних ділянках Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка Національної академії наук України згідно з відповідним дорученням, сік кореневих бульб топінамбура *Helianthus tuberosus* (Florium, Україна), технічний гліцерин (Sator, Малайзія) та гліцерин сирець (Pharma, Бельгія), подрібнена зелена біомаса міскантусу *Miscanthus giganteus*, кукурудзи *Zea mays*, пшениці *Triticum* sp., сої *Glycine max*, ячменю *Hordeum* sp., ріпаку *Brassica napus*, проса *Panicum virgatum*, соняшнику *Helianthu* L. (все Національний

науковий центр «Інститут механізації та електрифікації сільського господарства» Національної академії аграрних наук України), компоненти дроговидного проса після автогідролізу – целюлоза, арабіногалактан та лігнін (Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії імені В.П. Кухаря Національної академії наук України); скоп ПрАТ «Київський картонно-паперовий комбінат» та біомасу вичавок (загальна вологість 4 %) після виробництва яблучного соку.

Описані умови та особливості культивування різних мікроорганізмів. Описано методи попередньої підготовки незернової рослинної біомаси як субстрату для культивування. Охарактеризовано методологію культивування штамів-продуцентів бутанолу. Описана покрокова інструкція виділення, очищення та ідентифікації нових лігнолітичних штамів бактерій. Детально описані методики гідролізу відновлювальної лігноцелюлозної сировини. Схарактеризоване обладнання, на якому проводили попередню обробку. Запропоновано методику ліофільного висушування та вивчення впливу захисного середовища на мікроорганізми. Методи газової хроматографії застосовувались для визначення накопичення розчинників у культуральній рідині.

Для секвенування тотальну ДНК виділяли шляхом лужного лізису з подальшим очищенням від протеїнів хлороформом (Merk, Німеччина) та екстракцією NaCl (Aplichem GmbH, Німеччина). Отриману загальну ДНК аналізували відповідно Shekelyan et al. 2021; Wilson, 2001. Секвенування проводили за допомогою Illumina NovaSeq (Illumina, США). Бібліотеку секвенування готували за протоколом Illumina без ПЛР. Протокол non-ПЛР використовували з метою уникнути артефактів з розподілу зчитувань при картуванні для зменшення нерівномірності охоплення зчитування, яка зазвичай спостерігається при поетапних методах ПЛР (Edwards et al., 2005). Використана методика дозволила більш точно оцінити кількість копій різних ділянок геному. Бібліотеку секвенували за допомогою Illumina NovaSeq з довжиною зчитування 2 по 150 нуклеотидів на обох кінцях. Збір даних *de novo* з Illumina здійснювали за допомогою програми Newbler v 3.0 (Nederbragt, 2014). Інструмент Burrows-Wheeler Alignment (Li et al., 2010) застосовано для мапування показань.

Скаффолдинг до найбільш близькоспорідненого геному було виконано програмою Multi-CSAR (Chen et al., 2018; доступною онлайн за <http://genome.cs.nthu.edu.tw/Multi-CSAR/>). Прогнозування генів і анотацію геному проводили за допомогою Prodigal (Hyatt et al., 2010) і NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (Li et al., 2021). Філогенетичний аналіз окремих генів здійснювали з використанням програмного забезпечення ClustalW (Larkin et al., 2007, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>), Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>) застосовано для пошуку та аналізу мутацій між штамми, Kaiju (Menzel et al., 2016) – для філогенетичного аналізу за типом метагеномних даних, а Krona (Ondov et al., 2011) – для візуалізації даних.

Необроблені зчитування та послідовність геному штаму були подані до NCBI та були позначені таким чином: ідентифікатор BioProject: PRJNA844305, номер доступу BioSample: SAMN28812949, GenBank: CP112872.

Для встановлення необхідних праймерів були використані програми Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), NEBcutter V2.0 (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>), для підбору плазміди була використана база даних Addgene (<https://www.addgene.org/vector-database/query/>), GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Для моделювання плазміди було використано середовище SnapGene (<https://www.snapgene.com/>).

Для проведення аналізу потоків метаболізму використано алгоритми лінійного програмування, оскільки вони можуть дуже швидко визначати оптимальні рішення великих систем рівнянь. COBRA Toolbox V3.0 (<https://opencobra.github.io/cobratoolbox/stable/index.html>) – це вільно доступний набір інструментів Matlab для виконання наступних розрахунків, а також було використано програму MetNetMaker для оптимізації розрахунків та моделювання. Усі експерименти проводили у трикратному повторенні. Статистичну обробку експериментальних даних виконано засобами Microsoft Excel 12.0 з урахуванням критерію Стюдента за допомогою Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Філогенетичний аналіз *Clostridium* sp. UCM B-7570. У результаті секвенування фрагменту геному 16S рРНК *Clostridium* sp. UCM B-7570 виявлено 99 % схожості із типовим штамом *C. pasteurianum* DSM 525. Дендрограма генетичних зв'язків між *Clostridium* sp. UCM B-7570 та різними видами роду *Clostridium* сконструйована на основі послідовностей генів 16S рРНК із застосуванням методу порівняння найближчих сусідів та двопараметричної моделі Кімури. Дендрограма, побудована на основі послідовностей генів 16S рРНК аналізованого штаму та штамів і видів роду *Clostridium*, показала, що *Clostridium* sp. UCM B-7570 та інші штами *C. pasteurianum* були об'єднані в одну групу, яка значно відрізнялася від інших *Clostridium* sp. Це підтвердило, що *Clostridium* sp. UCM B-7570 належав до виду *C. pasteurianum*. Послідовність нуклеотидів гена 16S рРНК *C. pasteurianum* UCM B-7570 надійшла до GenBank з інвентарним номером KU682660.

Визначення основних характеристик геному штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570. У результаті секвенування повного геному *Clostridium* sp. було показано, що він складався з 6 каркасів загальною довжиною 4 470 321 bp. Вміст гунін-цитозину (ГЦ) геному визначено на рівні 29,7 %, що відповідає вмісту ГЦ геномів інших видів *Clostridium*. Визначено, що геном містить 4262 гени, 4057 з яких кодують протеїни, містить 30 оперонів рРНК, 80 оперонів тРНК, 6 нкРНК та 89 псевдогенів. Для побудови карти геному використовувався онлайн-інструмент Proksee (рис. 1).

Мапу повного геному *Clostridium* sp. UCM B-7570 зображено як кільцеву хромосому на якій показано приблизне розташування ключових геномних особливостей, які обговорюються в цьому дослідженні. Два крайніх кола вказують на розташування ділянок кодування гена (синій) у ланцюгах плюс (коло один) і мінус (коло два). Гени, що кодують тРНК та рРНК, показані кольором фуксії та світло-блакитним відповідно. Коло третє показує вміст G+C

(відхилення від середнього), а коло четверте зображує переки́с G+C у плюсових (зелених) і мінусових (фіолетових) ланцюгах. Шкала геному вказана в Мбp на самому внутрішньому колі.

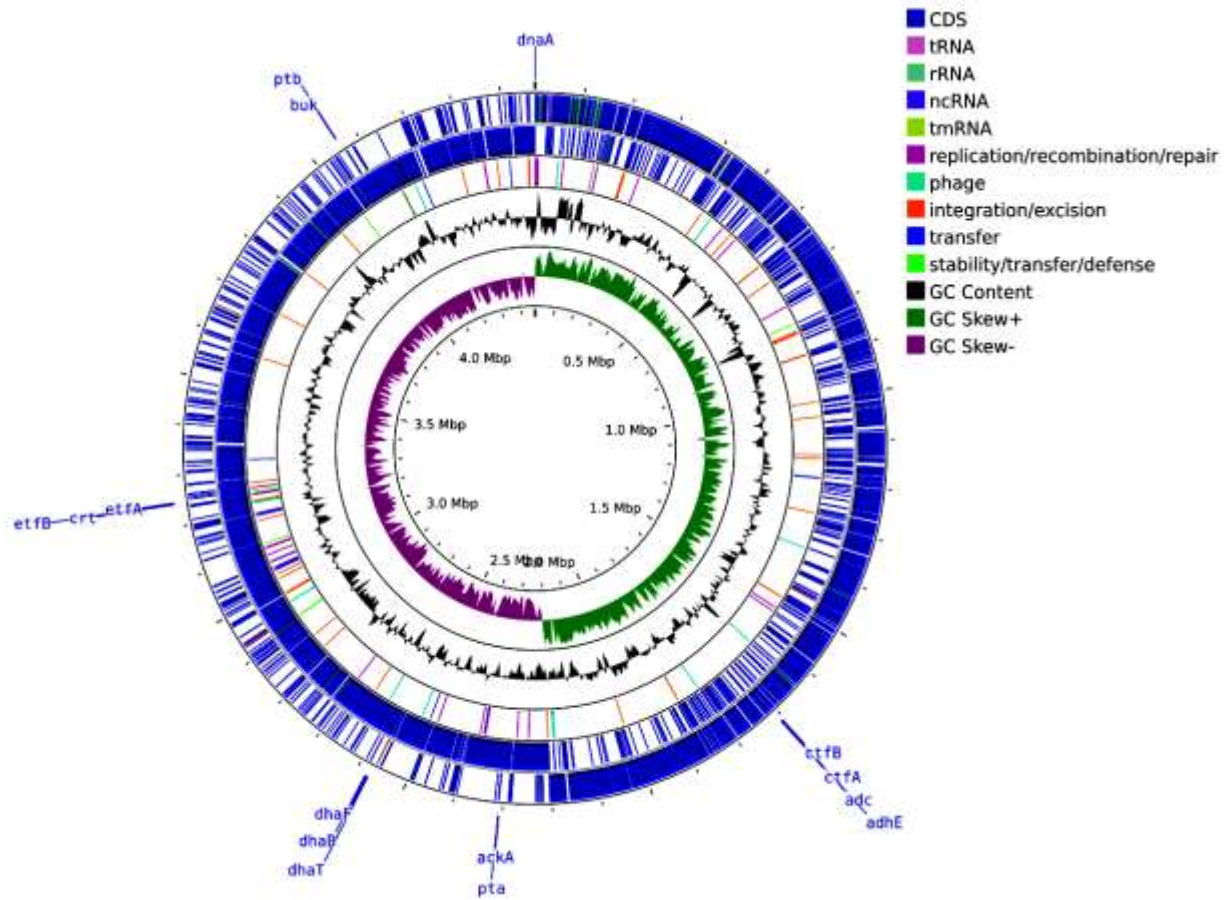


Рис. 1. Мапа повного геному *Clostridium* sp. UCM B-7570

Характеристика кластерів генів основних метаболічних шляхів. Було визначено п'ять генів (*hbd*, *etfB*, *etfA*, *bcd* і *crt*), залучених до метаболізму бутанолу (рис. 2). Подібно до *C. acetobutylicum* і *C. pasteurianum* (Pune et al., 2016; Tigunova et al., 2013), вони згруповані у кластер, розташований на каркасі 3, і включають гени: бутирил-КоА-дегідрогенази (*bcd*), флавопротеїну переносника електронів (*etfAB*), 3-гідроксибутирил-КоА дегідрогенази (*hbd*) і 3-гідроксибутирил-КоА дегідратази (*crt*).

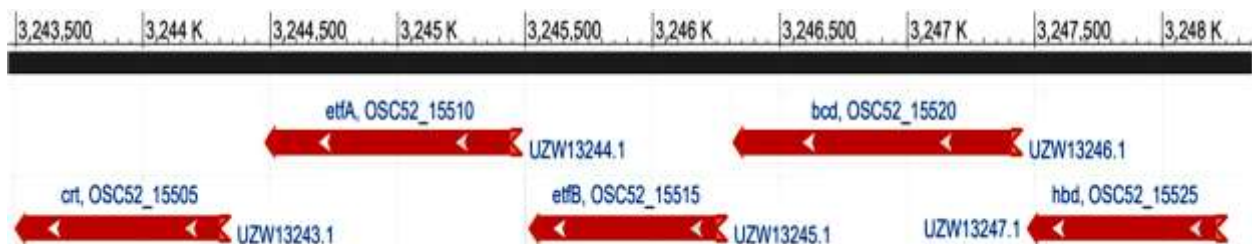


Рис. 2. Кластерна організація генів, які беруть участь у метаболізмі бутанолу (використано програму NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline)

Протеїнові послідовності ферментів показали 100 % подібність з послідовностями *C. pasteurianum* DSM 525 за незначним винятком *hbd1* (99,68 %) і *bcd1* (99,65 %). Окрім оперону бутанольного бродіння, геном штаму-продуцента *Clostridium* sp. UCM В-7570 також містив гени золь-оперону, організовані в солвентогенний оперон. Його було ідентифіковано на кластері 4. Чотири подібні послідовності до біфункціональної ацетальдегід-КоА/алкогольдегідрогенази (ацетальдегід-дегідрогенази/ алкогольдегідрогенази), кодованої генами *adhE* та *adhE1* у *C. pasteurianum* DSM 525, були виявлені в геномі *Clostridium* sp. UCM В-7570 (рис. 3).

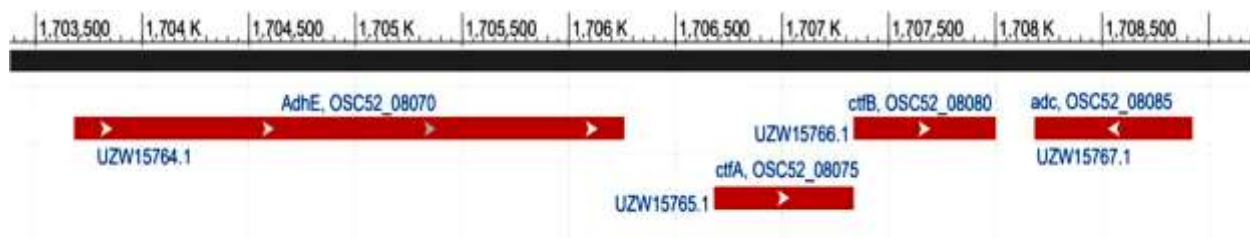


Рис. 3. Кластерна організація генів, які беруть участь у метаболізмі ацетону та ацетил-КоА (використано програму NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline)

Також виявлено гени, що кодують ензими, які беруть участь у метаболізмі ацетату та бутирату: ацетаткіназу (*ackA*), фосфатацетилтрансферазу (*pta*), бутираткіназу (*buk*) та фосфатбутирилтрансферазу (*ptb*). Нарешті, вісім генів (*dhaT*, *orfY*, *orfW*, *dhaG*, *dhaF*, *dhaE*, *dhaC* і *dhaB*), які беруть участь у метаболізмі 1,3-пропандіолу, локалізовано на 2 каркасах геному штаму *Clostridium* sp. UCM В-7570 (рис. 4).



