Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
Національна академія наук України
Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ТІГУНОВА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 663.18:577.222

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.20 - Біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ О.О. Тігунова

Науковий консультант: Шульга Сергій Михайлович, доктор біологічних наук, професор

Київ – 2025

Моїм батькам присвячується

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.

Дисертаційна робота присвячена характеристиці штамів-продуцентів *Clostridum* sp. та дослідженню процесу АБЕ ферментації лігноцелюлозних субстратів. Здійснено повноцінне секвенування геному вітчизняного штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570. Виявлено, що геном кодує 4262 гени, 4057 з яких кодують протеїнів, містить 14 оперонів рРНК і 59 оперонів тРНК, проведено мапування та створено повноцінну карту геному. Сумарну ДНК виділяли методом м'якого лізису із подальшою очисткою від білків хлороформом в присутності NaCl. Одержану сумарну ДНК аналізували електрофоретично та спектрофотометрично. Аналіз ензимів, які беруть участь у ферментації бутанолу, показав, що рівень подібності між *C. pasteurianum* UCM B-7570 і типовими штамами *C. acetobutylicum* коливався від 71 % (еноіл-КоА гідратаза) до 87 % (ацил-КоА дегідрогеназа) і від 70 % (бета-субодиниця флавопротеїну транспорту електронів) до 83,6 % (ацил-КоА-дегідрогеназа) порівняно зі штамами типу *C. beijerinckii*. Таким чином, ацил-КоА-дегідрогеназа має найвищу протеїнову ідентичність серед трьох видів.

Виділенно новий штам лігнолітичних бактерій *S. graminifolii* та використано його для інтенсифікації накопичення бутанолу методом спільного культивування. 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. Колонія з найбільшою зоною амолітичної активності навкруги була вилучена, промікроскопійована та ідентифікована з використанням молекулярно-генетичного методу за послідовністю 16S рРНК, яка була видалена та секвенована.

Здійснено філогенетичний аналіз на основі послідовності гена 16S рРНК з бази даних GenBank для встановлення філогенетичних зв'язків між новим штамом та іншими представниками роду *Streptomyces*, що підтвердило його належність до *S. graminifolii*. Проведено культивування *S. graminifolii* та *Clostridium* sp. UCM B-7570. Результати дослідження показали значне підвищення акумулювання бутанолу в культуральній рідині порівняно з середовищем з нативною незерновою біомасою рослин. Відмічено, що найбільше зростання накопичення цільового продукту у 5,5 разів було за використання біомаси *Panicum virgatum L.* як субстрату. Показано, що вирощування *S. graminifolii* на всіх видах незернової рослинної біомаси до інокулювання середовища *Clostridium* sp. UCM B-7570 знижувало накопичення бутанолу. Це може бути обумовлено використанням стрептоміцетами розщеплених цукрів для власного споживання та нарощування біомаси. Охарактеризовано, що 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. Продемонстровано потенціал штучних мікробних консорціумів для виробництва біотехнологічних продуктів на базі широкого спектру успішно створених процесів спільного культивування.

Охарактеризовано кластери генів основних метаболічних шляхів вітчизняного штаму-продуценту. Показано, що ензим великої субодиниці гліцеролдегідратази, який бере участь у біосинтезі 1,3-пропандіолу, кодується геном *dhaB* і був ідентифікований у геномі *C. pasteurianum*, але не в *C. acetobutylicum* або *C. beijerinckii*. Створено повноцінну мапу секвенованого геному нового штаму *C. pasteurianum* та ідентифіковано кластери генів, залучених до АБЕ-ферментації. Порівняльний аналіз виявлених послідовностей

ферментів показав високий рівень подібності – 91,4-100 %, до *C. pasteurianum* DSM 525.

Розроблено дизайн конструкції рекомбінантного штаму-продуценту для підвищення накопичення бутанолу. Велика субодиниця гліцеролдегідратази, кодована геном *dhaB,* була обрана як мішень для видалення гена. Для створення несучої конструкції потрібно було введення гайдерної РНК поблизу фланкованої послідовності гена мішені *dhaB.* Створено делеційний вектор гліцериндегідрогенази pNickclos1.0-cas9n-dhaB, що містив ніказу cas9, направляючу РНК на *dhaB* та матрицю редагування H_1 та H_2. Сконструйовано шаблон для редагування, що складався з двох областей гомології вище та нижче за *dhaB* таким чином, щоб забезпечити видалення промотора *dhaB* та цільового сайту гРНК.

Отримана конструкція дала змогу замовчування гену *dhaB.* Для проведення аналізу потоків метаболізму використано алгоритми лінійного програмування. Для побудови моделі за основу була взята модель 20 метаболітів для *C. pasteurianum* DSM 525 та 28 основних реакцій. Відмічено, що видалення великої субодиниці гліцеролдегідратази (*dhaB*) за допомогою адаптованої ніказної системи *Streptococcus pyogenes* типу II CRISPR/Cas9 призвело до 1,3-пропандіол-дефіцитного мутанта, що виробляє бутанол як основний продукт. Незважаючи на зниження росту, вихід бутанолу значно збільшився.

Аналіз метаболічного потоку виявив важливу роль нещодавно ідентифікованого шляху біфуркації електрона для перетворення кротоніл-КоА в бутирил-КоА у регуляції окисно-відновного балансу. Порівняно з вихідним штамом, потік шляху біфуркації електронів мутанта *dhaB* збільшився з 8 до 46 % від загального потоку від кротоніл-КоА до бутирил-КоА та бутанолу, що вказує на нову, незалежну від 1,3-пропандіолу схему бродіння гліцерину у *Clostridium pasteurianum.*

Визначено, на прикладі м. Києва, переважаючий ботанічний (видовий) склад лігноцелюлозної сировини комунального походження. Аналіз даних показав, що 82,7 % усіх насаджень (або 91,6 % без урахування хвойних)

становили лише шість порід дерев: клен, липа, тополя, каштан, дуб та береза. Проведено хімічний аналіз відходів кронування дерев (тополя, дуб, береза, липа, каштан, клен), зелених відходів косіння газонної трави та різнотрав'я, опалого листя (тополя, дуб, береза, липа, каштан, клен) та технічних культур (міскантусів гігантського, цукрового та китайського, а також сорго цукрового). 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.

