

ВІДГУК

офіційного опонента Стабнікова Віктора Петровича
на дисертаційну роботу Тігунової Олени Олександрівни «**Характеристика нових штамів *Clostridium* sp. – продуцентів біобутанолу та їх використання для АБЕ ферментації лігноцелюлозних субстратів**», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження. Біобутанол вважається одним з найбільш перспективних видів біопалива, яке можна отримати шляхом ферментації відновлюваних джерел біомаси. Таке біотехнологічне одержання бутанолу дозволяє отримати відновлювальне та екологічно безпечне біопаливо як заміну викопного палива, знизити емісію вуглекислого газу в атмосферу, та запобігти забрудненню навколишнього середовища відходами сільського господарства та промисловості.

Згідно з європейськими визначеннями поновлювальні джерела енергії – це застосування безпосередньо біомаси у вигляді палива чи біосировини для подальшого перетворення на паливо. Основу сировинної бази для біоенергетики в Україні становлять: органічна біомаса рослинного і тваринного походження. Частина відходів використовується як паливо, але значна кількість залишкової біомаси потенційно може бути перероблена на різноманітну продукцію, включаючи біопаливо. Основним структурним компонентом багатьох відходів сільського господарства та деревообробної промисловості є лігноцелюлоза. Біоконверсія лігноцелюлозних відходів — це суттєвий внесок у подолання багатьох екологічних та економічних проблем і підґрунтя для створення нових видів біопалива.

Анаеробна ацетон-бутанол-етанольна (АБЕ) ферментація є традиційним та найбільш широко застосовуваним методом виробництва біобутанолу, яка використовує як культуру-продуцента бактерії роду *Clostridium*. Однак, бактерії не здатні ефективно утилізувати полісахариди рослинної біомаси без попереднього розщеплення останніх до моно- та олігосахаридів. В першу чергу,

процеси попередньої обробки можна розділити на чотири загальні категорії: (1) фізична або механічна обробка, включаючи фрезерування/подрібнення, екструзія, мікрохвильова та ультразвукова обробки, які ефективно руйнують фізичну структуру лігноцелюлозна біомаси; (2) хімічна обробка, що включає застосування концентрованої/розведеної кислоти, лугу, озонолізу, органічних розчинників та іонних рідин; (3) фізико-хімічна обробка, що включає використання парового, амонійного, CO₂ вибухів та гарячу воду для ефективного вивільнення моносахаридів та олігосахаридів; (4) біологічна обробка з використанням мікроорганізмів (таких як гриби, бактерії або консорціуми грибів та бактерій) для розкладання лігніну, геміцелюлози та целюлози, що має потенційно високу селективність ферментативного гідролізу, однак залежна від концентрації субстрату, навантаження ферменту, рН та температури. Цій проблематиці присвячено дисертаційну роботу Тігунової Олени, у якій за допомогою сучасних методів практичної мікробіології, молекулярної генетики, аналітичної хімії, біоінформатики та біотехнології вивчено властивості вітчизняного штаму-продуцента бутанолу та запропоновано нові технологічні рішення отримання біобутанолу. Отже, тематика дослідження є актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН 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».

Оцінка обґрунтованості наукових результатів дисертації, їх достовірності та новизни. Наукова новизна результатів дисертаційного дослідження полягає в наступного:

Автором вперше досліджено вітчизняний штам-продуцент бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-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 у роботі виділено з природних джерел новий лігнолітичний штам *Streptomyces graminifolii*, визначено нуклеотидну послідовність гену 16S рРНК

та проведено філогенетичний аналіз штаму. Послідовність гена 16S рРНК зареєстрована в базі даних GenBank за номером PQ283992.

Розроблено дизайн конструкції нового рекомбінантного штаму-продуцента бутанолу. Проведено метаболомний аналіз конструкції штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 та показано, що видалення великої субдиниці гліцеролдегідратази (*dhaB*) за допомогою адаптованої ніказної системи *Streptococcus pyogenes* типу II CRISPR/Cas9 формує мутант, що виробляє бутанол як основний продукт.

Вперше проведено іммобілізацію клітин бактерій *Clostridium* sp. UCM B-7570 на різних носіях та визначено носій, що дозволяє підвищити концентрацію бутанолу у ферментаційному середовищі. Визначено способи попередньої підготовки рослинної сировини для підвищення виходу бутанолу в процесі ферментації.

Отже, в дисертаційній роботі поставлене наукове завдання виконано повністю, здобувач повною мірою оволодів методологією наукової діяльності.

Оцінка змісту дисертації, її завершеність та дотримання принципів академічної доброчесності.