Рис. 4. Кластерна організація генів метаболізму 1,3-пропандіолу (використано програму NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline)

Виділення та ідентифікація нового лігнолітичного штаму *Streptomyces graminifolii* IFBG Ave1. Застосування штучних мікробних консорціумів для біотехнологічних виробничих процесів є новою сферою досліджень (Medina et al., 2024) з великим потенціалом для вдосконалення встановлених, а також розробки нових процесів (Mittermeier et al. 2022). Чільне місце серед лігнолітичних бактерій займають бактерії роду *Streptomyces* (Cuebas-Irizazzy et al. 2024), тому саме них визначено для спільного

культивування з клостридіями для підвищення накопичення бутанолу. Для виявлення актиноміцетів було досліджено 9 зразків ґрунтів, відібраних в п'яти областях України. Проби зразків ґрунту було відповідно оброблено та досліджено протягом першої доби. Для визначення кількості мікроорганізмів в кожному із зразків розведення відповідної суспензії з ґрунту було приготовлено і висіяно на м'ясо-пептоне агаризоване середовище. Було отримано колонії актиноміцетів, які легко відрізнити від колоній інших ґрунтових бактерій за їх властивістю до складності видалення з агару за допомогою мікробіологічної петлі за рахунок заглиблення в середовище, що характерно для стрептоміцетів, які володіють агаролітичною активністю. Поверхні колоній представників роду *Streptomyces* були матові за рахунок повітряного міцелію та спор, тоді як колонії інших ґрунтових бактерій мали блискучу поверхню. Більшість колоній була забарвлена у сірий, коричнево-жовтий чи білий кольори, залежно від пігментів, які нагромаджувалися в спорах. Деякі з виділених актиноміцетів забарвлювали агар у яскраві кольори (синього, червоного, фіолетового) за рахунок активного синтезу та секреції кольорових продуктів вторинного метаболізму або мали зону просвітлення агару навкруги. Колонія з найбільшою зоною була вилучена. Культуру було ідентифіковано за послідовністю 16S рРНК, яка була видалена та секвенована. Для встановлення філогенетичних зв'язків між штамом *Streptomyces* sp. Ave 1 та іншими представниками роду *Streptomyces* було здійснено філогенетичний аналіз на основі послідовностей генів 16S рРНК з бази даних GenBank. У результаті секвенування 16S рРНК *Streptomyces* sp. Ave 1 виявлено 99 % схожість із типовим штамом *Streptomyces graminifolii* JL-22 (рис. 5).

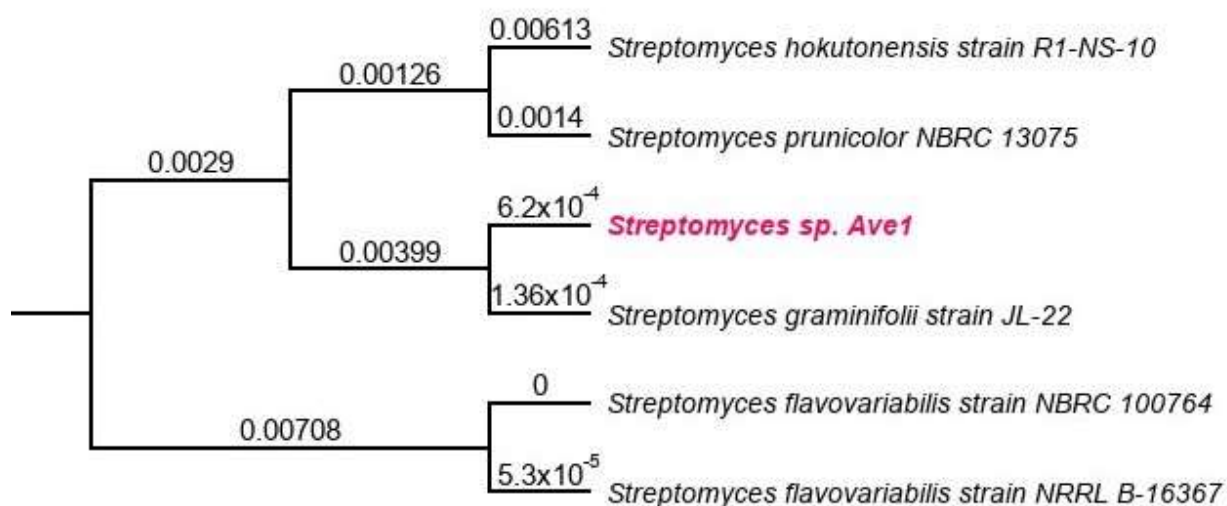


Рис. 5. Фрагмент дендрограми генетичних зв'язків між *Streptomyces* sp. Ave 1 та різними видами роду *Streptomyces*

Дендрограма, побудована на основі послідовностей генів 16S рРНК аналізованого штаму та штамів і видів роду *Streptomyces*, показала, що

Streptomyces sp. Ave 1 та *Streptomyces graminifolii* JL-22 об'єднані в одну групу, яка значно відрізнялася від інших *Streptomyces*.

Конструювання рекомбінантного штаму-продуценту бутанолу *in silico*. Велика субодиниця гліцеролдегідратази, кодована геном *dhaB*, була обрана як мішень для видалення гена. Для встановлення необхідних праймерів було використано програму Primer-BLAST. Для підбору плазмиди була використана база даних Addgene. В якості човникового вектора для *Clostridium* sp. UCM 7570 було обрано плазмиду pNICKclos1.0, яка містить в собі CRISPR Cas9. На першому етапі з вихідної плазмиди pNICKclos1.0 потрібно видалити ген *purE* та замінити його на фланковані послідовності гена мішені *dhaB*. Для ампліфікації *dhaB* праймери було розроблено для введення мовчазних мутацій у 20-нуклеотидну цільову послідовність передньої гомологічної області шаблону для редагування, щоб уникнути активності нікази Cas9 після геномної інтеграції. Виконавши описані маніпуляції отримуємо першу конструкцію.

Наступним кроком для створення несучої конструкції потрібне введення гайдерної РНК поблизу фланкованої послідовності гена мішені *dhaB*. Делеційний вектор гліцериндегідрогенази pNICKclos1.0-cas9n-dhaB, що містив ніказу cas9, направляючу РНК на *dhaB* та матрицю редагування H₁ та H₂ створено за допомогою програм BLAST та SnapGene. гРНК конструювали відповідно до вектора pNICKclos1.0 під контролем транскрипції синтетичного промотора. Шаблон редагування, що складався з двох ділянок по 1 кб, фланкуючих ген *dhaB*, синтезовано відповідно до послідовності геномної ДНК. гРНК і шаблон для редагування було внесено до модифікованої плазмиди pNICKclos1.0. Цільову послідовність CRISPR гРНК 20 нк було розроблено для індукції розриву в позиції 43–44 у кодуєчій послідовності *dhaB*. Шаблон для редагування (рис.6), що складається з двох областей гомології вище та нижче за *dhaB*, сконструйовано таким чином, щоб забезпечити видалення промотора *dhaB* та цільового сайту гРНК. Отримана конструкція дає змогу замовчування гену *dhaB*, що було перевірено аналізуванням потоків метаболізму.

Для аналізування потоків метаболізму було використано алгоритми лінійного програмування, оскільки за їх застосування можна швидко визначати оптимальні рішення великих систем рівнянь. Для побудови моделі за основу було обрано модель 20 метаболітів для *S. pasteurianum* DSM 525 та 28 основних реакцій (Schmitz et al., 2019). Метаболічний аналіз потоків було проведено за використання MATLAB toolbox CellNetAnalyzer. У моделі враховувалися лише нікотинамідаденіндинуклеотидН і ФерредоксинН, але не їхні відповідні окислені форми. Очікувалося, що весь АТФ, отриманий від фосфорилування на рівні субстрату на різних стадіях реакції, буде негайно використано для росту клітин, тому АТФ не був включений в модель. Стехіометрична матриця має повний ранг, тобто всі невимірні швидкості обчислюються. Система перевизначена зі ступенем надмірності одиниці. Видалення великої субодиниці гліцеролдегідратази (*dhaB*) за допомогою адаптованої ніказної системи *S. pyogenes* типу II CRISPR/Cas9 призвело до 1,3-пропандіол-дефіцитного

компоненти: лігнін (10-30 %) і воски (до 3 %), які впливають на механічну міцність лігноцелюлози і перешкоджають її біорозкладанню мікроорганізмами.

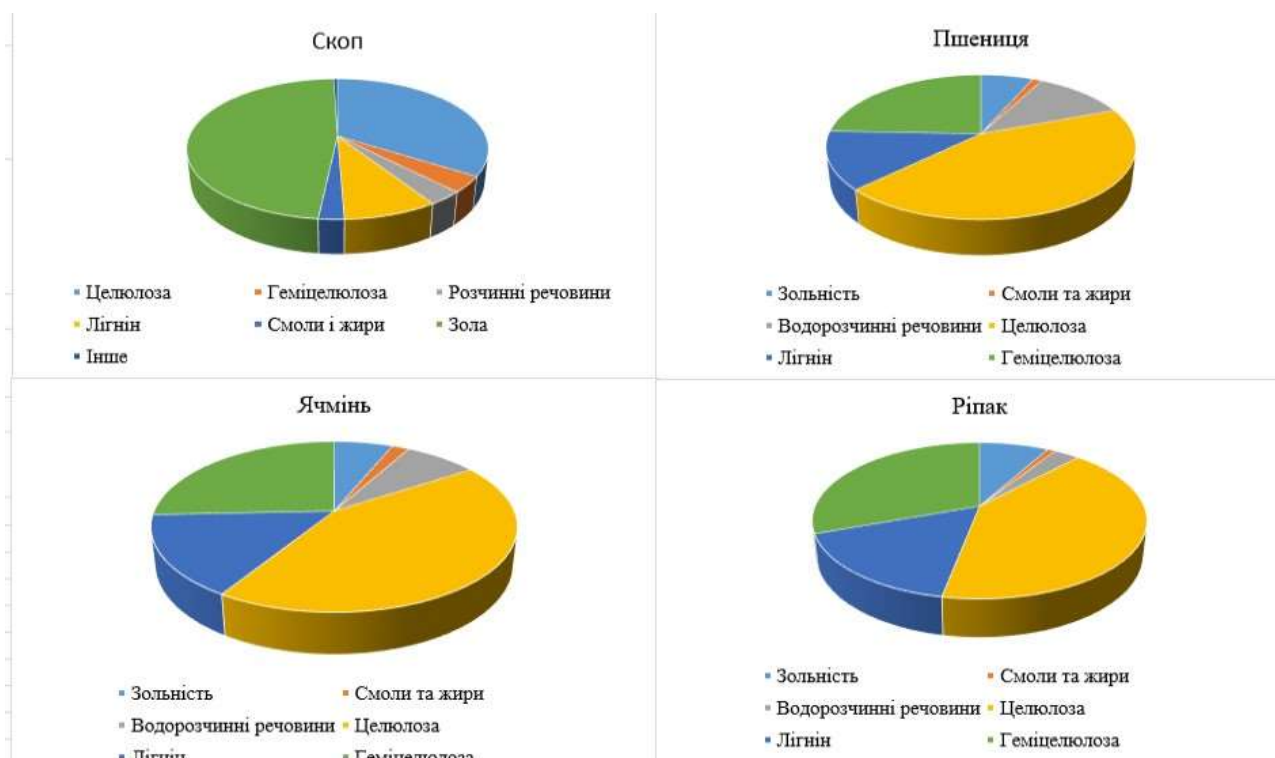


Рис.7. Макрокомпонентний склад різних видів лігноцелюлозної сировини

Тому видалення лігніну з лігноцелюлозної біомаси перед гідролізом целюлози та геміцелюлози бажано для успішної ферментації лігноцелюлози. Визначено, що 43,5 % біомаси соломи пшениці складала целюлоза, 24,4 % геміцелюлоза та 11,5 % відсотки водорозчинні речовини, які можуть бути використані мікроорганізмами для ферментації до бутанолу. Однак, в склад біомаси входило 12,9 % лігніну, що не конвертується мікроорганізмами. Натомість біомаса ячменю містила 43,1 % целюлози, 25,7 % – геміцелюлози та 7,7 % водорозчинних речовин, які можуть використовуватися в процесі ферментації, 15,5 % складав лігнін. У біомасі ріпаку превалюючими компонентами були целюлоза 41,1 % та геміцелюлоза 30,6 %, вміст компоненту, що не підлягав ферментації – лігніну 16,4 %. Відсотковий склад целюлози біомаси сої склав 35,2 %, основним компонентом виявилась геміцелюлоза 37,7 %, вміст лігніну не перевищував 16,5 %. Біомаса соняшника містила целюлози 48 % і лігніну 29 %. Незернова частина проса характеризувалася домінуючим складом целюлози 46,7 % та геміцелюлози, 23,4 %. Компонентна частка лігніну – 13,8 %. Отримані дані, показують потенціал біомаси як сировини для конвертування до бутанолу. Найбільша кількість лігніну містилася в незерновій біомасі соняшника, що свідчить про її низький потенціал, як сировини для ферментації.

Проведено хімічний аналіз відходів комунального походження (рис. 8): кронування дерев (тополя, дуб, береза, липа, каштан, клен), зелених відходів косіння газонної трави та різнотрав'я, опале листя (тополя, дуб, береза, липа,

каштан, клен) та технічних культур (міскантусів гігантського, цукрового та китайського, а також сорго цукрового).