Наведені розрахунки щодо складу насаджень та обсягів утворення лігноцелюлозної сировини, з урахуванням отриманих даних щодо параметрів складу природних біополімерів та енергетичної цінності сировини, дозволяють визначити динаміку утворення (накопичення, зберігання) та зміни енергетичного потенціалу лігноцелюлозної сировини протягом року, а також доцільні обсяги накопичення та зберігання лігноцелюлозної сировини для подальшого використання в технологіях біопалив.

Визначено макрокомпонентний склад різних видів лігноцелюлозної сировини. Виявлено, що найбільша кількість лігніна містилася в незерновій біомасі соняшника, що свідчить про її низький потенціал як сировини для біопалива. Відмічено, що за своїми технологічними характеристиками сік сорго цукрового є придатною сировиною для біоконверсії. Показано, що незернова рослинна біомаса може конвертуватися до бутанолу штамом *Clostridium* sp. UCM B-7570. Встановлено, що накопичення цільового продукту за використання таких нативних субстратів сягало менше 1 г/л. Відмічено, що штам *Clostridium* sp. UCM B-7570 майже не конвертував сік топінамбура до продуктів АБЕ ферментації. Отримані дані свідчать про те, що бульби топінамбура містять інгібітори розвитку та росту мікроорганізмів.

Визначено частину рослинної біомаси ріпаку, яку можуть використовувати бактерії роду *Clostridium* для асимілювання. Показано, що попередньо

підготовлена біомаса ріпаку конвертувалась штамами *Clostridium* sp., при цьому накопичення бутанолу залежало від штаму, кількості посівного матеріалу, концентрації та ступеню подрібнення субстрату. У результаті проведених досліджень виявлено, що незернова рослинна біомаса містить компоненти, які можуть зброджуватись, а саме целюлолозу, геміцелюлозу, водорозчинні речовини та елементи, які не конвертуються мікроорганізмами – лігнін, воски, які грають цементуючу роль для з'єднання клітин і збільшення властивостей механічної міцності, що робить лігноцелюлозу стійкою до біорозкладання мікроорганізмами.

Охарактеризовано макрокомпонентний склад яблучних вичавок, як відходу від виробництва яблучного соку. Показано, що більша частина компонентів може бути використана у біоконверсії до бутанолу штамами-продуцентами роду *Clostridium*. Виняток становили пектин, клітковина та геміцелюлози, що ферментувалися лише частково, та лігнін і віск, які не підлягали біоконверсії.

Проведено попереднє оброблення біомаси дротовидного проса вибуховим автогідролізом. Визначено компонентний склад біомаси дротовидного проса до та після автогідроліза. Показано, що в рослинній біомасі після автогідроліза накопичувався фурфурол, який інгібував розвиток бактерій. Для уникнення інгібуючого впливу фурфурол видаляли, а біомасу розділяли на компоненти. Показано можливість використання біомаси дротовидного проса як субстрату для біопалива. Обгрунтовано, що ключовим методом для обробки сировини є вибуховий автогідроліз, за використання якого показано зростання кількості цільового продукту в два рази.

Встановлено, що в умовах автогідролізу частковому руйнуванню піддається лише геміцелюлоза з утворенням значної кількості водорозчинних речовин – цукрів, тоді як целюлоза і лігнін, як окремі складові, після розділення можна співставити за кількістю із вмістом їх у вихідній сировині. Виявлено пряму залежність між кількостю геміцелюлози у вихідній біомасі та утворенню фурфуролу у продуктах вибухового автогідролізу, оскільки в результаті впливу

гідролізуючого агенту при підвищених температурах цукри можуть гідролізуватися з утворенням фурфуролу та оксиметилфурфуролу. Попереднє вилучення останніх з продуктів вибухового автогідролізу дротовидного проса дозволяє досягнути максимальної ефективності для ферментативного одержання біобутанолу.

Проведено дослідження шести видів нативної та УЗД обробленої незернової рослинної біомаси як субстрату для культивування штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570. Встановлено параметри попередньої підготовки рослинної сировини, за яких вихід бутанолу в процесі культивування був найбільшим. Показано, що фактор «час ультразвукового обробляння суспензії – t» не чинив помітного впливу на кінцевий результат, що свідчить про необхідність коригування меж варіювання цього параметру та встановлення верхньої межі варіювання на рівні 5 хвилин. Параметри УЗД опосередковано впливали на накопичення цільового продукту. Вплив питомої потужності ультразвуку на накопичення біобутанолу в межах досліду був меншим за інтенсивністю, але призводив до збільшення виходу бутанолу. Ефективність дії цього фактору зростала у випадку зменшення вмісту сухої речовини в суспензії. У деяких зразках відмічено підвищене накопичення етанолу замість бутанолу. Встановлено параметри попередньої підготовки рослинної сировини за допомогою УЗД. Показано, що за культивування штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 при використанні незернової біомаси п’яти видів сільськогосподарських відходів з різними попередніми підготовками існує можливість підвищення накопичення бутанолу за умов використання декількох підходів. У залежності від виду сировини можна отримати підвищену акумуляцію бутанолу за оптимізації умов оброблення.

Виявлено зміни у компонентному складі біомаси сорго після різних видів гідролізу. Кількість целюлози збільшувалась, що можна пояснити деградацією кристалічності під впливом гідролітичних факторів та розривом лігніноцелюлозних зв’язків, а також геміцелюлозних комплексів і зменшенням відсотку залишкового лігніну як наслідок руйнування за попередньої обробки.

