

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **ТІГУНОВОЇ ОЛЕНИ ОЛЕКСАНДРІВНИ** “Характеристика нових штамів *Clostridium* sp. – продуцентів біобутанолу та їх використання для АБЕ ферментації лігноцелюлозних субстратів”, подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - Біотехнологія (091 – біологія

Актуальність роботи.

Зростаючий попит на енергію та виснаження джерел нафти підвищили потребу в альтернативних відновлюваних ресурсах. Найпоширенішим біовідновлюваним ресурсом на Землі є лігноцелюлоза. Лігноцелюлозна біомаса має потенціал як відновлюване та альтернативне джерело енергії для пом'якшення глобальних змін клімату. Утилізація залишків біомаси для виробництва високовартісних сполук може запобігти забрудненню оточуючого середовища. З іншого боку, це може принести користь економіці та сприяти енергетичній безпеці. Однак економічно вигідне перетворення лігноцелюлозної біомаси у біопаливо та продукти з доданою вартістю є дуже складним через структуру і стійкість лігноцелюлози.

Широкомасштабне промислове виробництво рідкого біопалива, біоетанолу та біодизелю з відновлюваної сировини в усьому світі привело до значного зменшення викидів парникових газів. Вищі спирти, такі як бутанол, мають низку переваг як біопалива порівняно з етанолом. Вони не гігроскопічні, мають значно вищу енергоємність, можуть бути змішані з бензином і дизельним паливом у будь-якому співвідношенні, а також використовуються як реактивне паливо. Вищі спирти також мають інші застосування: в хімічному синтезі, як розчинники, а також добавки до парфумів. Бутанол (н-бутанол) продукують багато видів роду *Clostridium*, зокрема, *C. acetobutylicum* і деякі сконструйовані бактерії та дріжджі. Декілька штамів клостридій здатні використовувати дешеву сировину, таку як лігноцелюлозна біомаса, харчові відходи, гліцерин або C1-гази (CO₂, CO), що надає їм додатковий потенціал як ключових гравців для розвитку процесів, менш залежних від викопного палива та зі зниженими викидами парникових газів. Сучасні дослідження, спрямовані на покращення продукції бутанолу штамми *Clostridium* включають: 1) підвищення виходу бутанолу, титру і толерантності до інгібіторів; 2) розширення субстратів для ферментації; 3) пошук дешевої вихідної сировини (наприклад, харчові відходи, лігноцелюлозна біомаса та C1-гази). Значне збільшення продукції бутанолу у *Clostridium* було отримано при застосуванні мутагенезу, метаболічної інженерії, адаптивної лабораторної еволюції, оптимізації середовища росту, оптимізації процесу ферментації (наприклад, high density cultivation). Сучасна метаболічна інженерія *Clostridium* спрямована на гени, залучені до біосинтезу бутанолу, шляхи, які конкурують за вуглець і електрони, толерантність до бутанолу та окисно-відновний гомеостаз.

Саме тому дисертаційна робота Тігунової О. О., присвячена дослідженню нових штамів-продуцентів біобутанолу, здатних до використання лігноцелюлозних субстратів, є актуальною.

Наукова новизна роботи.

Проведені дисертанткою дослідження розширюють та поглиблюють уявлення про здатність представників роду *Clostridium* утворювати бутанол за використання різних лігноцелюлозних субстратів. У результаті роботи :

- Здійснено секвенування геному штаму-продуцента бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 і проведено його картування. Встановлено, що в геномі містяться всі кластери генів, які відповідають за накопичення бутанолу, ацетону, етанолу і пропандіолу-1,3.
- Опрацьовано підходи до конструювання та отримано рекомбінантний штам-продуцент бутанолу;
- Доведено, що вихід бутанолу можна підвищити за рахунок спільного культивування штаму-продуцента *Clostridium* sp. UCM B-7570 та виділеного лігнолітичного штаму *S. graminifolii*, здатного до оцукрювання лігноцелюлозних субстратів;
- Встановлено, що іммобілізація штаму-продуцента на різних носіях приводить до зростання продукції бутанолу;
- Показана можливість використання як альтернативних субстратів різної рослинної сировини (біомаси ячменю, ріпаку, сої, пшениці, сорго цукрового, міскантусу, дрововидного проса).
- Оптимізовано параметри гідролізу різних лігноцелюлозних субстратів та умови ферментації, що становить основу для великомасштабного виробництва біопалива для всіх основних біоенергетичних культур.
- Проаналізовано дані комунальних підприємств міста Києва, визначено основні групи та види рослин, що утворюють лігноцелюлозну сировину комунального походження та визначено її хімічний склад, що дає можливість стверджувати про високий потенціал лігноцелюлозної біомаси як сировини для отримання бутанолу.
- Обґрунтовано можливість використання адаптивного стресу для підвищення накопичення цільового продукту – бутанолу..