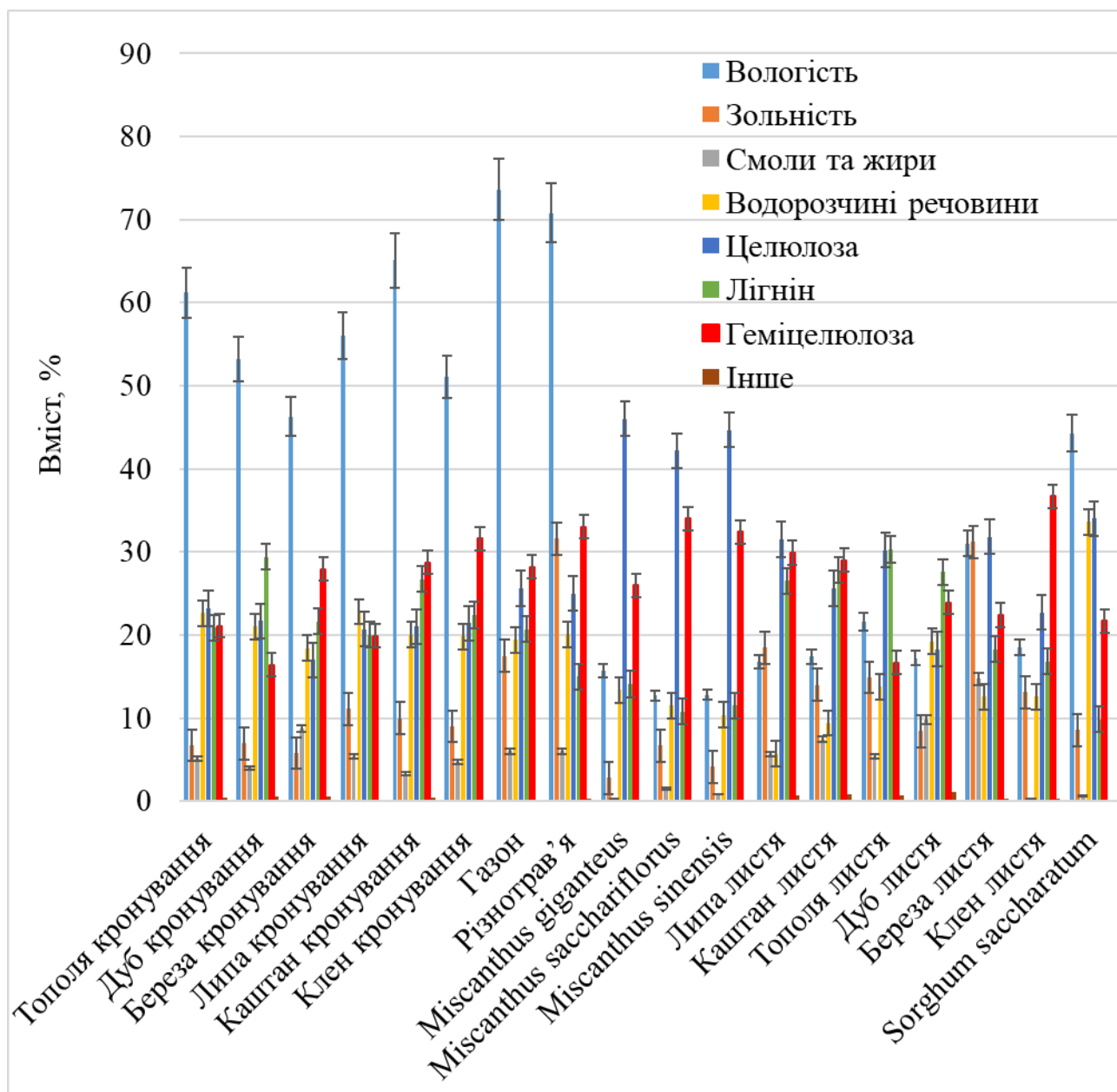


Рис. 8. Компонентний склад лігноцелюлозної біомаси

Хімічний склад сировини аналізували за такими групами: обрізки зелених гілок, опале листя, трав'яна сировина, включаючи технічні культури гігантський міскантус і цукрове сорго. Показано, що найвищий вміст целюлози мають зразки міскантусу гігантського (44,71 %), листя тополі (25,71 %), гілок тополі (23,24 %), газонної трави (21,12 %). Міскантус гігантський і сорго цукрове визначено як перспективні плантаційні види, здатні виконувати декоративно-захисні функції в міських ландшафтах. При цьому переважне розмноження міскантусу гігантського кореневищами має як переваги, до яких можна віднести можливість створення та підтримки життєздатного багаторічного насадження виду та покращення структури ґрунту, так і

недоліки, одним із головних з яких є висока вартість формування нової плантації. Найбільший вміст геміцелюлози виявлено в листі кленів (31,84 %), гілках кленів (28,73 %), міскантусі гігантському (25,31 %) та придорожній траві (23,23 %); смоли та жири – у березовому листі (10,12 %), гілках берез (8,73 %) та газонній траві (4,94 %); водорозчинні речовини – у сорго цукровому (30,75 %), гілках лип (22,81 %) та листі дубів (17,61 %); лігнін – у гілках дубів (29,41 %), листі тополь (25,76 %) та газонній траві (17,06 %); зола – у придорожній траві (31,63 %), листі берез (31,17 %) та гілках лип (11,14 %). Слід відмітити, що біомаса міскантусу містила найбільшу кількість целюлози 40,2 % та геміцелюлози 30,6 % і найнижче лігніну 10,7 % порівняно з іншими культурами.

Близько 70,0 % фруктових відходів припадає на яблука, вичавки яких складають 35,0 – 40,0 %. Було визначено макрокомпонентний склад вичавок після отримання соку з сорту Голден Делішес. Показано, що найбільшу частину яблучних вичавок складала цукри – 35 %. Другим і третім компонентом за відсотковим складом були целюлоза 17 % та лігнін 13 %. Решта компонентів була представлена в меншій кількості – крохмаль 8 %, лігноцелюлоза 6 %, пектин 6 %, білок 4 %, волога 4 %, зола 3 %, віск 2 %. Слід відзначити, що за макрокомпонентним складом вичавки сорту Голден Делішес відрізнялися від сорту Паперівка.

Задля комплексного вивчення перспектив використання сорго цукрового як сировини для отримання бутанолу готували сік (використовується як субстрат в мікробіологічній промисловості) та як відходи – багасу. На відміну від біомаси сорго цукрового багаса містить більше геміцелюлози (28 %) та лігніну (15 %), але менше целюлози (35 %). Визначено хімічний склад соку сорго цукрового, отриманого шляхом віджиму зеленої маси та показано, що сік містив достатню кількість мікроелементів і амінокислот для росту та розвитку мікроорганізмів. Отримані результати показали, що більша частина компонентів може бути використана у біоконверсії штамами-продуцентами роду *Clostridium*. Виняток становили пектин, клітковина та геміцелюлози, що ферментувалися лише частково, а також лігнін та віск, які не підлягали біоконверсії.

Використання незернової лігноцелюлозної біомаси. Проведено культивування штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 з використанням різних лігноцелюлозних субстратів, нативної незернової біомаси рослин – сої, ріпаку, проса та пшениці, і визначено рівень накопичення бутанолу. Результати представлено на рис. 9.

Показано, що незернова рослинна біомаса може конвертуватися до бутанолу штамом *Clostridium* sp. UCM B-7570. Відмічено, що накопичення цільового продукту за використання таких нативних субстратів сягало менше 1 г/л. Показано, що найбільший рівень бутанолу був за використання незернової біомаси сої (0,8 г/л), а найменший – соняшника (0,4 г/л). Визначено, що накопичення за культивування на біомасі ріпаку та кукурудзі було однаковим (0,7 г/л), що, ймовірно, пояснюється схожим відсотком лігніну у

сировині. Бутанол накопичувався на біомасі ячменю 0,6 г/л, а на пшениці – 0,5 г/л.

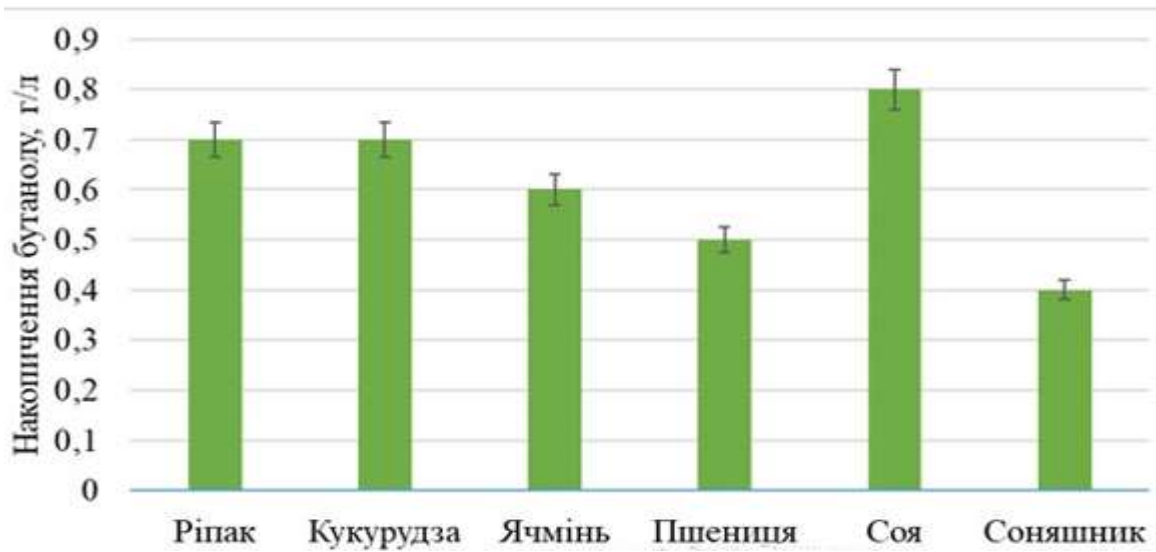


Рис. 9. Накопичення бутанолу за культивування на різних видах незернової рослинної біомаси *Clostridium sp.* UCM B-7570

Досліджено накопичення бутанолу штамми-продуцентами *Clostridium sp.* UCM B-7570, *C. tyrobutylicum* IFBG C4B та *C. acetobutylicum* UCM B-7407 у процесі культивування за використання біомаси ріпаку як субстрату (рис. 10). Після ферментації штамів-продуцентів у культуральній рідині було виявлено три основні продукти АБЕ (ацетон, бутанол і етанол). Показано, що найбільше накопичення бутанолу (2,3 г/л) було за використання подрібненої біомаси ріпаку як субстрату та штаму *Clostridium sp.* UCM B-7570, при цьому ацетон був присутній у незначній кількості (0,5 г/л), а етанол – в кількості 0,1 г/л.

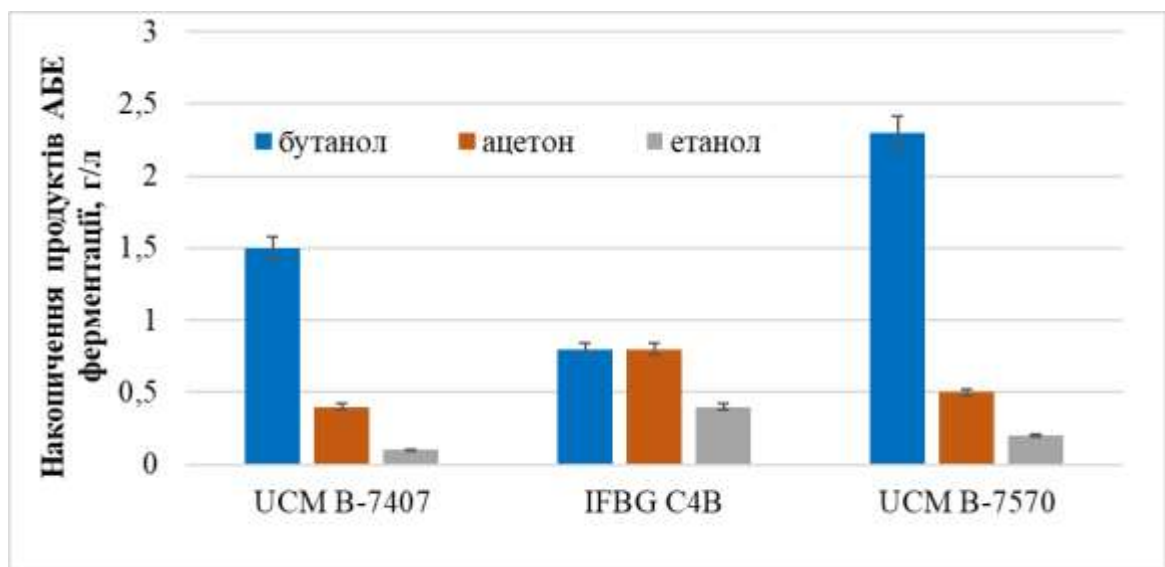


Рис.10. Накопичення бутанолу за використання ріпаку як субстрату

Для подальших досліджень було відібрано штам *Clostridium* sp. UCM B-7570, який продукував найбільше бутанолу з біомаси ріпаку. Накопичення бутанолу у культуральній рідині зростало пропорційно з підвищенням ступеню подрібнення біомаси ріпаку. Найбільше накопичення бутанолу було за подрібнення у 200 меш (0,076 мм). Отримані дані свідчать, що під час подрібнення субстрату підвищувалась біодоступність сировини. Таке підвищення біодоступності субстрату можливо за рахунок того, що під час подрібнення зменшувалась кількість кристалічних зон целюлози і збільшувалась кількість аморфних зон, які легко розщеплюються ензимами.

Було проведено дослідження впливу концентрації посівного матеріалу штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 на накопичення бутанолу з використанням біомаси ріпаку як субстрату. У результаті проведених досліджень показано, що концентрація внесеного інокуляту у посівне середовище суттєво впливає на накопичення бутанолу в ферментаційному середовищі. Показано, що зі збільшенням концентрації посівного матеріалу від 5 до 10 % від об'єму ферментаційної суміші, кількість бутанолу після культивування збільшується пропорційно. З підвищенням концентрації інокуляту до 15 – 20 % накопичення бутанолу зменшувалось. Подальше підвищення концентрації посівного матеріалу, доданого до ферментаційної суміші, загалом пригнічувало синтез бутанолу в середовищі.

Пригнічення синтезу бутанолу за умови збільшення концентрації інокулята може бути обумовлене підвищенням накопичення первинних метаболітів АБЕ бродіння (масляної, молочної та оцтової кислот). Оптимальна концентрація посівного матеріалу, який додавали до ферментаційної суміші, складала 10 %, накопичувалось найбільше бутанолу – 2,5 г/л. Подальші дослідження проводили саме за такої концентрації інокуляту. Однак, не лише концентрація посівного матеріалу відігравала ключову роль у накопиченні бутанолу. Одним із важливих факторів, який впливав на ріст та розвиток мікроорганізмів і АБЕ процес, була концентрація доступного джерела вуглецю. Як джерело вуглецю використовували суху подрібнену біомасу ріпаку без насіння.

Отримані дані свідчать, що накопичення бутанолу в ферментаційній суміші зростало пропорційно збільшенню концентрації біомаси ріпаку (субстрату) від 5 до 10 г/л. При підвищенні кількості внесеної сухої подрібненої біомаси ріпаку від 15,0 до 30,0 г/л, накопичення бутанолу знижувалось. Результати дослідження свідчать, що зі збільшенням концентрації вуглецевого субстрату зменшувалась біодоступність субстрату. Найбільше накопичення бутанолу (2,9 г/л) в ферментаційній суміші було отримано за концентрації сухої подрібненої біомаси ріпаку 10,0 г/л. Показано, що попередньо підготовлена біомаса ріпаку конвертувалась штамми *Clostridium* sp., при цьому накопичення бутанолу залежало від штаму, кількості посівного матеріалу, концентрації та ступеню подрібнення субстрату. Найбільше бутанолу (2,9 г/л) продукував штам *Clostridium* sp. UCM B-7570 за використання подрібненої 200 меш (0,076 мм) біомаси ріпаку в концентрації 10,0 г/л.