Тривалість гідролізу суттєво впливала на компонентний склад, зменшуючи кількість водорозчинних речовин, які не витримували жорстких умов гідролізу та збільшуючи відсоток геміцелюлоз за рахунок ймовірного звільненням з лігнін-геміцелюлозних комплексів. Показано, що оптимізація технологічних параметрів культивування, а саме попередньої обробки за допомогою органозольного гідролізу дала змогу отримати 8 г/л біобутанолу з 60 г зеленої біомаси сорго сорту Energodar. Охарактеризовано різноманітні способи попередньої підготовки лігноцелюлозного субстрату та доведено, що оптимальні параметри як і вид обробки залежить безпосередньо від незернової рослинної біомаси та її компонентного складу.

Визначено, що біомаса, сік та багаса сорго цукрового конвертувались штамами-продуцентами бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570, *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *C. tyrobutylicum* IFBG C4B, але накопичення бутанолу залежало від субстрату та його попередньої підготовки. Скринінг штамів продуцентів бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570, *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *C. tyrobutylicum* IFBG C4B виявив, що найбільше накопичення бутанолу було у культуральній рідині за використання *Clostridium* sp. штаму UCM B-7570 та подрібненої біомаси цукрового сорго (1,5 г/л) як субстрату та штаму *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та соку (8,2 г/л). Встановлено, що оптимізація умов попередньої підготовки сировини підвищувала накопичення бутанолу на 25-50 %. Показана можливість використання біомаси сорго цукрового (сорт Energodar, hybrid AMBR-1, hybrid-720, hybrid ST-207), для накопичення бутанолу без деградації штамів. За умов використання сорту Energodar та hybrid AMBR-1, штам-продуцент *Clostridium* sp. UCM B-7570 накопичував найбільше бутанолу (5 г/л). Визначено, що для біомаси сорго цукрового сорту Energodar, hybrid AMBR-1, hybrid-720, hybrid ST-207 оптимальною попередньою підготовкою виявилось поєднання кислотного та ензиматичного гідролізу. Показано, що оптимізація технологічних параметрів культивування, а саме попередньої обробки за допомогою органозольного гідролізу дало змогу отримати 8 г/л біобутанолу з 60 г зеленої біомаси сорго сорту Energodar.

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

Обґрунтовано можливість використання адаптивного стресу для підвищення накопичення цільового продукту за рахунок зміни метаболічних шляхів у клітинах мікроорганізмів, опосередковано через дію стресових факторів. Вивчено вплив фурфуролу на накопичення бутанолу продуцентом *Clostridium* sp. UCM B-7570 за використання біомаси ріпаку як субстрату. Показано опосередковану дію впливу стресових факторів на фукціонування клітин *Clostridium* sp. Продемонстровано, що використання низьких концентрацій цинку приводило до підвищення накопичення біомаси, помірного збільшення накопичення продуктів АБЕ ферментації та продуктивності культури. Визначено, що використання цинку приводило до раннього початку солвентогенеза, який можна пояснити наявністю у клостридій Zn-залежних доменів активації ферментів, наприклад, алкогольдегідрогенази.

Досліджено вплив різного співвідношення гліцеролу та глюкози у інокуляційному середовищі на накопичення бутанолу в ензиматичному середовищі. Відмічено, що гліцерол як стресовий фактор і нетрадиційний субстрат, опосередковано впливає на спиртову та альдегіддегідрогеназну активності *Clostridium* sp. Продемонстровано, що накопичення бутанолу змінювалось в залежності від складу інокуляційного середовища, а саме, від співвідношення джерел вуглецю (глюкози та гліцеролу). Проведено дослідження впливу різних концентрацій аналогу гіпоксантину та інгібітору НАДФН-генеруючої ксантиндегідрогенази алопуринолу як стресового фактору на накопичення бутанолу культурою *Clostridium* sp. UCM B-7570. Показано, що

додавання алопуринолу до середовища під час АБЕ ферментації призводило до помітного збільшення продукування бутанолу з відповідним збільшенням швидкості росту клітин.

Визначено дію концентрації кисню в середовищі як стресового фактору, 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 та визначено, що при збільшенні швидкості перемішування підвищується надходження кисню в середовище, що спричиняє інгібування росту та розвитку культури, і як результат, накопичення бутанолу падає. Отримані результати дозволяють проводити зміни метаболічних шляхів мікроорганізмів за рахунок зміни умов культивування під впливом стресових факторів. Можливо також використовувати стресові фактори і в їх комбінації для підвищення рівня накопичення цільового продукту. Показано, що підвищення накопичення продуктів АБЕ ферментації можливе за використання внутрішньої здатності мікроорганізмів адаптуватися до стресових умов.

Проведено цитологічні дослідження як культури контролю, так і культури після впливу стресових факторів. Показано, що за порівняння характеристик культури контролю та після впливу будь-якого зі стресових факторів видно вкорочення довжини клітин, збільшення накопичення всередині гранульози та зниження кількості паличок в полі зору. Отримані результати свідчать за цитоекологічні зміни, що опосередковано підтверджуються зміною концентрації бутанолу (як механізм відповіді) в культуральному середовищі.

Для підвищення накопичення бутанолу з використанням гліцерину-сирця як субстрату було проведено іммобілізацію клітин культури *Clostridium* на різних носіях, які мали високу адгезивну активність щодо культури. Проведена іммобілізація клітин культури *Clostridium* на кільцях Рашига, смужках бельтингу та феритових кільцях як носіях показала, що усі носії мали високу адгезивну активність щодо культури. Визначено, що іммобілізовані культури прикріплювались до носіїв та утворювали довгі ланцюги з приблизно 20 клітин,

натомість, вихідна не іммобілізована культура таких ланцюгів не утворювала. Зроблено висновок, що іммобілізовані 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 іммобілізованих клітин свідчили про те, що розмноження клітин, ймовірно, гальмувалося якимись процесами, які відбуваються у цих клітинах і які відсутні повністю або не протікають з тією ж інтенсивністю, у вільних клітинах.