Практичне значення одержаних результатів.

Створено карту секвенованого геному нового штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 та ідентифіковано кластери генів, залучених до АБЕ-ферментації. Штам *Clostridium* sp. UCM B-7570 депоновано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (Ukrainian Collection of Microorganisms).

У результаті видалення великої субодиночці гліцеролдегідратази за допомогою адаптованої ніказної системи *Streptococcus pyogenes* отримано мутант, який продукує бутанол як основний продукт.

Розроблено та протестовано різні способи попередньої підготовки лігноцелюлозної біомаси та визначено оптимальний спосіб для кожного виду біомаси. Отримано два патенти України на винахід: на пристрій для ультразвукового обробляння та на спосіб ультразвукової дезінтеграції незернової біомаси сільськогосподарських культур. Результати дослідження макрокомпонентного складу сировини можуть становити інтерес для установ, діяльність яких пов'язана зі створенням інноваційних джерел енергії.

Особистий внесок здобувача. Автором обґрунтовано мету та задачі роботи, проведено аналіз джерел літератури, сформульовано основні положення та висновки. Висвітлені в роботі результати отримані особисто або за безпосередньої участі здобувача. Співучасть інших науковців відображена у спільних публікаціях.

Публікації та апробація результатів досліджень. Результати досліджень достатньо повно висвітлені в публікаціях. За темою дисертаційної роботи опубліковано 19 наукових праць, у тому числі 5 статей у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus (три Q2-Q3, дві Q4); два патенти на винахід, розділи у монографіях, Про ознайомлення наукової спільноти з результатами досліджень свідчать численні виступи на наукових конференціях та з'їздах.

За змістом, обсягом та структурою робота Тігунової О.О. відповідає вимогам, які ставляться до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук. Структура дисертаційної роботи має традиційний характер. Огляд літератури за змістом відповідає напрямку проведених досліджень. У ньому подано інформацію про ацетон-бутанол-етанольну ферментацію як спосіб отримання біопалива, а також про застосування методів метаболічної інженерії клостридій для підвищення накопичення цільового продукту. Особлива увага приділена характеристикам незернової рослинної біомаси як субстрату для культивування мікроорганізмів та стратегії вдосконалення виробництва біобутанолу з лігноцелюлозної сировини.

Автором проведена величезна за об'ємом, але добре спланована експериментальна робота, яка умовно можна поділити на 2 частини. 1- філогенетичний аналіз та генетична характеристика штаму *Clostridium* sp., здатного до нагромадження бутанолу; конструювання штаму-продуцента; виділення та ідентифікація нового лігнолітичного штаму *Streptomyces graminifolii* та їх сумісне культивування для отримання підвищеного нагромадження бутанолу. Друга частина роботи присвячена використанню лігноцелюлозної сировини як субстрату для отримання бутанолу. Проаналізовано придатність для цієї мети незернової біомаси низки рослин та лігноцелюлозної біомаси комунального походження, а також відходів промисловості – технічного гліцерину, гліцерину-сирцю та скопу. Проведено оцінку різних способів підготовки лігноцелюлозних відходів.

Робота виконана на належному науково-методичному рівні із застосуванням широкого спектру генетичних, фізіологічних, мікробіологічних, фізико-хімічних методів, а також методів математичної статистики. Використані методичні підходи адекватні поставленим завданням.

Наведені результати є достовірними, основні наукові положення і висновки обґрунтовані. Робота добре ілюстрована (35 таблиці та 92 рисунки).

Зауваження, питання для обговорення та побажання.