Промислові відходи виробництва яблучного соку (вичавки) містять цінні сполуки, такі як розчинні цукри, структурні вуглеводи (целюлоза та геміцелюлоза), мінерали та вітаміни. Було проведено ферментацію з використанням 100 г/л вичавок та штамів продуцентів *Clostridium* sp. UCM B-7570 та *C. acetobutylicum* UCM B-7407. Після закінчення ферментації було показано, що штам *Clostridium* sp. UCM B-7570 накопичив бутанолу у культуральній рідині 8 г/л, а етанолу – 1,3 г/л, натомість *C. acetobutylicum* UCM B-7407 – 6 г/л та 0,9 г/л, відповідно. Ацетон та пропандіол були присутні у слідових кількостях серед продуктів ферментації обох штамів. Конверсія цукрів склала 85 % і 80 %, відповідно, а сухий залишок 34,15 % та 38,6 %. У подальших дослідженнях використовували штам *Clostridium* sp. UCM B-7570, який накопичував найбільшу кількість цільового продукту, мав найбільшу конвертацію цукру та найменший сухий залишок.

Основним фактором, який впливає на ріст, розвиток та АБЕ процес бактерій, є концентрація доступного джерела вуглецю. Проведено дослідження впливу різної концентрації біомаси яблучних вичавок у ензиматичному середовищі на накопичення бутанолу (рис.11).

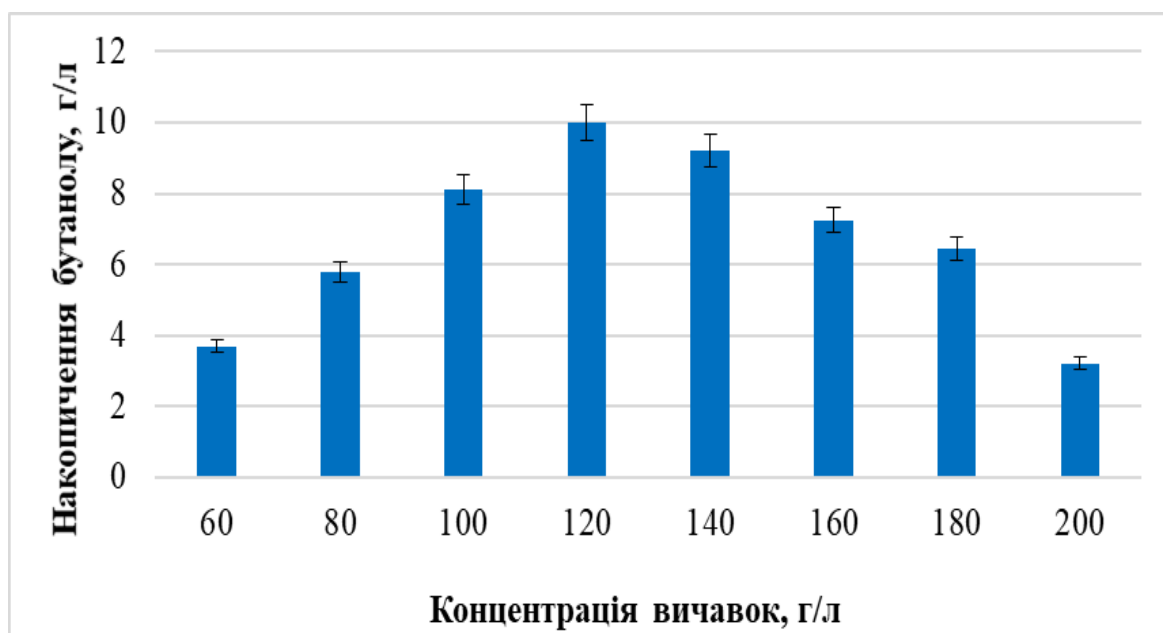


Рис. 11. Вплив різної концентрації вичавок на накопичення бутанолу

Отримані дані свідчать, що накопичення бутанолу в ферментаційній суміші росте прямопропорційно зі збільшенням концентрації яблучних вичавок від 60 до 120 г/л, при подальшому підвищенні від 140 до 200 г/л накопичення бутанолу падало. Результати дослідження свідчать, що зі збільшенням концентрації вуглецевого субстрату зменшується його біодоступність. Найбільше накопичення бутанолу (10 г/л) було отримано за концентрації яблучних вичавок в ензиматичній суміші 120 г/л. Таким чином, дослідження альтернативного субстрату – яблучних вичавок, показало можливість їх

конвертування штамами *Clostridium* sp. UCM В-7570 та *C. acetobutylicum* UCM В-7407 до бутанолу без гідролізу.

Сорго цукрове визначено як один з перспективних плантаційних видів, здатних виконувати декоративно-захисні функції в міських ландшафтах. Проведено культивування штамів *Clostridium* sp. UCM В-7570, *C. acetobutylicum* UCM В-7407 та *C. tyrobutylicum* IFBG С4В з використанням як субстрату соку, багаси і незернової біомаси сорго цукрового. Отримані дані свідчать, що найменше накопичення (0,5 г/л) бутанолу у культуральній рідині було за використання подрібненої до 200 меш біомаси цукрового сорго та штаму *C. tyrobutylicum* IFBG С4В. Найбільше накопичення (8,2 г/л) бутанолу було за використання нативного соку сорго цукрового та штаму *C. acetobutylicum* UCM В-7407, а для рослинної біомаси – *Clostridium* sp. UCM В-7570 (5,5 г/л).

Підготовка субстрату впливає на накопичення кінцевого продукту, тому на першому етапі підготовки біомаси сорго цукрового (сорт Energodar, hybrid АМВR-1, hybrid-720, hybrid ST-207) висушували до сталої вологості (7 %) та подрібнювали. Для вивчення можливості культури *Clostridium* sp. UCM В-7570 використовувати як субстрат біомасу сорго цукрового (сорт Energodar, hybrid АМВR-1, hybrid-720, hybrid ST-207) проводили культивування глибинним способом. Отримані дані показують, що культура *Clostridium* sp. UCM В-7570 утворювала колонії на всіх 4 агаризованих середовищах. Навколо колоній були характерні зони просвітлення та скупчення пухирців газу. Результати дослідження свідчать, що культура *Clostridium* sp. UCM В-7570 може ферментувати біомасу усіх 4 сортів сорго. Колонії культури було досліджено за допомогою мікроскопу Carl Zeiss 2000-с (рис. 12).

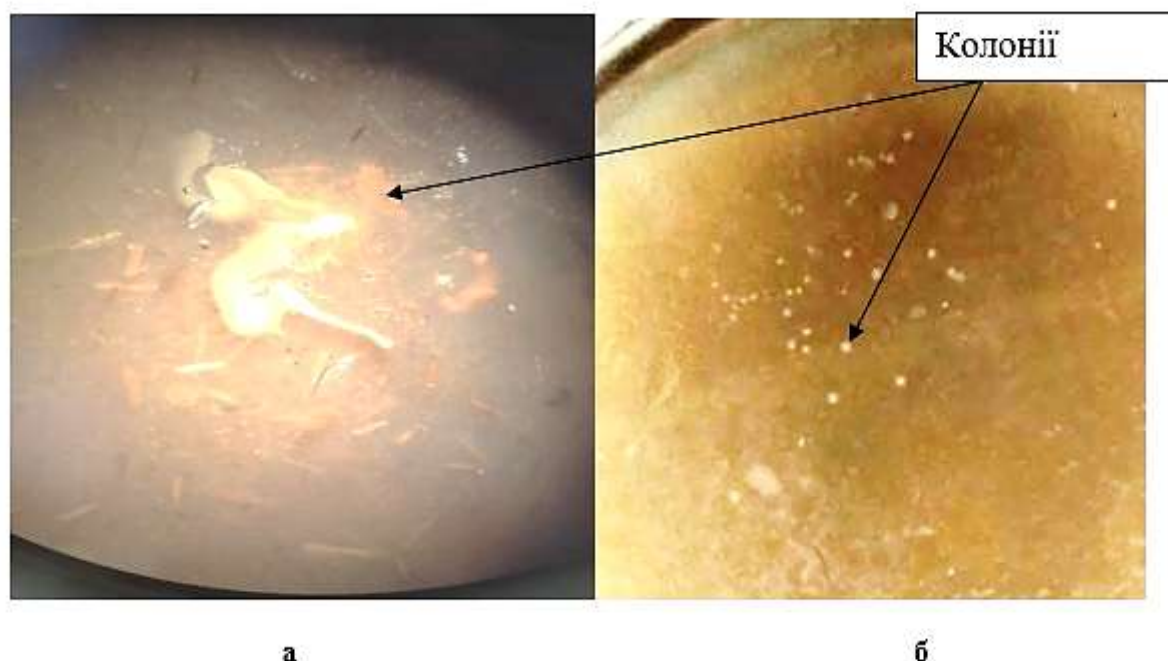


Рис. 12. Колонії культури *Clostridium* sp. UCM В-7570 за використання сорго цукрового як субстрату у товщі агару (а) збільшення 23×10 та на поверхні (б)

Навколо колоній утворювались характерні зони просвітлення та скупчення пухирців газу, це свідчать, що культуру *Clostridium* sp. UCM B-7570 можна використовувати для біоконверсії біомаси цукрового сорго. Колонії змінювали свою форму з двояковипуклої лінзи на амебоподібну за вирощування у товщі агару, що можливо, пов'язано зі складністю в доступності субстрату.

За культивування різних сортів сорго цукрового було показано активне бродіння з наступним накопиченням продуктів АБЕ ферментації у культуральній рідині. Найбільший рівень накопичення бутанолу у культуральній рідині відмічено за умов використання біомаси сорго цукрового сорту Energodar та hybrid AMBR-1 (5,2 та 5 г/л, відповідно). Натомість за використання hybrid-720, hybrid ST-207 бутанол теж накопичувався, але у меншій кількості (1,5 г/л в обох випадках).

Для зниження собівартості мікробного синтезу та підвищення рентабельності технології отримання біобутанолу використовували як субстрат гліцерин-сирець – неочищений побічний продукт виробництва біодизелю. Було детально вивчено склад різних фракцій гліцерину-сирцю за допомогою хроматографічного аналізу. Вихідний гліцериновий шар містив досить мало власне гліцерину. У сумі ідентифіковані компоненти складали більше половини маси гліцеринового шару (51,6 %). Решта 48,4 % можуть бути продуктами неповного перетворення триглицеридів – моно- та диглицеридів, лужнометалічними солями жирних кислот (мила), лужним каталізатором переетерефікації, що перейшов до гліцеринового шару, водою чи нежировими компонентами вихідної олії. Виходячи з отриманих результатів було проведено дослідження накопичення бутанолу штамом *C. acetobutylicum* UCM B-7407 (рис. 13.1). За використання гліцерину-сирцю з концентрацією в межах від 10 до 20 г/л відбувається біоконверсія до бутанолу. Найбільше накопичення бутанолу (2 г/л) було за концентрації 16 г/л гліцерину-сирцю у середовищі, а повне інгібування розвитку культури – за концентрації 25 г/л.

Для підвищення накопичення бутанолу за мінімальної концентрації гліцерину-сирцю у середовищі було проведено культивування *C. acetobutylicum* UCM B-7407 від'ємно-доливним методом (рис. 13.2). У процесі культивування накопичення бутанолу штамом *C. acetobutylicum* UCM B-7407 у культуральній рідині не змінювалось протягом першого періоду – циклу вилучення-доливання середовища напівбезперервного культивування. Починаючи з другого по четвертий період накопичення бутанолу зменшилось у два рази. За подальшого використання від'ємно-доливого методу накопичення бутанолу знижувалось у 8 разів та остаточно припинялось у шостому періоді.

Види попередньої підготовки лігноцелюлозної сировини. Одним із методів комплексної підготовки лігноцелюлозної сировини є вибуховий автогідроліз, який забезпечує майже повну деструкцію біомаси та дає можливість виділити складові компоненти лігноцелюлозної сировини. У результаті проведених досліджень встановлено, що в рослинній біомасі після автогідролізу накопичується фурфурол, який інгібує розвиток бактерій.

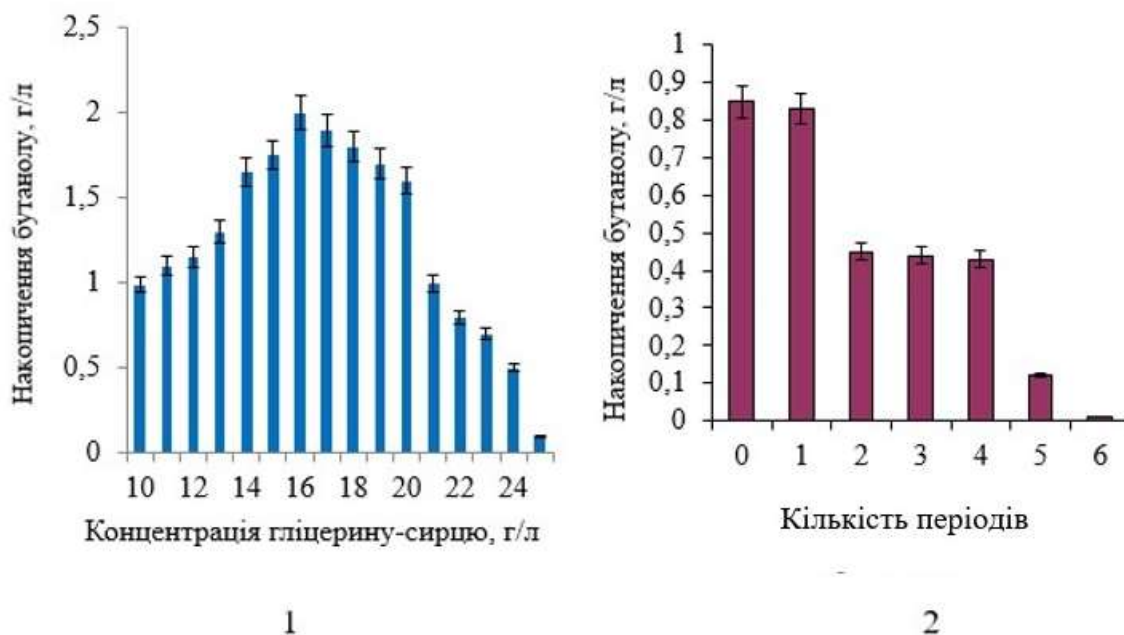


Рис. 13. Накопичення бутанолу у процесі культивування штаму *C. acetobutylicum* UCM В-7407 за використання різної концентрації гліцерину-сирцю (1) та за різних періодів культивування (2)

Для уникнення інгібуючого впливу фурфурол видаляли, а біомасу розділяли на компоненти. Штами-продуценти у процесі культивування з використанням отриманих компонентів біомаси продукували різні кількості бутанолу. Найбільша концентрація бутанолу (2,8 г/л) отримана за використання штаму *Clostridium* sp. UCM В-7570 на біомасі дротовидного проса після автогідролізу та «відгонки» фурфуролу. Для підтвердження здатності штамів-продуцентів роду *Clostridium* до ферментації целюлози штами *C. acetobutylicum* UCM В-7407 та *Clostridium* sp. UCM В-7570 переносили на фільтрувальний папір. Через 72 години культивування на фільтрувальному папері з'явилися зони прояснення, а через 120 годин спостерігалось руйнування паперу навколо колоній. Результати дослідження продемонстрували наявність у обох культур целюлаз та можливість штамів використовувати целюлозу як джерело вуглецю.