Проведено відмивання носіїв та висушування отриманої мікробної біомаси до абсолютно сухої ваги для визначення кількості клітин на носії. Показано підвищення накопичення бутанолу за допомогою іммобілізації клітин-продуцентів на відповідних носіях (бельтінгу, феритових кільцях та кільцях Рашига). Визначено, що за використання кілець Рашига, як носія для іммобілізації клітин, накопичення бутанолу збільшувалось в 2 рази.

Таким чином, у дисертаційній роботі представлені результати характеристики штамів-продуцентів *Clostridium* sp. та дослідження процесу їх АБЕ ферментації за використання лігноцелюлозних субстратів. Секвеновано геном вітчизняного штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570, створено мапу геному та розроблено дизайн конструкції рекомбінантного штаму, який запропоновано для підвищення накопичення бутанолу. Це дослідження продемонструвало новий оригінальний підхід для досягнення оптимальних параметрів ферментації з використанням різних видів сільськогосподарських відходів, які дозволяють здійснювати недороге та високоефективне ферментативне оцукрювання різноманітних джерел лігноцелюлози, забезпечуючи потенційну стратегію для великомасштабного виробництва біопалива для всіх основних біоенергетичних культур. Перш за все охарактеризовано склад незернової рослинної біомаси, як субстрату. Ці результати являють собою значний крок вперед у біоенергетичних технологіях, пропонуючи як практичні ідеї, так і стійкі рішення для покращеного виробництва біопалива. У сукупності проведені дослідження дають нове розуміння того, чому гідролізати лігноцелюлозної біомаси стійкі до біоконверсії з отриманням

біопалива. Слід відзначити виявлену ефективність спільного культивування, яке є найбільш перспективним методом для зменшення забруднення під час виробництва бутанолу. Визначено перспективні рішення для біопереробки різних енергетичних культур. Показано, що комбінування методів попередньої обробки незернової рослинної біомаси має великий потенціал для виробництва біопалива. Показано впливи стресових факторів під час культивування на клітини *Clostridium* sp., визначено оптимальні параметри попередньої підготовки сировини.

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

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

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 *Sorgum saccharatum* as substrate. *Open Agriculture Journal*, 18, e18743315284161. doi: 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 **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 **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 **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 **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.
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 (*45 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті)*.
3. **Tigunova, O.O.,** Umansikiy, 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 (*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., Pryiomov, 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 (*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 (*60 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті)*.
6. **Tigunova, O.O.,** Beiko, N. E., Andriash, H.S., Pryiomov, 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 (*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 (Sorgum 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. *(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

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

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-практичною 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

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 плазміди 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

*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

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 XXII міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI 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 XXII міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI 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–практичній 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 XXII міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI столітті», Київ. 913-915.

16.Захарова, О.Г., Андріяш, Г.С., та **Тігунова, О.О.** (2020). *Виділення стрептоміцетів з ґрунтів різних регіонів України.* Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI 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 XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна, Київ. 161.

18.Братишко, В.В., Ребенко, В.И., Софиенко, В.С., Шульга, С.М., и **Тигунова, Е.А.** (2020). *Пути повышения кормовой и энергетической ценности незерновой части урожая сельскохозяйственных культур.* Сборник научных статей по материалам xxiii международной научно-практической конференции «Современные технологии сельскохозяйственного производства», Гродно, Белорусь. 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 Міждународна 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 Міждународна 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 вищимі 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 дротовидного проса вищіми 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.

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 *Clostridum* sp. producer strains and the study of their ABE fermentation process of lignocellulosic substrates. Full genome sequencing of the domestic butanol-producing strain *Clostridium* sp. UCM B-7570 carried out. It was found that the genome encodes 4262 genes, 4057 of which encode proteins, contains 14 rRNA operons and 59 tRNA operons, mapping was carried out and a full genome map was created. Total DNA was isolated by the method of soft lysis followed by protein purification with chloroform in the presence of NaCl. The obtained total DNA was analyzed electrophoretically and spectrophotometrically. Analysis of the enzymes involved in butanol fermentation showed that the level of similarity between *C. pasteurianum* UCM B-7570 and typical strains of *C. acetobutylicum* ranged from 71 % (enoyl-CoA hydratase) to 87 % (acyl-CoA dehydrogenase) and from 70 % (beta-subunit of electron transport flavoprotein) to 83.6 % (acyl-CoA dehydrogenase) compared to *C. beijerinckii* type strains. Thus, acyl-CoA dehydrogenase has the highest protein identity among the three species.

A new strain of lignolytic bacteria *Streptomyces graminifolii* was isolated and used to intensify the accumulation of butanol by the method of co-cultivation. Colonies of actinomycetes, which are easily distinguished from colonies of other soil bacteria by their property to the difficulty of removal from agar using a microbiological loop due to immersion in the medium, which is characteristic of streptomycetes with agarolytic activity, were obtained. The colony with the largest surrounding area of

ammolytic activity was picked, microscopied, and identified using a molecular genetic method by the sequence of 16S rRNA, which was removed and sequenced.

A phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequence from the GenBank database was performed to establish phylogenetic relationships between the new strain and other members of the *Streptomyces* genus, which confirmed its belonging to *S. graminifolii*. Cultivation of *S. graminifolii* and *Clostridium* sp. UCM B-7570. The results of the study showed a significant increase in the accumulation of butanol in the culture liquid compared to the medium with native non-cereal plant biomass. It was noted that the largest increase in the accumulation of the target product by 5.5 times was for the use of *Panicum virgatum L.* as a substrate. It is shown that the cultivation of *S. graminifolii* on all types of non-cereal plant biomass before the inoculation of *Clostridium* sp. UCM B-7570 reduced butanol accumulation. This may be due to the use of split sugars by streptomycetes for their own consumption and biomass growth. It is characterized that with joint inoculation, the cultivation process is economized due to the oxygen consumption of *S. graminifolii* in the medium and the absence of the need to create anaerobic conditions due to inert gases. The potential of artificial microbial consortia for the production of biotechnological products based on a wide range of successfully established co-cultivation processes has been demonstrated.

Gene clusters of the main metabolic pathways of the domestic producer strain were characterized. It was shown that the enzyme of the large subunit of glycerol dehydratase, which is involved in the biosynthesis of 1,3-propanediol, is encoded by the *dhaB* gene and was identified in the genome of *C. pasteurianum*, but not in *C. acetobutylicum* or *C. beijerinckii*. A complete map of the sequenced genome of a new strain of *C. pasteurianum* was created and gene clusters involved in ABE fermentation were identified. Comparative analysis of the identified enzyme sequences showed a high level of similarity, 91.4-100 %, to *C. pasteurianum* DSM 525.

The design of a recombinant producer strain to increase butanol accumulation has been developed. The large subunit of glycerol dehydratase, encoded by the *dhaB* gene, was chosen as the target for gene deletion. Generating the carrier construct

required the introduction of a guide RNA near the flanking sequence of the *dhaB* target gene. A glycerol dehydrogenase deletion vector pNICKclos1.0-cas9n-dhaB containing cas9 nickase, guide RNA for *dhaB* and H1 and H2 editing matrix was created. An editing template consisting of two regions of homology upstream and downstream of *dhaB* in such a way as to ensure deletion of the *dhaB* promoter and the gRNA target site was constructed.

The resulting construct made it possible to silence the *dhaB* gene. Linear programming algorithms were used to analyze metabolic flows. To build the model, a model of 20 metabolites for *C. pasteurianum* DSM 525 and 28 main reactions was taken as a basis. Deletion of the large subunit of glycerol dehydratase (*dhaB*) using an adapted *Streptococcus pyogenes* type II CRISPR/Cas9 nickase system was noted to result in a 1,3-propanediol-deficient mutant producing butanol as the major product. Despite the decline in growth, the output of butanol increased significantly.

Metabolic flux analysis revealed an important role of a newly identified electron bifurcation pathway for the conversion of crotonyl-CoA to butyryl-CoA in the regulation of redox balance. Compared to the parent strain, the electron bifurcation pathway flux of the *dhaB* mutant increased from 8 to 46 % of the total flux from crotonyl-CoA to butyryl-CoA and butanol, indicating a novel 1,3-propanediol-independent glycerol fermentation scheme in *Clostridium pasteurianum*.

The predominant botanical (species) composition of lignocellulosic raw materials of municipal origin is determined on the example of the city of Kyiv. Data analysis showed that 82.7 % of all plantations (or 91.6 % excluding conifers) consisted of only six tree species: maple, linden, poplar, chestnut, oak and birch. Chemical analysis of tree crowning waste (poplar, oak, birch, linden, chestnut, maple), green waste from mowing lawn grass and forbs, fallen leaves (poplar, oak, birch, linden, chestnut, maple) and technical crops (*Miscanthus giganteus*, *Miscanthus sacchariflorus*, *Miscanthus sinensis*, as well as *Sorghum sacchartum*) was carried out. On the basis of the first comprehensive analysis of open arrays of data of municipal enterprises, conducted on the example of the city of Kyiv, the main groups and species of plants that form lignocellulosic raw materials of municipal origin were

determined and the chemical composition of these species was analyzed. The possible potential of biomass as a raw material for conversion to butanol is shown.

The given calculations regarding the composition of plantations and volumes of lignocellulosic raw materials, taking into account the data obtained regarding the parameters of the composition of natural biopolymers and the energy value of raw materials, allow to determine the dynamics of formation (accumulation, storage) and changes in the energy potential of lignocellulosic raw materials during the year, as well as the appropriate volumes of accumulation and storage lignocellulosic raw materials for further use in biofuel technologies.

Macrocomponent composition of various types of lignocellulosic raw materials determined. It was found that the largest amount of lignin was contained in the non-grain biomass of sunflower, which indicates its low potential as a raw material for biofuel. It was noted that according to its technological characteristics, *Sorghum sacchartum* juice is a suitable raw material for bioconversion. It was shown that non-cereal plant biomass can be converted to butanol by a strain of *Clostridium* sp. UCM B-7570. It was established that the accumulation of the target product using such native substrates reached less than 1 g/l. It was noted that the strain of *Clostridium* sp. UCM B-7570 almost did not convert Jerusalem artichoke juice to alcohols. The obtained data indicate that Jerusalem artichokes contain inhibitors of the development and growth of microorganisms.

It was determined what part of rapeseed plant biomass bacteria of the genus *Clostridium* can use for assimilation. It was shown that pre-treatment rapeseed biomass was converted by strains of *Clostridium* sp., while the accumulation of butanol depended on the strain, amount of inoculum, concentration and degree of grinding of the substrate. As a result of the research, it was found that non-grain plant biomass contains components that can be fermented, namely cellulose, hemicellulose, water-soluble substances and elements that are not converted by microorganisms - lignin, waxes, which play a cementing role for connecting cells and increasing mechanical strength properties, which makes lignocellulose resistant to biodegradation by microorganisms.

The macrocomponent composition of apple pomace, as a by-product of apple juice production, is characterized. It is shown that most of the components can be used in bioconversion to butanol by producing strains of the genus *Clostridium*. Exceptions were pectin, fiber and hemicelluloses, which were only partially fermented, and lignin and wax, which were not subject to bioconversion.