За своїм змістом дисертаційна робота здобувача Тігунової О.О. повністю відповідає паспорту спеціальності 03.00.20 – біотехнологія, формулі, основним напрямкам дослідження та галузі. Дисертаційна робота є завершеною науковою працею і свідчить про наявність особистого внеску здобувача у науковий напрям біотехнології. Розглянувши звіт подібності за результатами перевірки дисертаційної роботи на текстові співпадіння, можна зробити висновок, що дисертаційна робота Тігунової Олени Олександрівни є результатом самостійних досліджень здобувача і не містить елементів фальсифікації, компіляції, фабрикації, плагіату та запозичень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають належні посилання та відповідне джерело.

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 найменування, додатки. Дисертація викладена на 346 сторінках, робота містить 35 таблиці та 92 рисунки.

У вступі дисертаційної роботи достатньо обґрунтовано її актуальність, сформульовано мету і завдання досліджень, наведено зв'язок роботи з науковими програмами, висвітлено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, проінформовано щодо особистого внеску здобувача та апробації результатів досліджень.

Аналіз літератури з проблематикою дослідження викладено у першому розділі, де авторка приділяє увагу дослідженню альтернативних видів біопалива та детальніше зупиняється на ацетон-бутанол-етанольному бродінні як мікробіологічному 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. Інформативний і добре структурований розділ «Огляд літератури» обґрунтовує мету дисертаційного дослідження та сформульовані завдання.

Розділ «Матеріали та методи дослідження» включає перелік штамів-продуцентів та сировини, які були використані в роботі. Наводяться умови, які були застосовано для культивування мікроорганізмів та поживні середовища. Детально описано різні способи попередньої підготовки сировини. Особливу увагу приділено методам виділення нових штамів мікроорганізмів для послідуєчого спільного культивування. У розділі наведено методи ліофілізації та іммобілізації клітин штамів-продуцентів. Детально описано методику виділення ДНК, секвенування геному, аналізу даних та реконструювання рекомбінантного штаму. Наведено методи статистичного опрацювання отриманих результатів.

Оригінальні результати, отримані авторкою, представлені у трьох розділах та обговоренні. У розділі 3 проведено оцінку та філогенетичний аналіз вітчизняного штаму-продуценту бутанолу. Проведено повне секвенування

геному з мапуванням та характеристикою всіх кластерів генів. Виділено та ідентифіковано новий вітчизняний штам лігнолітичних бактерій для подальшого ферментного гідролізу лігноцелюлози. Згідно результатів повного секвенування геному дисертантка обґрунтувала і розробила конструкцію рекомбінантного штаму-продуценту бутанолу *in silico*. Експериментальні результати представлені у четвертому розділі стосуються використання різного виду лігноцелюлозної сировини як субстрату. Визначено макрокомпонентний склад незернової частини біомаси та його вплив на процес ферментації. Проведено дослідження різних методів попередньої підготовки сировини та їх вплив на накопичення бутанолу вітчизняними штамми-продуцентами. Наведено результати аналізу та використання відходу від виробництва біодизелю – гліцерину як субстрата для отримання біобутанолу. Обґрунтовано підбір комбінованих способів гідролізу для попередньої обробки лігноцелюлозної біомаси. Проведено порівняння та вдосконалення різних способів попередньої обробки сільськогосподарських рослинних відходів для збільшення накопичення бутанолу, оптимізація технологічних параметрів культивування продуценту бутанолу для підвищення його біосинтезу, що може бути доцільним при створенні комерційної технології і промислового виробництва. Проведено дослідження використання різних способів гідролізу на модельному об'єкті – міскантусі. Досліджено і оптимізовано параметри ультразвукової дезінтеграції лігноцелюлозної сировини і показано, що для кожного з видів лігноцелюлозної біомаси необхідно застосовувати відповідний вид попереднього оброблення та/або їх комбінацію. Отримані результати можуть слугувати підґрунтям для подальших досліджень з вдосконалення існуючих або створення нових технологій біобутанолу. У п'ятому розділі сконцентровано дослідження на особливостях культивування вітчизняних штамів-продуцентів. Проведено іммобілізацію клітин культури – продуценту бутанолу та показано підвищення його накопичення на середовищі з технічним гліцеином в якості вуглецевого субстрату. Досліджено можливість спільного культивування різних штамів мікроорганізмів для оцукровування субстрату та обґрунтовано перспективність використання мікробіологічних

консорціумів для отримання біопалива. Продемонстровано підвищення накопичення бутанолу за спільного культивування анаеробного продуцента бутанолу в консорціумі з аеробною культурою мікроорганізмів. Вивчено вплив стресових факторів на клітини штаму-продуцента бутанолу та накопичення цільового продукту. Встановлено оптимальне середовище для ліофільного висушування суспензії клітин бактерій продуцента бутанола та визначено оптимальну температуру для її зберігання. У шостому заключному розділі приводиться узагальнення одержаних авторкою результатів та запропоновано загальний методологічний підхід до створення біотехнології бутанолу на основі вітчизняних штамів-продуцентів.