Потенційним джерелом целюлози є також і скоп – відходи целюлозно-паперової промисловості. Для встановлення впливу автогідролізу на скоп було вивчено його компонентний склад до та після оброблення. Отримані дані свідчать, що скоп майже наполовину складається з неорганічних компонентів, які не можуть слугувати поживним середовищем для мікроорганізмів. Оскільки скоп – це відходи целюлозно-паперової промисловості, то 2/3 органічної частки становить целюлоза, кількість якої після термобаричної обробки дещо зростає, як і для проса. Однак, скоп збіднений на цукри та водорозчинні речовини і його доцільно застосовувати у процесах, що потребують дешевої целюлозовмісної сировини. Було проведено культивування штамів *C. acetobutylicum* UCM В-7407 та *Clostridium* sp. UCM В-7570 на середовищі з різною підготовкою

субстрату – скопу. Отримані дані свідчать, що штами *Clostridium* sp. UCM B-7570 та *C. acetobutylicum* UCM B-7407 можуть конвертувати навіть необроблений скоп до бутанолу, однак накопичення цільового продукту є низьким 0,3 та 0,1 г/л, відповідно. Подрібнення сировини призводило до збільшення продукування бутанолу до 0,8 та 0,6 г/л, відповідно, але найкращим методом попередньої підготовки сировини був автогідроліз. За використання скопу, обробленого вибуховим автогідролізом, накопичення бутанолу у культуральній рідині становило 1,6 та 1,1 г/л, відповідно. Слід відмітити, що при вибуховому автогідролізі скопу фурфурол утворювався в незначній кількості, що не впливало на життєдіяльність мікроорганізмів та не потребувало додаткового розділення.

Ультразвукову дезінтеграцію (УЗД) зазвичай використовують для лізису клітин і гомогенізації, однак, вона може бути також ефективним методом руйнування жорстких клітинних оболонок, відбувається за відносно низької температури порівняно з мікрохвильовою обробкою та автоклавуванням, не потребує попереднього використання хімічних деструкторів, що зменшує вартість процесу підготовки. Проведено дослідження шести видів нативної та обробленої (УЗД) незернової рослинної біомаси як субстрату для культивування штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 та визначено накопичення бутанолу у культуральній рідині. Культивування штаму на попередньо обробленій (УЗД) біомасі підвищувало накопичення бутанолу у культуральній рідині (табл. 1). Після ферментації штаму-продуценту *Clostridium* sp. UCM B-7570 у культуральній рідині було виявлено всі три продукти ацетон-бутанол-етанольного процесу. Показано, що найбільше накопичення бутанолу (0,7 г/л) було за використання подрібненої біомаси ріпаку (100 г/л) як субстрату і штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570. У цьому випадку етанол і ацетон були присутні в незначній кількості – 0,05 г/л і 0,02 г/л відповідно. Однак, важливим є встановлення параметрів попередньої підготовки рослинної сировини за яких вихід бутанолу в процесі культивування був би найбільшим. Параметри УЗД опосередковано впливали на накопичення цільового продукту. У результаті досліджень було встановлено, що фактор «час ультразвукового оброблення суспензії – t » не чинить помітного впливу на кінцевий результат, що свідчить про необхідність коригування меж варіювання цього параметру та встановлення верхньої межі варіювання на рівні 5 хвилин. У деяких зразках відмічено підвищене накопичення етанолу замість бутанолу. Така зміна пов'язана, на нашу думку, зі зміною вуглецево-азотного співвідношення середовища після ультразвукової дезінтеграції. Найвищий питомий вихід біобутанолу (2,445 г/л та 48,9 г/кг) спостерігався для таких значень параметрів: $s = 5 \%$, $\mu = 0,72$ Вт/мл, що відповідає верхній межі варіювання цих параметрів. Найменший питомий вихід бутанолу (1,16 г/л та 11,62 г/кг) спостерігався у випадку $s = 10 \%$ і $\mu = 0,18$ Вт/мл, що відповідає нижній межі варіювання. У контрольних зразках, що не обробляли УЗД, накопичення біобутанолу становило 0,2 та 0,7 г/л в залежності від концентрації незернової біомаси – 50 та 100 г/л, відповідно.

Вплив параметрів УЗД на накопичення бутанолу

Час оброблення, хв.	Вміст сухої речовини, %	Питома потужність УЗ, Вт/мл (об'єм, л)	Продукти АБЕ ферментації, мг/л		Залишок рослинної біомаси, г/л
			етанол	бутанол	
25	10	0,72	340,0±13,6	1567,0±62,7	73,6±2,9
25	10	0,18	300,0±12,0	1162,0±46,5	34,3±1,4
25	5	0,72	320,0±12,8	2445,0±97,8	18,5±0,7
25	5	0,18	310,0±12,4	1632,0±65,3	34,6±1,4
25	7,5	0,45	600,0±24,0	146,0±5,8	70,7±2,8
5	10	0,72	330,0±13,2	1225,0±49,0	85,6±3,4
5	10	0,18	240,0±9,6	1237,0±49,5	83,3±3,3
5	5	0,72	330,0±13,2	2370,0±94,8	18,6±0,7
5	5	0,18	500,0±20,0	2156,0±86,2	19,8±0,8
5	7,5	0,45	800,0±32,0	253,0±10,1	64,8±2,6
15	10	0,45	700,0±28,0	321,0±12,8	94,1±3,8
15	5	0,45	520,0±20,8	216,0±8,64	48,9±2,0
15	7,5	0,72	700,0±28,0	116,0±4,6	70,6±2,8
15	7,5	0,18	700,0±28,0	74,0±3,0	63,3±2,5
15	7,5	0,45	900,0±36,0	189,0±7,6	65,6±2,6
-	50	-	130,0±5,2	24,0±1,1	42,6±1,7
-	100	-	50±2,0	73,0±2,9	96,1±3,8

Комбіновані види гідролізу. Проведено дослідження п'яти видів сировини, обробленої за допомогою різних видів попередньої підготовки для культивування штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM 7570 та визначено накопичення бутанолу у культуральній рідині через 72 години ферментації (табл. 2). Показано, що культивування штаму *Clostridium* sp. UCM В-7570 за використання незернової біомаси п'яти видів сільськогосподарських відходів з різною попередньою підготовкою існує можливість підвищення накопичення бутанолу за умов використання декількох підходів. Отримання бутанолу залежало від методу оброблення різних видів лігноцелюлозної сировини. Результати дослідження свідчать, що за лужного гідролізу біомаси сої та соняшника накопичення цільового продукту зростало в 2,8 та в 3 рази, відповідно. Натомість, найбільший показник акумуляції бутанолу на незерновому сільськогосподарському відході пшениці отримано за застосування УЗД і він був вищий у 3 рази. Показано, що використання комбінованого кислотно-ензиматичного гідролізу для біомаси ячменю та кукурудзи збільшувало накопичення бутанолу у культуральній рідині у 4 та 5 разів, відповідно. Менш ефективним виявився кислотний гідроліз, очевидно за рахунок накопичення інгібіторів у середовищі та лужно-ензиматичний, що може бути пов'язано з зменшенням активності ензимів після лугів.

Накопичення бутанолу на різних видах лігноцелюлозних субстратів

Субстрати	Бутанол, г/л
зелена біомаса: сої <i>Glycine max</i>	1,5±0,1
- ріпаку <i>Brássica nápus</i>	2,3±0,1
- пшениці <i>Triticum sp.</i>	0,3±0,1
- дроговидного проса <i>Panicum virgatum L.</i>	2,8±0,1
- ячменя <i>Hordeum sp.</i>	1,2±0,1
- соняшнику <i>Helianthu L.</i>	1,0±0,1
- <i>Miscanthus saccharioflorum</i>	1,2±0,1
- сорго <i>Sorgum sacharatum</i> AMBR-1	5,0±0,2
Енергодар	5,2±0,2
hybrid-720	1,5±0,1
hybrid ST-207	1,5±0,1
сік	8,2±0,3
кукурудзи <i>Zea mays</i>	0,7±0,1
вичавки з яблук	6,0±0,2
дроговидне просо - компоненти після термобаричного гідролізу	2,0±0,1
скоп	0,8±0,1
- після термобаричного гідролізу	1,7±0,1
сорго - AMBR-1 Індія кислотно-ензиматичний гідроліз	6,2±0,3
- hybrid-720 кислотно-ензиматичний гідроліз	2,0±0,1
- hybrid ST-207 лужно-ензиматичний	2,0±0,1
- Енергодар кислотно-ензиматичний гідроліз	7,0±0,3
- Енергодар органозольно-ензиматичний гідроліз 90 хв	8,0±0,3
<i>Miscanthus saccharioflorum</i> кислотно-ензиматичний гідроліз	2,5±0,1
<i>Zea mays</i> кислотно-ензиматичний гідроліз	3,2±0,1
<i>Brássica nápus</i> ультразвукова дезінтеграція	2,5±0,1
<i>Triticum sp</i> ультразвукова дезінтеграція	1,6±0,1
<i>Hordeum sp.</i> кислотно-ензиматичний гідроліз	2,2±0,1
<i>Glycine max</i> лужний гідроліз	2,8±0,1
<i>Helianthu L.</i> лужний гідроліз	1,8±0,1

Оптимізація технологічних параметрів з урахуванням потреб культур, дала змогу підвищити накопичення цільового продукту. Було показано, що оброблення за допомогою кислотного гідролізу біомаси ріпаку не суттєво впливало на накопичення продуктів АБЕ ферментації. Лужна та лужно-ензиматична попередня підготовка сировини знижувала накопичення бутанолу у культуральній рідині порівняно з нативною біомасою. Найбільше

накопичення бутанолу було отримано за кислотно-ензиматичної попередньої обробки та становило 2,7 г/л порівняно з нативною біомасою – 1,7 г/л. Вивчення біомаси міскантусу як сировини показало, що найбільше накопичення бутанолу було отримано за кислотно-ензиматичної попередньої обробки та становило 2,5 г/л порівняно з нативною біомасою – 1,2 г/л, тоді як інші гідролізати показали нижчий вихід продуктів АБЕ ферментації, ймовірно, через утворення інгібіторних сполук під час оцукрювання. Показано, що за культивування штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 на біомасі чотирьох генотипів сорго цукрового, але з різними видами попередньої підготовки існує можливість підвищення накопичення бутанолу за умов використання декількох видів попередньої обробки. Визначено, що найбільше накопичення бутанолу було отримано за кислотно-ензиматичного гідролізу біомаси сорго цукрового сорту Energodar та становило 7 г/л (з вихідною біомасою – 5,3 г/л). Отримані результати свідчать про те, що біомаса сорго цукрового сорту Energodar є найбільш перспективною для отримання бутанолу як за умов використання вихідної сировини, так і після її гідролізу. Для підвищення накопичення біобутанолу біомасу сорго цукрового сорту Energodar попередньо обробляли органозольним (60 та 90 хв) та термобаричним (вибуховий автогідроліз) гідролізом та визначено накопичення продуктів АБЕ ферментації. Найбільший рівень накопичення бутанолу (8 г/л) штамом *Clostridium* sp. UCM B-7570 у культуральній рідині отримано за використання органозольно обробленої біомаси сорго цукрового сорту Energodar протягом 90 хв. Встановлено, що використання різних видів гідролізу для попередньої підготовки біомаси підвищувало накопичення бутанолу.

Імобілізація штаму-продуценту бутанолу на різних носіях. Для підвищення накопичення бутанолу штамом з використанням гліцерину-сирцю як субстрату було проведено імобілізацію клітин культури на різних носіях, які мали високу адгезивну активність щодо культури. Після імобілізації на всіх носіях було отримано приєднану біомасу клітин, однак, за цитологічними дослідженнями морфологія культури змінилась. Клітини імобілізованої культури прикріплювались до носіїв та утворювали довгі ланцюги з приблизно 20 клітин. Вихідна неімобілізована культура таких ланцюгів не утворювала. Таким чином, можна зробити висновок, що імобілізовані клітини знаходяться в якомусь особливому стані, відмінному від стаціонарної фази росту, і не перебувають у стані спокою, разом з цим у більшості випадків кінетичні характеристики росту імобілізованих клітин свідчили про те, що розмноження клітин, ймовірно, гальмується процесами, які відбуваються у цих клітинах і які відсутні повністю або не відбуваються з інтенсивністю такого ж рівня, у вільних клітинах. Для визначення кількості клітин на носії було проведено відмивання носіїв та висушування отриманої мікробної біомаси до абсолютно сухої ваги (АСВ). Показано, що біомаса бактерій, що імобілізувалася на тканині бельтінгу, була в 5 разів більше відносно інших носіїв. У попередніх дослідженнях було показано, що найкращим джерелом вуглеводу для культури був технічний гліцерин, тому було проведено культивування імобілізованих

клітин з використанням технічного гліцерину як субстрату та визначено накопичення бутанолу (рис. 14.1). Накопичення бутанолу підвищилось за використання іммобілізованих культур на кільцях Рашига та смужках бельтінгу. Натомість, культура іммобілізована на феритових кільцях втратила властивості до синтезу продуктів АБЕ ферментації та накопичувала лише кислоти. За результатами дослідження можна зробити висновок, що іммобілізація штаму на кільцях Рашига дала змогу підвищити накопичення бутанолу в 2 рази (з 5,8 до 11 г/л, відповідно). Було проведено дослідження використання незернової рослинної біомаси та іммобілізованої культури на різних носіях. За використання іммобілізованих культур та лігноцелюлозної сировини було отримано етанол, а не бутанол (рис. 14.2).