Pre-treatment of wire millet biomass by explosive autohydrolysis was carried out. The component composition of switchgrass millet biomass before and after autohydrolysis was determined. It was shown that furfural accumulated in the plant biomass after autohydrolysis, which inhibited the development of bacteria. To avoid the inhibitory effect, furfural was removed, and the biomass was separated into components. The possibility of using lignocellulosic raw materials as a substrate for biofuel is shown. It is substantiated that the key method for processing raw materials is explosive autohydrolysis, the use of which shows a two-fold increase in the amount of the target product.

It was established that under the conditions of autohydrolysis, only hemicellulose undergoes partial destruction with the formation of a significant amount of water-soluble substances – sugars, while cellulose and lignin, as separate components, after separation can be compared in quantity with their content in the raw material. A direct dependence of the amount of hemicellulose in the original biomass on the formation of furfural in the products of explosive autohydrolysis was found, because as a result of the effect of the hydrolyzing agent at elevated temperatures, sugars can be hydrolyzed with the formation of furfural and oxymethylfurfural. Preliminary extraction of the latter from the products of explosive autohydrolysis of wire millet allows to achieve maximum efficiency for the enzymatic production of biobutanol.

Study of six types of native and ultrasound-treated non-cereal plant biomass as a substrate for the cultivation of butanol-producing strain *Clostridium* sp. UCM B-7570 was conducted. The parameters of pre-treatment of plant raw materials for which the output of butanol in the cultivation process was the largest were established. It was shown that the factor «time of ultrasonic treatment of the suspension – t» had no

noticeable effect on the final result, which indicates the need to adjust the variation limits of this parameter and set the upper variation limit at the level of 5 minutes. Ultrasound parameters indirectly influenced the accumulation of the target product. The effect of the specific power of ultrasound on the accumulation of biobutanol within the experiment was less intense, but it leads to an increase in the output of butanol, the effectiveness of this factor increased in the case of a decrease in the content of dry matter in the suspension. In some samples, an increased accumulation of ethanol instead of butanol was noted. The parameters of pre-treatment of plant raw materials using ultrasound have been established. It is shown that the cultivation of the strain *Clostridium* sp. UCM B-7570 using non-cereal biomass of five types of agricultural waste with different pre-treatment, there is a possibility of increasing the accumulation of butanol under the conditions of using several approaches. Depending on the type of raw material, it is possible to obtain increased accumulation of butanol with optimization of processing.

Changes in the component composition of sorghum biomass after different types of hydrolysis were revealed. The amount of cellulose increased, which can be explained by the degradation of crystallinity under the effect of hydrolytic factors and the breaking of lignin-cellulose bonds, as well as hemicellulose complexes and the decrease in the percentage of residual lignin as a result of destruction during pre-treatment. The duration of hydrolysis significantly affected the component composition, reducing the amount of water-soluble substances that could not withstand the harsh conditions of hydrolysis and increasing the percentage of hemicelluloses due to the probable release of lignin-hemicellulose complexes. It is shown that the optimization of the technological parameters of cultivation, namely pre-treatment using organosol hydrolysis made it possible to obtain 8 g/l of biobutanol from 60 g of green biomass of sorghum of the Energodar variety. Various methods of pre-treatment of the lignocellulosic substrate and it is proved that the optimal parameters as well as the type of processing depends directly on the non-grain plant biomass and its component composition are characterized.

It was determined that the biomass, juice and bagasse of sweet sorghum were

converted by butanol-producing strains *Clostridium* sp. UCM B-7570, *C. acetobutylicum* UCM B-7407 and *C. tyrobutylicum* IFBG C4B but the accumulation of butanol depended on the substrate and its pretreatment. Screening of butanol producing strains *Clostridium* sp. UCM B-7570, *C. acetobutylicum* UCM B-7407 and C. *tyrobutylicum* IFBG C4B revealed that the highest accumulation of butanol was in the culture fluid using *Clostridium* sp. strain UCM B-7570 and milled sugar sorghum biomass (1.5 g/L) as a substrate and *C. acetobutylicum* strain UCM B-7407 and juice (8.2 g/L). It was found that optimizing the conditions of preliminary preparation of raw materials increased the accumulation of butanol by 25-50 %. The possibility of using sugar sorghum biomass (Energodar variety, hybrid AMBR-1, hybrid-720, hybrid ST-207) for the accumulation of butanol without strain degradation has been shown. Under the conditions of using the Energodar variety and the hybrid AMBR-1, the producing strain Clostridium sp. UCM B-7570 accumulated the most butanol (5 g/l). It was determined that for the biomass of sorghum of the sugar variety Energodar, hybrid AMBR-1, hybrid-720, hybrid ST-207, the optimal preliminary preparation was a combination of acid and enzymatic hydrolysis. It was shown that optimization of technological cultivation parameters, namely pretreatment using organosol hydrolysis, made it possible to obtain 8 g/l of biobutanol from 60 g of green biomass of sorghum of the Energodar variety.

The technology for obtaining biobutanol based on the detection of physiological and biochemical properties of the obtained strains of microorganisms has been improved. The possibility of using various plant raw materials (switchgrass, rapeseed, soybean and wheat biomass, Jerusalem artichoke tubers) as alternative substrates and industrial waste - technical and raw glycerol, scum for the cultivation of butanol-producing strains is shown.

The possibility of using adaptive stress to increase the accumulation of the target product due to changes in metabolic pathways in the cells of microorganisms, indirectly through the action of stress factors, is substantiated. The effect of furfural on the accumulation of butanol by the producer *Clostridium* sp. UCM B-7570 using rapeseed biomass as a substrate was studied. The mediated effect of stress factors on

the functioning of *Clostridium* sp. cells is shown. It was demonstrated that the use of low concentrations of zinc led to an increase in biomass accumulation, a moderate increase in solvent accumulation and crop productivity. It was determined that the use of zinc led to the early onset of solventogenesis, which can be explained by the presence in clostridia of Zn-dependent enzyme activation domains, for example, alcohol dehydrogenase.