Дисертаційна робота оформлена відповідно до вимог наказу МОН України від 12 січня 2017р. №40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації».

Ідентичність реферату та основних положень дисертації. Автореферат у повному обсязі відображає матеріали дисертаційної роботи. Основні положення та висновки є ідентичними у дисертації та авторефераті. Дисертацію та реферат оформлено згідно вимогам МОН.

Практичне значення одержаних результатів. У ході виконання роботи дана характеристика штаму продуцента бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 та отримано лігнолітичний штам *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 обробки 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 для одержання біопалива при використанні клостридій як продуцентів біобутанолу. Крім того, результати дослідження складу сировини 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.

Ступінь обґрунтованості і вірогідності наукових досліджень та висновків дисертаційної роботи. Дослідження Тігунової О.О. виконано на сучасному науковому рівні, що свідчить про високий рівень знань, теоретичної та практичної підготовки дисертантки. Наукові результати висвітлені у 9 статтях у наукових фахових виданнях, включених на дату опублікування до переліку наукових фахових видань України, 5 статтях у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus (три – у виданнях **Q2-Q3**, дві статті – у виданнях **Q4**), розділах в двох монографіях, двох патентах на винахід, 32 тезах доповідей на наукових конференціях. Таким чином, наукові результати описані в дисертаціях повністю висвітлені у наукових публікаціях здобувача.

Запитання та зауваження до дисертаційної роботи. Не зважаючи на загальну позитивну оцінку дисертації під час ознайомлення з роботою виникли деякі запитання дискусійного характеру та зауваження:

1. У тексті зустрічаються стилістичні помилки; неясні, невдалі і некоректні формулювання, наприклад:

Колонія (рис. 3.9) ідентифікована з використанням молекулярно-генетичного методу

Рис.2.10. Ліофілізовані бактерії у флаконах

Отримано нові штами-продуценти лігнолітичних бактерій роду *Streptomyces*, один з яких мав найбільшу амолітичну зону

Внутрішньої здатності мікроорганізмів адаптуватися до стресових умов

Вплив питомої потужності ультразвуку на накопичення біобутанолу в межах досліджуваного діапазону був меншим за інтенсивність, але призводив до збільшення виходу бутанолу

2. Багато фотографій, представлених у дисертації, мають низьку якість.

3. Аналіз сировини (листя, гілки), що постачається в міських умовах конкретного міста, ніяк не можна вважати результатом докторської дисертації.

4. Не застосовані статистичні методи для перевірки достовірності відмінностей.

5. В роботі не проводиться порівняння отриманих результатів по накопиченню бутанолу з існуючими біотехнологіями його одержання.

6. Блок-схема основних етапів біотехнології виробництва бутанолу з лігноцелюлозних субстратів (Рис. 6.1) дуже лаконічна і не відображає у всій повноті результатів дисертації.

7. Висновки не показують всієї новизни та важливості проведених досліджень.

8. Обмежена кількість опублікованих праць на тему дисертації. У посиланнях на патенти не вказано їхньої назви.

9. Щодо списку літератури. Необхідно дотримуватися єдиного стилю, а у представленій роботі це правило не дотримано.

Вважаю, що висловлені зауваження не є визначальними і не зменшують загальну наукову новизну та практичну значимість результатів та не впливають на позитивну оцінку дисертаційної роботи.

Загальний висновок і оцінка дисертації щодо її відповідності чинним вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. За своєю актуальністю, новизною, обґрунтованими науковими результатами, визначенням перспективних практичних напрямів і повнотою представлення дисертаційна робота Тігунової Олени Олександрівни «Характеристика нових штамів *Clostridium* sp. – продуцентів біобутанолу та їх використання для АБЕ ферментації лігноцелюлозних субстратів», подана на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20. – біотехнологія відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» та вимогам пунктів 7–9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 року та МОН України щодо докторських дисертацій, а її автор Тігунова О.О. заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент:

доктор технічних наук, професор,
завідувач кафедри біотехнології і мікробіології
Національного університету харчових
технологій МОН України

Віктор СТАБНІКОВ