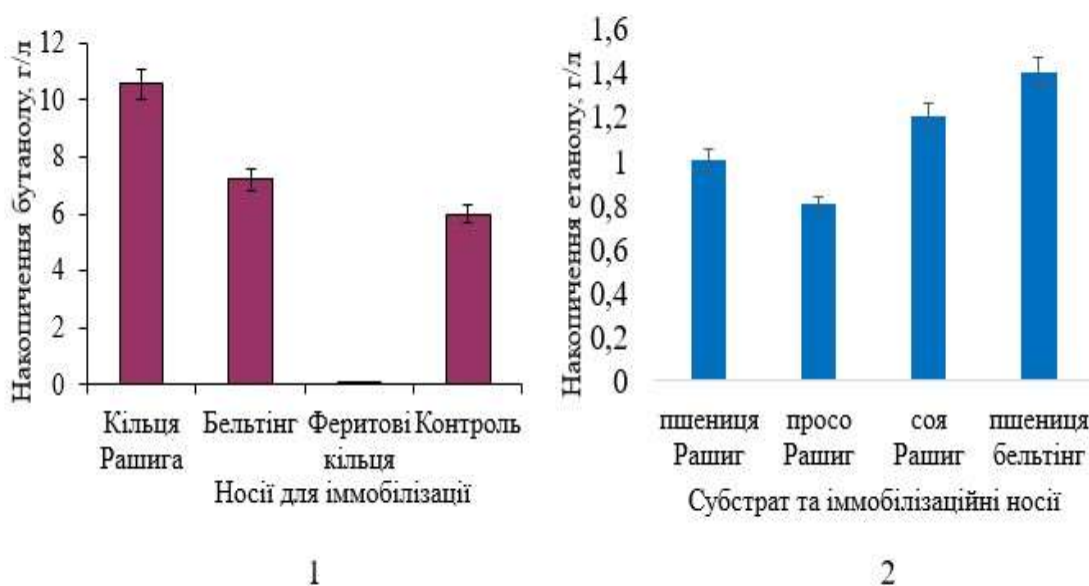


Рис.14. Накопичення бутанолу за використання іммобілізованої культури на технічному гліцерині (1) та етанолу на лігноцелюлозній біомасі (2)

Спільне культивування. Спільне культивування, за умови ефективно підібраних партнерів, дає можливість підвищити швидкість та глибину гідролізу субстрату, прискорити біосинтез ензимів, збільшити їхню активність та прискорити утворення метаболітів. Проведено культивування *S. graminifolii* та *Clostridium* sp. UCM В-7570. Дослідження проводились на нативній біомасі зі спільним внесенням двох видів одночасно та за попереднього культивування *S. graminifolii* продовж 72 год (рис. 15). Отримані дані показали, що вирощування *S. graminifolii* на всіх видах незернової рослинної біомаси до інокулювання середовища *Clostridium* sp. UCM В-7570 знижувало накопичення бутанолу. Це може бути обумовлення використанням стрептоміцетами розщеплених цукрів для власного споживання та нарощування біомаси.

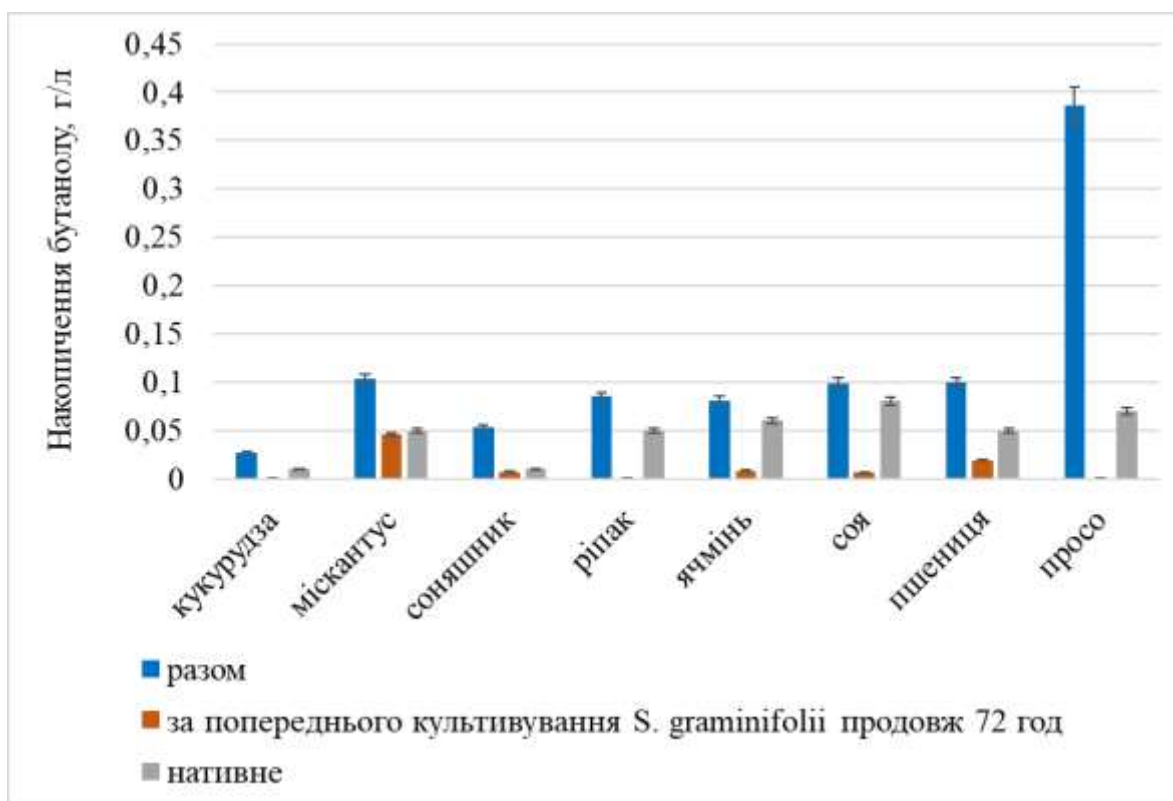


Рис. 15. Накопичення бутанолу за спільного культивування *S. graminifolii* та *Clostridium* sp. UCM B-7570

За спільного інокулювання процес культивування економізується за рахунок споживання кисню *S. graminifolii* у середовищі і відсутності потреби у створенні анаеробних умов за рахунок інертних газів. Окрім цього, результати дослідження показали значне підвищення акумулювання бутанолу в культуральній рідині порівняно з середовищем з нативною незерною біомасою рослин. Відмічено, що найбільше зростання накопичення цільового продукту у 5,5 разів було за використання проса як субстрату. Проведено спільне культивування *Clostridium* sp. UCM B-7570 та *A. awamori* UCM F-100017, *A. niger* IFBG 4, *A. oryzae* IFBG 49-B у порівнянні з нативною сировиною та з додаванням 5 г/л масляної кислоти на початку ферментації. Результати дослідження показали значне підвищення акумулювання бутанолу в культуральній рідині порівняно з середовищем з нативною незерною біомасою рослин. Показано, що за використання *A. awamori* UCM F-100017 та біомаси пшениці накопичення бутанолу було 3,9 г/л. Отже, стратегія спільного культивування дозволяє використовувати дешевший субстрат, підтримує ріст *Clostridium* без будь-якої анаеробної обробки та покращує кінцевий вихід бутанолу.

Вплив стресових факторів на функціонування клітин *Clostridium* sp. та АВЕ-ферментацію. Дія стресових факторів може приводити до збільшення концентрації бутанолу, зміни метаболічного шляху цільового продукту та підвищення стійкості до сполук-інгібіторів, що пригнічують ріст клітин і утворення продуктів АВЕ ферментації. Фурфурол є однією з таких речовин, яка має інгібуючий вплив на процес АВЕ ферментації. Було вивчено вплив

фурфуролу на накопичення бутанолу продуцентом *Clostridium* sp. UCM B-7570 за використання біомаси ріпаку як субстрату (рис. 16.1). Показано, що низькі концентрації (0,1-0,3 г/л) фурфуролу не впливали на накопичення бутанолу в порівнянні з контролем (0,6 г/л). Концентрація фурфуролу у середовищі від 0,4 до 0,8 г/л підвищувала накопичення бутанолу. Найбільше накопичення бутанолу (1,3 г/л) отримано за концентрації фурфуролу 0,5 г/л. Підвищення концентрації фурфуролу до 1 г/л інгібувало ріст та розвиток культури та, як наслідок, спричиняло зменшення накопичення бутанолу до 0,1 г/л.

Цинк є іншим стресовим фактором, що приводить до затримки росту мікроорганізмів, особливо у формі солей – сульфатів та хлоридів. Досліджено вплив різної концентрації $ZnSO_4$ на накопичення бутанолу (рис. 16.2). Виявлено, що $ZnSO_4$ в низькій концентрації (0,0001 г/л) не впливав на накопичення бутанолу, а зі збільшенням концентрації до 0,001 г/л накопичення бутанолу зростало. Найбільше накопичення бутанолу (1,1 г/л) було за концентрації 0,001 г/л $ZnSO_4$. Збільшення концентрації $ZnSO_4$ до 0,005 г/л призводило до зменшення накопичення бутанолу.

Гліцерол як стресовий фактор і нетрадиційний субстрат опосередковано впливає на спиртову та альдегіддегідрогеназну активності *Clostridium* sp. Вплив гліцеролу на швидкість росту клітин і АБЕ процес можна простежити, в основному, у біохімії катаболізму гліцеролу. Було досліджено вплив різного співвідношення гліцеролу та глюкози у інокуляційному середовищі на накопичення бутанолу в ензиматичному середовищі. Накопичення бутанолу змінювалось в залежності від складу інокуляційного середовища, а саме від співвідношення джерел вуглецю (глюкози та гліцеролу). Найбільшого накопичення бутанолу (1,4 г/л) в ензиматичному середовищі досягнуто при оптимальному співвідношенні глюкози до гліцеролу як 1:2 (загальна концентрація цукрів 20 г/л). Інші співвідношення в інокуляційному середовищі приводили до меншого накопичення бутанолу в ензиматичному середовищі. Алопуринол (4-гідроксипіразоло-(3,4-D)-піримідин), аналог гіпоксантину та інгібітор НАДФН-генеруючої ксантиндегідрогенази, використовували як стресовий фактор. Досліджено вплив різної концентрації алопуринолу на накопичення бутанолу (рис. 16.3). Низькі концентрації алопуринолу не впливали на накопичення бутанолу штамом *Clostridium* sp. UCM B-7570. При підвищенні концентрації алопуринолу накопичення бутанолу зростало. Найбільше накопичення бутанолу (0,8 г/л) було за концентрації 0,025 г/л алопуринолу у середовищі.

Клострідії – анаеробні бактерії, які не можуть використовувати кисень та гинуть у середовищі, насиченому киснем. Концентрацію кисню у культуральному середовищі можна змінювати за рахунок зміни швидкості перемішування. Концентрація кисню в середовищі може виступати стресовим фактором, який або викликає підвищення метаболічної активності клітин, або призводить до зниження метаболізму і до загибелі клітин. Досліджено вплив швидкості перемішування культуральної рідини на накопичення бутанолу (рис. 16.4). Накопичення бутанолу зростало пропорційно підвищенню

швидкості перемішування з 50 до 100 об/хв. Найбільше накопичення (1,5 г/л) бутанолу отримано за швидкості перемішування 100 об/хв. Збільшення швидкості перемішування до 110-130 об/хв призводило до зниження рівню накопичення бутанолу. З отриманих даних можна зробити висновок, що при збільшенні швидкості перемішування підвищується надходження кисню в середовище, що спричиняє інгібування росту та розвитку культури, і як результат, накопичення бутанолу падає.

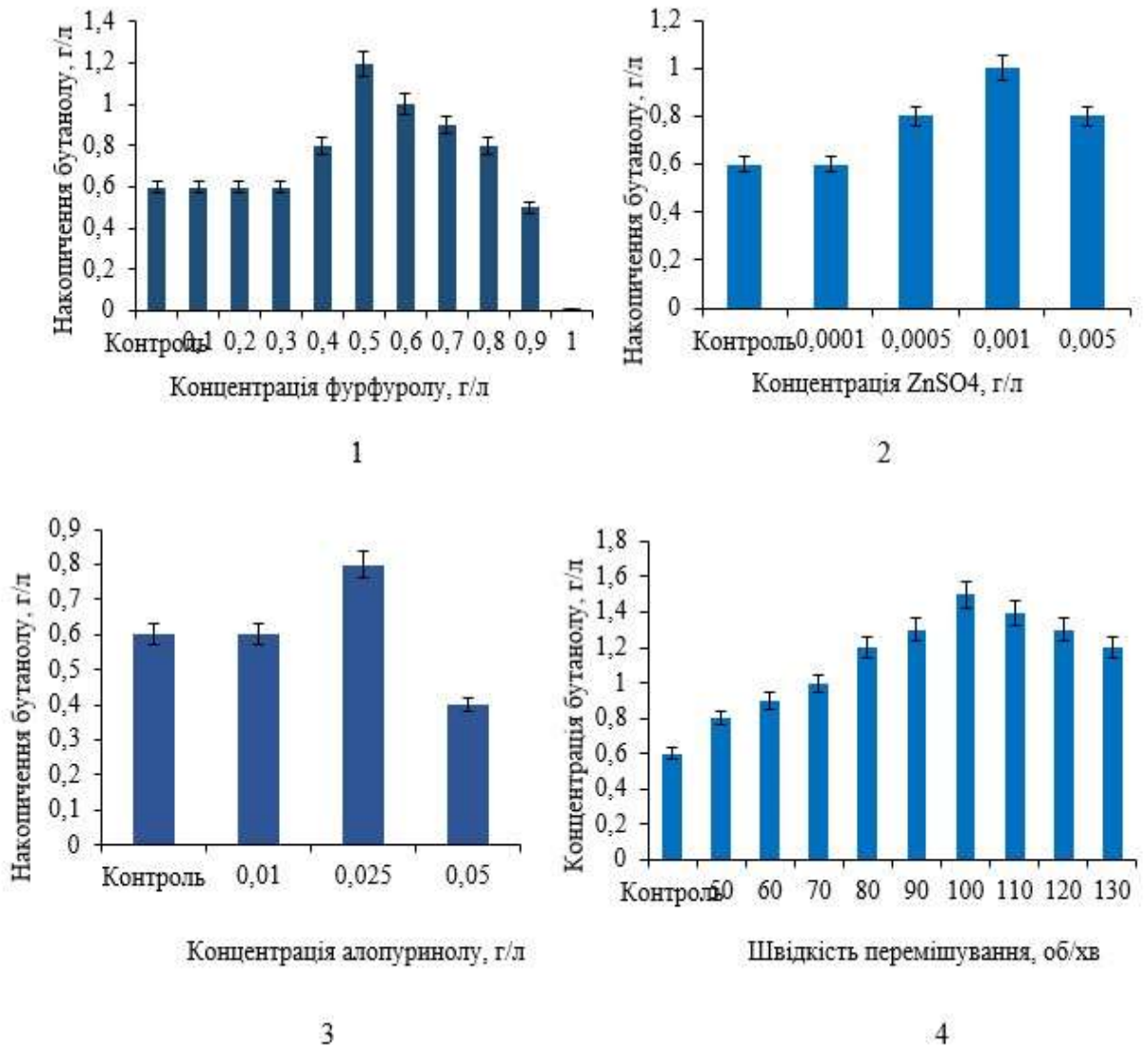


Рис. 16. Вплив стресових факторів (1 – фурфуролу, 2 – ZnSO₄, 3 – алопуринолу, 4 – кисню) на накопичення бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 за використання біомаси ріпаку як субстрату

Було проведено цитологічні дослідження порівняння вихідної культури *Clostridium* sp. UCM B-7570 і після впливу стресових факторів. Відмічено морфологічні зміни за впливу стресу, а саме: вкорочення довжини клітин, збільшення накопичення гранульози всередині та зниження кількості паличок у полі зору. Отримані результати можна пояснити цитоекологічними змінами, що

опосередковано підтверджуються зміною концентрації бутанолу (як механізм відповіді) в культуральному середовищі.