The effect of different ratios of glycerol and glucose in the inoculation medium on the accumulation of butanol in the enzymatic medium was investigated. It was noted that glycerol, as a stress factor and unconventional substrate, indirectly affects the alcohol and aldehyde dehydrogenase activity of *Clostridium* sp. It was demonstrated that the accumulation of butanol varied depending on the composition of the inoculation medium, namely on the ratio of carbon sources (glucose and glycerol). Study of the effect of different concentrations of the hypoxanthine analog and the NADPH-generating xanthine dehydrogenase inhibitor allopurinol as a stress factor on the accumulation of butanol by *Clostridium* sp. UCM B-7570 was conducted. It was shown that the addition of allopurinol to the medium during ABE fermentation led to a noticeable increase in butanol production with a corresponding increase in cell growth rate.

The action of the concentration of oxygen in the medium as a stress factor, which either causes an increase in the metabolic activity of cells, or leads to a decrease in metabolism and cell death, has been determined. The effect of the mixing speed of the culture liquid on the accumulation of butanol was investigated and it was determined that when the mixing speed increases, the oxygen supply to the medium increases, which causes the growth and development of the culture to be inhibited, and as a result, the butanol accumulation falls. The obtained results make it possible to carry out changes in the metabolic pathways of microorganisms due to changes in cultivation conditions under the influence of stress factors. It is also possible to use stress factors in their combination to increase the level of accumulation of the target product. It is shown that increasing the accumulation of solvents is possible by using the internal ability of microorganisms to adapt to stressful conditions.

Cytological studies of both control cultures and cultures after exposure to stress factors were carried out. It is shown that a comparison of the characteristics of the control culture and after exposure to any of the stress factors shows a shortening of the cell length, an increase in accumulation within the granulosa, and a decrease in the number of rods in the field of view. The obtained results indicate cytoecological changes, which are indirectly confirmed by a change in the butanol concentration (as a response mechanism) in the culture medium.

To increase the accumulation of butanol using crude glycerol as a substrate, culture cells were immobilized on various carriers that had high adhesive activity towards the culture. Immobilization of *Clostridium* cells on Raschig rings, belting strips and ferrite rings as supports was carried out and showed that all supports had high adhesive activity towards the culture. It was determined that the immobilized cultures attached to the media and formed long chains of approximately 20 cells, whereas the original non-immobilized culture did not form such chains. It was concluded that the immobilized cells are in some special state, different from the stationary phase of growth, and are not in a state of rest, along with this, in most cases, the kinetic characteristics of the growth of the immobilized cells indicated that cell proliferation was probably inhibited by some processes, which occur in these cells and which are absent completely or do not occur with the same intensity in free cells.

Washing of the carriers and drying of the obtained microbial biomass to absolutely dry weight to determine the number of cells on the carrier was carried out. An increase in the accumulation of butanol using the immobilization of producer cells on appropriate supports (belting, ferrite rings, and Raschig rings) is shown. It was determined that when Raschig rings were used as a carrier for the immobilization the accumulation of butanol increased by 2 times.

Thus, the thesis presents the results of the characterization of *Clostridium* sp. producing strains and the study of the process of their ABE fermentation using lignocellulosic substrates. The genome of the domestic butanol producing strain *Clostridium* sp. UCM B-7570 was sequenced, a genome map was created, and a recombinant strain design was developed, which is proposed to increase butanol

accumulation. This study demonstrated a new applicable approach to achieve optimal fermentation parameters using different types of agricultural wastes that allow for low-cost and highly efficient enzymatic saccharification of diverse lignocellulose sources, providing a potential strategy for large-scale biofuel production for all major bioenergy crops. First of all, the composition of non-grain plant biomass as a substrate is characterized. These results represent a significant step forward in bioenergy technologies, offering both practical insights and sustainable solutions for improved biofuel production. Taken together, the studies provide new insights into why lignocellulosic biomass hydrolysates are resistant to bioconversion to biofuels. It is worth noting the effectiveness of co-cultivation, which is the most promising method for reducing pollution during butanol production. Promising solutions for bioprocessing of various energy crops have been identified. It has been shown that combining methods for pre-treatment of non-grain plant biomass has great potential for biofuel production. The effects of stress factors during cultivation on Clostridium sp. cells have been shown, and the optimal parameters for pre-treatment of raw materials have been determined.

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 35

ВСТУП 37

РОЗДІЛ 1. ЗАСТОСУВАННЯ КЛОСТРИДІЙ ТА НЕЗЕРНОВОЇ РОСЛИННОЇ БІОМАСИ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БІОБУТАНОЛУ 45

1.1 Покоління біопалива та його продуценти 45

1.2 Метаболічна інженерія солвентогенних клостридій 60

1.3 Незернова рослинна біомаса як субстрат для культивування штамів-продуцентів бутанолу 69

1.4 Стратегія вдосконалення виробництва біобутанолу з лігноцелюлозної сировини 77

Висновки до розділу 1 84

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 86

2.1 Штами-продуценти та сировина 86

2.2 Умови культивування та поживні середовища 92

2.3. Попередня підготовка сировини 103

2.4 Ліофілізація штамів-продуцентів 107

2.5 Іммобілізація штамів-продуцентів 109

2.6 Встановлення концентрацій продуктів АБЕ ферментації 110

2.7 Секвенування геному штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 та аналіз даних 111

2.8 Конструювання рекомбінантного штаму-продуценту бутанолу *in silico* 113

2.9 Спільне культивування 119

2.10 Статистична обробка результатів 120

РОЗДІЛ 3. СВОРЕННЯ МОДЕЛІ РЕКОМБІНАНТНОГО ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТУ З ПІДВИЩЕНИМ НАКОПИЧЕННЯМ БУТАНОЛУ 121