1. Чи був генетично стабільним штам-продуцент бутанолу, сконструйований на основі *Clostridium* sp. UCM B-7570?
2. Для виділення лігнолітичного штаму досліджено 9 зразків ґрунтів, відібраних у п'яти областях України. Чим керувались при відборі зразків ?
3. Як змінювалось співвідношення компонентів лігноцелюлозних субстратів впродовж ферментації? Варто було б з'ясувати як використовувались цукри гідролізатів впродовж культивування.
4. Чи не пробували використати метод адаптивної лабораторної еволюції для отримання штамів, резистентних до інгібіторів гідролізатів лігноцелюлози та до підвищених концентрацій бутанолу

5. Відмічено, що штам *Clostridium* sp. UCM B-7570 майже не конвертував сік топінамбура до продуктів АБЕ ферментації. На якій підставі зроблено висновок, що бульби топінамбура містять інгібітори розвитку та росту мікроорганізмів ?
6. Як можна пояснити накопичення етанолу, а не бутанолу іммобілізованими клітинами продуцента на лігноцелюлозних субстратах? (рис.5.5)
7. Продукція бутанолу при сумісному культивуванні *S. graminifolii* та *Clostridium* sp. UCM B-7570 була значно нижчою, ніж за використання лише самого продуцента . При цьому зростання накопичення бутанолу дуже сильно залежало від природи лігноцелюлозного субстрату. З чим це пов'язано ? (рис.5.6. с 240)
8. У тексті дисертації є фраза «Стратегія спільного культивування дозволяє використовувати дешевший субстрат, підтримує ріст *Clostridium* без будь-якої анаеробної обробки та покращує кінцевий вихід бутанолу, але ніяких даних не наведено щодо покращення росту.(с. 241).
9. Чому для вивчення впливу стресових факторів вибрано саме цинк, а не інший метал, який може викликати наприклад оксидативний стрес, Із наведених даних неясно чи впливали іони цинку чи сульфат-іони. (с.244)
10. На наш погляд, при дослідженні впливу гліцеролу та його суміші з глюкозою на ріст і продукцію бутанолу варто було б визначити як споживались ці джерела карбону (с. 246 рис 5.9)
11. Для того, щоб зробити висновок про вплив кисню на нагромадження бутанолу напевне недостатньо вивчити вплив швидкості перемішування. Варто було б визначити при цьому насичення культурального середовища киснем.
12. На жаль добре враження від змісту роботи псують невдалі вислови і граматичні помилки, яких у роботі є дуже багато (синтез бутанолу, біологічна активність клітин,, цукор гліцерин, спиртова активність, пісчаний, амолітична зона, стерелізували, рецеркуляція, сокультивування і т.д)

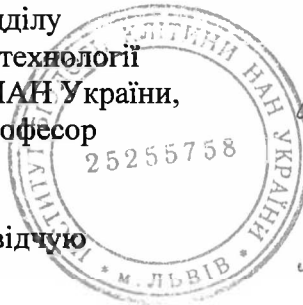
Більшість з перелічених запитань та зауважень мають дискусійний характер і не зменшують наукової та практичної цінності дисертаційної роботи.

Висновок.

1. Дисертаційна робота Тігунової О.О. є завершеною науковою працею, в якій визначено та охарактеризовано повний геном *Clostridium* sp. UCM B-7570, на основі якого розроблено конструкцію нового рекомбінантного штаму-продуцента бутанолу та досліджено процес АБЕ ферментації, показано ефективність *Clostridium* sp. UCM B-7570 у накопиченні бутанолу за використання різних видів попередньої підготовки (гідролізу) незернової лігноцелюлозної біомаси.
2. Отримані результати розширюють та поглиблюють уявлення про здатність представників роду *Clostridium* утворювати бутанол за використання різних лігноцелюлозних субстратів та становлять основу для розроблення технології промислового отримання біобутанолу.
3. Автореферат повністю відображає зміст дисертації.

4. За своєю актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, обґрунтованістю сформульованих наукових положень, достовірністю отриманих результатів та практичною цінністю дисертаційна робота **Тігунової Олени Олександрівни** відповідає Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 року № 1197, а її авторка заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - Біотехнологія

Пров. наук. співробітник відділу
молекулярної генетики і біотехнології
Інституту біології клітини НАН України,
доктор біологічних наук, професор



Федорович Д.В.

Підпис Федорович Д.В. засвідчую
Вчений секретар, к.б.н.

Барська М.Л.