Ліофілізація біомаси штамів-продуцентів. Для зберігання культур *C. acetobutylicum* UCM В-7407 та *Clostridium* sp. UCM В-7570 було використано метод ліофілізації. Для підготовки культур до ліофілізації було досліджено вплив захисного середовища на гідрофільність бактеріальних суспензій після ліофілізації в залежності від концентрації в них глюкози і сахарози. Залишкова вологість кінцевого матеріалу в залежності від вуглеводів і їх концентрації за одних і тих же умов ліофілізації. При використанні глюкози та сахарози в кількості 10 %, одержали найнижчі показники залишкової вологості 2,0. Для подальшої роботи з підбору захисного середовища для ліофілізації штамів-продуцентів бутанолу було обрано сахарозу як гідрофільний компонент у концентрації 10 %. За результатами досліджень оптимізовано склад захисного середовища, яке містило наступні компоненти (%): глюкоза – 10,0; желатоза – 10,0; агар – 0,02. Особливе значення за зберігання ліофілізованих мікроорганізмів мали температурні умови. Чим вище температура зберігання культур, тим швидше знижувалась кількість життєздатних клітин мікроорганізмів, а отже і їх продуктивність. Для визначення продуктивності штаму його культивували на заторі з сорго цукрового сорту Енергодар. За зберігання зразків ліофілізованих бактерій протягом одного місяця за температури 4 °С біологічна активність клітин не зменшувалась, а з підвищенням температури зберігання поступово знижувалась і за температури 30 °С втрачалось приблизно 40 % біологічної активності клітин, що свідчить про відмирання бактерій. Спостереження за сухим матеріалом бактерій, одержаним з врахуванням всіх факторів, які позитивно впливали на процес ліофілізації культури показали, що зберігання за температури 4 °С протягом півроку не впливало на активність культури (табл. 3).

Таблиця 3

Стабільність накопичення бутанолу штамом *Clostridium* sp. UCM В-7570 за зберігання у ліофільному вигляді

Пересіви	Технологічні показники		
	рН, од	Сухі речовини, %	Бутанол, г/л
1	6,68 ± 0,5	11,1 ± 0,5	2,40 ± 0,1
2	6,63 ± 0,3	11,2 ± 0,4	2,50 ± 0,1
3	6,65 ± 0,2	11,3 ± 0,3	2,54 ± 0,1
4	6,68 ± 0,5	11,4 ± 0,5	2,49 ± 0,2
5	6,64 ± 0,4	11,3 ± 0,5	2,33 ± 0,1
6	6,63 ± 0,3	11,5 ± 0,1	2,49 ± 0,2

Зберігання на штучних поживних середовищах може призводити до швидкого висихання, відмирання мікроорганізмів та зниження або втрати фізіологічних та ферментативних властивостей. Досліджено вплив захисного середовища (глюкози і сахарози) на гідрофільність бактеріальних суспензій

після ліофілізації в залежності від їх концентрації. Отримані результати свідчать про те, що після зберігання за температури 4 °С протягом шести місяців відновлена ліофілізована культура була життєздатна і накопичення бутанолу у культуральній рідині після культивування практично не змінилось порівняно з накопиченням до ліофілізації (2,7 г/л).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі визначено та охарактеризовано повний геном *Clostridium* sp. UCM B-7570, на основі якого розроблено конструкцію нового рекомбінантного штаму-продуценту та досліджено процес АБЕ ферментації, і показано ефективність *Clostridium* sp. UCM B-7570 у накопиченні бутанолу як альтернативного палива за використання різних видів попередньої підготовки (гідролізу) незернової лігноцелюлозної біомаси.

1. Визначено (секвеновано) повний геном вітчизняного штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570, проведено його мапування та створено повну мапу геному. Показано, що в геномі містяться всі кластери генів, які відповідають за накопичення бутанолу, ацетону, етанолу і пропандіолу-1,3. Встановлено, що геном містить 4262 гени, 4057 з яких кодуєть протеїни, містить 30 оперонів рРНК, 80 оперонів тРНК, 6 нкРНК та 89 псевдогенів.

2. Виділено та ідентифіковано новий штам лігнолітичних бактерій *S. graminifolii* IFBG Ave1 придатний для інтенсифікації накопичення бутанолу методом спільного культивування. Показано можливість створення і використання штучних мікробних консорціумів для спільного культивування, що дало змогу підвищити накопичення бутанолу у 5,5 разів за використання незернової біомаси проса.

3. Розроблено дизайн конструкції нового рекомбінантного штаму-продуценту на основі штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 для підвищення накопичення бутанолу. Показано, що отриманий *in silico* штам з видаленою великою субодиницею гліцеролдегідратази (*dhaB*) за допомогою адаптованої ніказної системи *S. pyogenes* типу II CRISPR/Cas9, має змінений метаболічний шлях пропандіолу в порівнянні з вихідним штамом, та проявляв себе як 1,3-пропандіол-дефіцитний мутант, що продукував як основний продукт бутанол.

4. Показано, що незернова рослинна біомаса містить в залежності від її виду ферментовані макрокомпоненти: целюлозу (30-50 %), геміцелюлозу (9-40 %), водорозчинні речовини (3-15 %), які можна використовувати як субстрат для культивування, та неферментовані компоненти: лігнін (10-30 %) і воски (до 3 %), які впливають на механічну міцність лігноцелюлози і перешкоджають її біорозкладанню мікроорганізмами.

5. Показано можливість використання як альтернативних субстратів для отримання бутанолу незернової частини різноманітної рослинної сировини (*Sorghum saccharatum* (L.) Moench сорту Energodar, *Sorghum saccharatum* (L.) Moench сорту Energodar hybrid AMBR-1, *Sorghum saccharatum* (L.) Moench сорту Energodar hybrid-720, *Sorghum saccharatum* (L.) Moench сорту Energodar

hybrid ST-207, *Helianthus tuberosus*, *Miscanthus giganteus*, *Zea mays*, *Triticum* sp., *Glycine max*, *Hordeum* sp., *Helianthu* L., *Miscanthus sacchariflorus*, *Brassica napus*, *Panicum virgatum*), лігноцелюлозної біомаси комунального походження та відходів промисловості – технічного гліцерину, гліцерину-сирцю та скопу.

6. Досліджено різні види попередньої підготовки лігноцелюлозного субстрату (кислотний, лужний, ензиматичний та комбінований гідроліз; ультразвукова дезінтеграція; кавітація; вибуховий автогідроліз) та визначено, що оптимальний спосіб оброблення незернової біомаси залежить безпосередньо від її компонентного складу. У залежності від сорту біомаси і виду гідролізу було отримано накопичення бутанолу 8 г/л для *Sorghum saccharatum* (L.) Moench Energodar за органозольного гідролізу протягом 90 хв; для *Sorghum saccharatum* (L.) Moench сорту Energodar hybrid AMBR-1 за кислотно-ензиматичного гідролізу – 6,2 г/л; для *Miscanthus sacchariflorus* за кислотно-ензиматичного гідролізу – 2,8 г/л, для *Glycine max* за лужного гідролізу – 2,8 г/л; для *Brassica napus* за УЗД – 2,5 г/л; для *Panicum virgatum* за вибухового автогідролізу – 3,0 г/л.

7. Показано підвищення накопичення бутанолу за використання іммобілізації клітин-продуцентів на спеціальних носіях (бельтінгу, феритових кільцях та кільцях Рашига). Іммобілізація штаму *Clostridium* на кільцях Рашига за використання технічного гліцерину підвищила накопичення бутанолу в 2 рази у порівнянні з вихідним штамом з 5,8 до 11 г/л, відповідно.

8. Показано можливість використання адаптивного стресу для підвищення накопичення біобутанолу за рахунок зміни метаболічних шляхів, опосередковано через дію лімітованого внесення інгібіторів росту та розвитку (фурфуролу, алопурінолу, цинку, гліцеролу, кисню) та підвищення рівня накопичення цільового продукту за рахунок змін умов культивування під впливом стресових факторів. Визначено, що підвищення накопичення продуктів АБЕ ферментації в 3 рази можливе за стресових умов.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у виданнях, включених до наукометричних баз:

1. **Tigunova, O.O., Rakhmetov, D.B., Blume, Ya.B., & Shulga, S.M.** (2024). Biobutanol production using non-grain biomass *Sorghum saccharatum* as substrate. *Open Agriculture Journal*, 18, e18743315284161. doi: [10.2174/0118743315284161231228065512](https://doi.org/10.2174/0118743315284161231228065512) Q3 (55 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті)
2. **Tigunova, O.O., Samborsky, M., Bratishko, V.V., Balabak, O.A., Zelena, L.B., & Shulga, S.M.** (2023). Main genome characteristics of butanol-producing *Clostridium* sp. UCM B-7570 strain. *Journal of Applied Genetics*, 64 (3), 559-567. doi: [10.1007/s13353-023-00766-8](https://doi.org/10.1007/s13353-023-00766-8) Q3 (45 % авторства: ідея статті, узагальнення отриманих даних, участь у формулюванні висновків, написання статті)

3. **Tigunova, O.O.,** Bratishko, V.V., & Shulga, S.M. (2023). An increase in the production of butanol by *Clostridium* sp. cells under the influence of stress factors. *Cytology and Genetics*, 57 (3), 239-245. doi: [10.3103/S009545272303009X](https://doi.org/10.3103/S009545272303009X) **Q4** (60 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті)
4. **Tigunova, O.O.,** Bratishko, V.V., & Shulga, S.M. (2023). Apple pomace as an alternative substrate for butanol production. *AMB Express*, 13, 138. doi: [10.1186/s13568-023-01649-1](https://doi.org/10.1186/s13568-023-01649-1) **Q2** (55 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті)
5. **Tigunova, O.O.,** Kamenskyh, D.S., Tkachenko, T.V., Yevdokymenko, V.A., Kashkovskiy, V.I., Rakhmetov, D.B., Blume, Ya.B., & Shulga, S.M. (2020). Biobutanol production from plant biomass. *Open Agriculture Journal*, 14, 187-197. doi: [10.2174/1874331502014010187](https://doi.org/10.2174/1874331502014010187) **Q4** (45 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті)

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Tigunova, O.** (2024). Suitability of crude glycerol as a substrate for biobutanol production. *Scientific Reports of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine*, 20(6), 91-104. doi: [10.31548/dopovidi/6.2024.91](https://doi.org/10.31548/dopovidi/6.2024.91).
2. **Tigunova, O.O.,** Bratishko, V.V., Balabak, A.V., Pryomov, S.G., & Shulga, S.M. (2022). Acetone-butyl fermentation peculiarities of the butanol strain-producer. *Biotechnology Acta*, 15(1), 5-22. doi: [10.15407/biotech15.01.005](https://doi.org/10.15407/biotech15.01.005) (45 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті).
3. **Tigunova, O.O.,** Umanskiy, M.O., Bratishko, V.V., Balabak, A.V., & Shulga, S.M. (2021). Ultrasonic disintegration of lignocellulose raw materials as a pre-treatment of a substrate for cultivation. *Biotechnology Acta*, 24(5), 49-56. doi: [10.15407/biotech14.05.049](https://doi.org/10.15407/biotech14.05.049) (45 % авторства: ідея статті, узагальнення отриманих даних, участь у формулюванні висновків, написання статті).
4. **Tigunova, O.O.,** Andriash, H.S., Beiko, N. E., Zaharova, O.G., Pryomov, S.H., & Shulga, S.M. (2019). Rape biomass (*Brassica napus*) as raw materials for biobutanol production. *Biotechnology Acta*, 12(1), 75-80. doi: [10.15407/biotech12.01.075](https://doi.org/10.15407/biotech12.01.075) (55 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті).
5. **Tigunova, O.O.,** Andriash, H.S., Beiko, N. E., Melnik, I. V., & Shulga, S.M. (2017). Biobutanol accumulation using alternative substrates by cultivation of *Clostridium acetobutylicum* strains. *Biotechnology Acta*, 10(5), 48-56. doi: [10.15407/biotech10.05.036](https://doi.org/10.15407/biotech10.05.036) (60 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті).
6. **Tigunova, O.O.,** Beiko, N. E., Andriash, H.S., Pryomov, S.H., & Shulga S.M. (2017). Domestic butanol-producing strains of the *Clostridium* genus.

Biotechnology Acta. 10(1), 34-42. doi: 10.15407/biotech10.01.034 (50 % авторства: ідея статті, узагальнення отриманих даних, участь у формулюванні висновків, написання статті).

7. **Тігунова, О.О.**, Андріяш, Г.С., Бейко, Н. Є., та Шульга, С.М. (2017). Філогенетичний аналіз штамів-продуцентів лізину, треоніну та бутанолу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 21, 288-292. (30 % авторства: ідея статті, узагальнення отриманих даних, участь у формулюванні висновків, написання статті).
8. **Tigunova, O.O.**, Beiko, N.E., Kamenskyh, D.S., Tkachenko, T.V., Yevdokymenko, V.A., Kashkovskiy, V.I., & Shulga S.M. (2016). Lignocellulosic biomass after explosive autohydrolysis as substrate to butanol obtaining. *Biotechnology Acta*, 9(4), 28-34. doi: 10.15407/biotech9.04.028 (60 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті).
9. **Tigunova, O.O.**, Beiko, N.E., Andriiash, A.S., Priyomov, S.G., & Shulga, S.M. (2016). Lyophilization effect on productivity of butanol-producing strain. *Biotechnology Acta*, 9(5), 24-29. doi: [10.15407/biotech9.05.024](https://doi.org/10.15407/biotech9.05.024) (45 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті).

Патенти

1. Братішко, В.В., Шульга, С.М., **Тігунова, О.О.**, Уманський, М.О., Хмельовський, В.С., Михайлович, Я. М., Сівак, І.М. , та Потапова, С. Є. (2023). Патент України 127729. Київ: Державне патентне відомство України. (10 % авторства: аналіз результатів, узагальнення матеріалів, участь у розробці винаходу)
2. Братішко, В.В., Шульга, С.М., Михайлович, Я. М., **Тігунова, О.О.**, Ребенко, В.І., Хмельовський, В.С., Потапова, С. Є., та Сівак, І.М. (2022). Патент України 125779. Київ: Державне патентне відомство України. (10 % авторства: аналіз результатів, узагальнення матеріалів, участь у розробці винаходу)

Розділи монографій

1. **Тігунова, О.О.**, та Шульга, С.М. (2024). Розділ 4. Удосконалення технології отримання біобутанолу на основі дослідження фізіологічних та біохімічних властивостей вітчизняних штамів-продуцентів. Розділ 5. Дослідження продуктивності штамів-продуцентів бутанолу у процесі зберігання. *Сорго цукрове (Sorghum saccharatum (L.) Moench) в Україні: біологія, продуктивність та використання на біопаливо* (59-71; 82-88). Ліра-К. (60 % авторства: ідея досліджень, проведення досліджень, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання розділів)
2. Шульга, С.М., **Тігунова, О.О.**, Братішко, В.В., та Блюм, Я.Б. (2024). Біобутанол. Продуценти, субстрати, культивування та відновлення (7-93; 127-222). Наукова думка. doi: [10.15407/978-966-00-1918-8](https://doi.org/10.15407/978-966-00-1918-8). (45 % авторства: ідея досліджень, проведення досліджень, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання розділів)

Доповіді на міжнародних/вітчизняних конференціях

1. **Tigunova, O.**, Bratishko, V., & Shulga, S.M. (2024). *Metabolomic analysis of the Clostridium sp. UCM B-7570 deletion mutant model*. Abstract of the 7th Congress of the all-Ukrainian public organization «Ukrainian society of cell biology» with international representation, Lviv 96 doi: [10.30970/uscb.2024](https://doi.org/10.30970/uscb.2024)
2. Bratishko, V., Tkachenko, T., Shulga, S., & **Tigunova, O.** (2024). *Chemical studies of parameters and composition of lignocellulose raw material samples of municipal origin*. Engineering for Rural Development, 23, 1008-1015. doi: [10.22616/ERDev.2024.23.TF205](https://doi.org/10.22616/ERDev.2024.23.TF205)
3. Bratishko, V. V., Shulga, S.M., & **Tigunova, O.O.** (2023). *Cavitation treatment of lignocellulosic biomass in the production of second generation biofuels*. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції A production of agriculture products based on smart technologies. Глеваха 2023. 162-165.
4. Bratishko, V., Shulga, S., **Tigunova, O.**, & Achkevych, O. (2023). *Ultrasonic cavitation of lignocellulosic raw materials as an effective method of preparation for butanol production*. Engineering for Rural Development, 23, 264-268. doi: [10.22616/ERDev.2023.22.TF053](https://doi.org/10.22616/ERDev.2023.22.TF053)
5. **Тігунова, О.О.**, Братішко, В.В., та Шульга, С.М. (2023). *Вплив попередньої підготовки незернової частини ріпаку на накопичення бутанолу штамом Clostridium sp.* Матеріали XXIV міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI столітті», Київ. 392-394.
6. **Тігунова, О.О.**, Братішко, В.В., та Шульга, С.М. (2023). *Біобутанол другого покоління – альтернативний вид біопалива*. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Продовольча та екологічна безпека в умовах війни та повоєнної відбудови: виклики для України та світу», присвячена 125 річчю НУБіП України, секція 5: інженерія, енергетика та інформаційні технології в умовах війни та післявоєнній відбудові країни, Київ. 259-261.
7. **Тігунова, О.О.**, Братішко, В.В., Прийомов, С.Г., та Шульга, С.М. (2022). *Ультразвукова дезінтеграція лігноцелюлозної сировини як попередня підготовка субстрату для культивування*. Матеріали XXIII міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI столітті», Київ. 268-269
8. **Тігунова, О.О.**, Братішко, В.В., Прийомов, С.Г., та Шульга, С.М. (2022). *Моделювання плазмід для штаму-продуценту Clostridium sp. IMB B-7570 з надекспресією гену bdhA*. Матеріали XVI Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття», Київ. 168-169.
9. Bratishko, V., Shulga, S., **Tigunova, O.**, & Khmelovskyi, V. (2022). *Effective suspension layer in ultrasonic treatment of plant bioresources*. Engineering for Rural Development, 20, 166-171. doi: [10.22616/ERDev.2022.21.TF050](https://doi.org/10.22616/ERDev.2022.21.TF050)
10. Bratishko, V.V., Tkachenko, T.V., Shulga, S.M., & **Tigunova, O.O.** (2021). *Results of composition analysis of non-grain part of major field crops in Ukraine*.

Engineering for Rural Development, 20, 584-588. doi:
[10.22616/ERDev.2021.20.TF125](https://doi.org/10.22616/ERDev.2021.20.TF125)

11. **Tigunova, O.O., & Shulga, S.M.** (2021). *Butanol accumulation by butanol strains producers using apple pomace*. Proceedings XVI International SummerSchool Conference Biology, Biotechnology, Biomedicine, Odessa, 63-67.
12. **Тігунова, О.О.,** Братішко, В.В., Андріяш, Г.С., та Шульга, С.М. (2021). *Накопичення бутанолу штамами-продуцентами на відходах лігноцелюлозної сировини*. Матеріали ХХІІ міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у ХХІ столітті», Київ. 910-912
13. **Тігунова, О.О.,** Андріяш, Г.С., та Шульга, С.М. (2021). *Накопичення бутанолу штамами-продуцентами при використанні яблучних вичавок*. Матеріали ХХІІ міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у ХХІ столітті», Київ. 916-918
14. **Тігунова, О.О.,** Братішко, В.В., Прийомов, С.Г., та Шульга, С.М. (2021). *Біобутанол – перспектива альтернативної енергетики*. Матеріали Всеукраїнської науково–практичної конференції пам’яті академіка Академії наук вищої освіти, професора Анатолія Володимировича Касперського «Актуальні проблеми та перспективи розвитку фундаментальних, прикладних, загальнотехнічних та безпекових наук», Київ. 97-99
15. **Тігунова, О.О.,** Рахметов, Д.Б., Андріяш, Г.С., та Шульга, С.М. (2021). *Вплив температури зберігання на накопичення бутанолу ліофілізованим штамом-продуцентом*. Матеріали ХХІІ міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у ХХІ столітті», Київ. 913-915
16. **Захарова, О.Г., Андріяш, Г.С., та Тігунова, О.О.** (2020). *Виділення стрептоміцетів з ґрунтів різних регіонів України*. Матеріали ХІV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття» присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна, Київ. 147.
17. **Тігунова, О.О.,** Андріяш, Г. С., та Рахметов, Д. Б. (2020). *Накопичення біобутанолу за використання сорго цукрового як субстрату*. Матеріали ХІV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття» присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна, Київ. 161.
18. **Братішко, В.В., Ребенко, В.И., Софіенко, В.С., Шульга, С.М., и Тігунова, Е.А.** (2020). *Пути повышения кормовой и энергетической ценности незерновой части урожая сельскохозяйственных культур*. Сборник научных статей по материалам ххiii международной научно-практической конференции «Современные технологии сельскохозяйственного производства», Гродно, Беларусь. 223-225.
19. **Bratishko, V.V., Rebenko, V.I., Tigunova, O.O., & Shulga, S.M.** (2020). *Perspective ways to increase the feed and energy value of plant raw materials*. IV

International Scientific and Practical Conference, Zhytomyr, Ukraine 33-36.

20. Захарова, О. Г., **Тігунова, О.О.**, Рахметов, Д. Б., та Рахметова, С. О. (2019). *Визначення складу сорго цукрового та його використання як сировини для культивування бутанолу*. XIII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» присвячена 185-річчю від дня народження Дмитра Івановича Менделєєва, Київ. 34.
21. Ядрихінський, В.С., **Тігунова, О.О.**, та Литвинов, Г.С. (2018). *Оптимізація середовища для накопичення біомаси Clostridium acetobutylicum IMB B-7407*. Актуальні питання сучасної науки (частина III): матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції, Київ. 5.
22. Zaharova, O. G., **Tigunova, O.O.**, Rahmetov, J., & Shulga, S. M. (2018). *Butanol accumulation by Clostridium sp. using lignocellulose substrates*. III International scientific conference Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century, Kyiv. 112-113.
23. Захарова, О., **Тігунова, О.**, Андріяш, Г., Рахметов, Д., та Рахметова, С. (2018). *Скринінг штамів-продуцентів бутанолу за використання сорго цукрового як субстрату*. II Міжнародна науково-практична інтернет-конференція. «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації», Київ. 78.
24. Захарова, О.Г., **Тігунова, О.О.**, Андріяш, Г.С., Рахметов, Д.Б., та Рахметова, С.О. (2018). *Використання сорго цукрового як субстрату для біобутанолу*. VII Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії», Київ. 42-43.
25. Захарова, О., **Тігунова, О.**, Андріяш, Г., та Бейко, Н. (2018). *Накопичення бутанолу штамом Clostridium sp. за використання біомаси ріпаку як субстрату*. II Міжнародна науково-практична інтернет-конференція. «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації», Київ. 77.
26. Ядрихінський, В.С., **Тігунова, О.О.**, та Литвинов, Г.С. (2018). *Виділення гену бутанол-дегідрогенази Clostridium acetobutylicum IMB B-7407*. Матеріали XII Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття». Київ, 103.
27. **Тігунова, О.О.**, Андріяш, Г. С., Бейко, Н.Є., та Шульга, С.М. (2017). *Пошук нетрадиційних субстратів для отримання біопалива*. Тези доповідей XV з'їзду товариства мікробіологів України ім С. М. Виноградського. Одеса, 288.
28. **Тігунова, О.О.**, Андріяш, Г. С., Бейко, Н.Є., та Шульга, С.М. (2017). *Відходи виробництва біодизелю як сировина для біобутанолу*. Збірка тез третьої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». Київ, 58.
29. Мельник, І.В., **Тігунова, О.О.**, та Красінько, В.О. (2017). *Отримання біобутанолу на альтернативних субстратах*. Тези VI Міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнологія: звершення та надії», Київ. 220.
30. **Тігунова, О.О.**, Андріяш, Г. С., Забейда, О. Ф., та Круподьорова, Т. А. (2017). *Біоконверсія вищими грибами лігноцелюлозної сировини для*

отримання біобутанолу. Матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття». Київ, 133.

31. **Тігунова, О.О.**, Андріяш, Г. С., Круподьорова, Т. А., Забейда, О. Ф., та Рахметов, Д.Б. (2016). *Біоконверсія дроговидного проса вищими грибами*. Матеріали XIII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів». Київ, 108-110.
32. **Тігунова, О.О.**, Андріяш, Г. С., та Прийомов, С. І. (2016). *Гліцерин як сировина для отримання біобутанолу*. Матеріали XIII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів». Київ, 110-112.

АНОТАЦІЯ

Тігунова О.О. Характеристика нових штамів *Clostridium* sp. – продуцентів біобутанолу та їх використання для АБЕ ферментації лігноцелюлозних субстратів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2025.

Робота присвячена характеристиці геному *Clostridium* sp. UCM В-7570, розробці нового рекомбінантного штаму-продуценту на його основі та ефективності *Clostridium* sp. UCM В-7570 у накопиченні бутанолу, як альтернативного палива, за використання різних видів попередньої підготовки (гідролізу) незернової лігноцелюлозної біомаси. Визначено (секвеновано) повний геном вітчизняного штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM В-7570, проведено його мапування та створено повну мапу геному. Виділено та ідентифіковано новий штам лігнолітичних бактерій *S. graminifolii* для інтенсифікації накопичення бутанолу методом спільного культивування. Показано можливість створення і використання штучних мікробних консорціумів для спільного культивування. Розроблено дизайн конструкції нового рекомбінантного штаму-продуценту на основі штаму *Clostridium* sp. UCM В-7570 для підвищення накопичення бутанолу. Показано, що отриманий *in silico* штам, з видаленою великою субодиноцею гліцеролдегідратази (*dhaB*), за допомогою адаптованої ніказної системи *S. pyogenes* типу II CRISPR/Cas9 проявляв себе як 1,3-пропандіол-дефіцитний мутант, що продукував як основний продукт бутанол. Показано, що незернова рослинна біомаса містить в залежності від її виду ферментовані макрокомпоненти та неферментовані компоненти, які перешкоджають біорозкладанню мікроорганізмами. Показано можливість використання незернової частини різноманітної рослинної, лігноцелюлозної біомаси комунального походження та відходів промисловості

– технічного гліцерину, гліцерину-сирцю та скопу як альтернативних субстратів для отримання бутанолу. Досліджено різні види попередньої підготовки лігноцелюлозного субстрату (кислотний, лужний, ензиматичний та комбінований гідроліз; ультразвукова дезінтеграція; кавітація; вибуховий автогідроліз) та визначено, що оптимальний спосіб оброблення незернової біомаси залежить безпосередньо від її компонентного складу. Показано підвищення накопичення бутанолу за використання іммобілізації клітин-продуцентів на спеціальних носіях (бельгінгу, феритових кільцях та кільцях Рашига). Показано можливість використання адаптивного стресу для підвищення накопичення біобутанолу за рахунок зміни метаболічних шляхів, опосередковано через дію лімітованого внесення інгібіторів росту та розвитку (фурфуролу, алопуринолу, цинку, гліцеролу, кисню) та підвищення рівня накопичення цільового продукту за рахунок змін умов культивування під впливом стресових факторів.

Ключові слова: бутанол, штами-продуценти, секвенування, лігноцелюлоза, незернова рослинна біомаса, бродіння, АБЕ ферментація, *Clostridium*

ABSTRACT

Tigunova O.O. Characterization of new strains of *Clostridium* sp. – producers of biobutanol and their use for ABE fermentation of lignocellulosic substrates – Manuscript.

Thesis for the scientific degree of Doctor of Science in Biology, the specialty 03.00.20 – Biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

The thesis is devoted to the characterization of the genome of *Clostridium* sp. UCM B-7570, the development of a new recombinant producer strain based on it, and the efficiency of *Clostridium* sp. UCM B-7570 in the accumulation of butanol as an alternative fuel using various types of pre-treatment (hydrolysis) of non-grain lignocellulosic biomass. The complete genome of the domestic butanol-producing strain *Clostridium* sp. UCM B-7570 was determined (sequenced), mapped, and a complete genome map was created. A new strain of lignolytic bacteria *S. graminifolii* was isolated and identified for intensification of butanol accumulation by co-cultivation. The possibility of creating and using artificial microbial consortia for co-cultivation has been demonstrated. A new recombinant producer strain based on the *Clostridium* sp. UCM B-7570 strain was designed to increase butanol accumulation. It was shown that the *in silico* strain obtained with the large subunit of glycerol dehydratase (*dhaB*) deleted using the adapted *S. pyogenes* type II nickase system CRISPR/Cas9 manifested itself as a 1,3-propanediol-deficient mutant, producing butanol as the main product. It has been shown that non-grain plant biomass contains, depending on its type, fermented macrocomponents and unfermented components that prevent biodegradation by microorganisms. The possibility of using the non-

grain part of various plant, lignocellulosic biomass of municipal origin and industrial waste - technical glycerin, raw glycerin and osprey as alternative substrates for butanol production is shown. Various types of pre-treatment of lignocellulosic substrate (acidic, alkaline, enzymatic and combined hydrolysis; ultrasonic disintegration; cavitation; explosive autohydrolysis) were investigated and it was determined that the optimal method of processing non-grain biomass depends directly on its component composition. An increase in butanol accumulation was shown using immobilization of producer cells on special carriers (belting, ferrite rings, and Raschig rings). The possibility of using adaptive stress to increase biobutanol accumulation by changing metabolic pathways, indirectly through the action of limited application of growth and development inhibitors (furfural, allopurinol, zinc, glycerol, oxygen) and increasing the level of accumulation of the target product by changing cultivation conditions under the influence of stress factors, has been shown.

Key words: butanol, producer strains, sequencing, lignocellulose, non-cereal plant biomass, fermentation, ABE fermentation, *Clostridium*