3.1 Філогенетичний аналіз *Clostridium* sp. UCM B-7570 121

3.2 Визначення основних характеристик геному штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 122
3.3 Характеристика кластерів генів основних метаболічних шляхів 127
3.4 Виділення та ідентифікація нового лігнолітичного штаму *Streptomyces graminifolii* 133
3.5 Конструювання рекомбінантного штаму-продуценту бутанолу *in silico* 138
Висновки до розділу 3 144
РОЗДІЛ 4.ВИКОРИСТАННЯ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОЇ СИРОВИНИ ЯК СУБСТРАТУ 147
4.1 Характеристики незернової лігноцелюлозної біомаси 147
4.2 Використання незернової лігноцелюлозної біомаси 168
4.2.1 Використання біомаси ріпаку 171
4.2.2 Використання відходів від виробництва яблучного соку як субстрату 176
4.2.3 Використання сорго цукрового 180
4.2.4 Вивчення гліцерину як субстрату 185
4.3 Види попередньої підготовки лігноцелюлозної сировини 194
4.3.1 Використання вибухового автогідролізу для попередньої обробки лігноцелюлозної сировини 194
4.3.2 Використання ультразвукової дезінтеграції для оброблення сировини 200
4.3.3 Комбіновані види гідролізу 210
Висновки до розділу 4 225
РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ *CLOSTRIDIUM* 235
5.1 Іммобілізації штаму-продуценту на різних носіях 235
5.2 Спільне культивування 240
5.3 Влив стресових факторів на функціонування клітин *Clostridium*

sp та ABE-ферментацію 242
5.4 Ліофілізація штамів-продуцентів 251
Висновки до розділу 5 254
УЗАГАЛЬНЕННЯ 258
ВИСНОВКИ 278
ПЕРЕЛІК ПЕРШОДЖЕРЕЛ 281
ДОДАТКИ 333

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АБЕ – ацетон-бутанол-етанол;

АСВ – абсолютно суха вага;

БГ – β-глюкозидази;

ГЦ (GC) – гуанін цитозин;

ДУ «ІХБГ НАН України» (IFBG) – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»;

ЖК – жирні кислоти;

ЕГ – ендоглюканази;

КоА – кофермент А;

КУО – колонієутворюючі одиниці;

ІБОНХ – Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря Національної академії наук України;

ІМЕСГ – Національний науковий центр «Інститут механізації та електрифікації сільського господарства» Національної академії аграрних наук України;

$НАД^+$ – нікотинамідаденіндинуклеотид;

НБС – Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка Національної академії наук України;

п.н. (bp) – пар нуклеотидів;

СНП – секвенування нового покоління;

УЗД (USD) – ультразвукова дезінтеграція;

$ФАД^+$ – флавінаденіндинуклеотид;

ЦБГ – целобіогідралази;

ЦПК – целюлозо-паперовий комбінат;

BCS – бутирил-КоА синтез;

CBP – консолідована біообробка;

CCR – репресія вуглецевого катаболіту;

CSH – гідролізат кукурудзяної соломи;

ED – Ентнера-Дурова;

EMP – Ембдена-Мейєргофа-Парнаса;

HMF – гідроксиметил фурфурол;

PDO – пропандіол;

PPP – пентозофосфатний шлях;

PTA – фосфатрансацителазний ензим;

PTS – фосфаттрансферазна система;

SHF – гідроліз та ферментація;

SCS – одночасне оцукровування та бродіння;

SPF – потік специфічних протонів;

SSCF – одночасне оцукровування та коферментація;

SSF – оцукровування;

THL – тіолазний ензим;

UCM – українська колекція мікроорганізмів.

ВСТУП

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 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). 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 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 надпродуктивних 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 біобутанолу.

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 обробляння 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 використання лігноцелюлозних субстратів.

Для досягнення поставленої мети сформульовані такі завдання:

1. Здійснити секвенування повного геному штаму-продуценту *Clostridium* sp. UCM B-7570 і провести мапування.
2. Виділити з природних джерел лігнолітичний штам для оцукровування і спільного культивування з *Clostridium* sp. UCM B-7570.
3. Розробити дизайн конструкції рекомбінантного штаму-продуценту для підвищення накопичення бутанола.
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 B-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 штамами-продуцентами *Clostridium*.

Предмет дослідження – особливості накопичення бутанолу штамами *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 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 реєстраційній номер CP112872.

Вперше виділено з природних джерел новий лігнолітичний штам *Streptomyces graminifolii*, визначено нуклеотидну послідовність гена 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-

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

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. Показана можливість використання як альтернативних субстратів різної рослинної сировини (біомаси ячменю, ріпаку, сої, пшениці, сорго цукрового, міскантусу, дротовидного 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 в 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 обробляння 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 літературних джерел, сформульовано 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., член-кореспондентом НАН України Д.Б. Рахметовим, д.б.н., проф. С.М. Шульгою, д.т.н., проф. В.В. Братішко, 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'їзді товариства мікробіологів України ім С. М. Виноградського (Україна, Одеса, 2017).

Публікації. За матеріалами дослідження опубліковано 14 наукових праць, в тому числі 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 – у виданнях **Q4**); два патенти на винахід, розділи у монографіях, 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.

РОЗДІЛ 1
ЗАСТОСУВАННЯ КЛОСТРИДІЙ ТА НЕЗЕРНОВОЇ РОСЛИННОЇ БІОМАСИ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БІОБУТАНОЛУ

1.1 Покоління біопалив та його продуценти

Швидке вичерпання запасів викопного палива та непередбачуване через глобальні виклики коливання цін на сиру нафту привернули увагу дослідників і технологів до пошуку, вивчення і виробництва різних видів альтернативного палива, зокрема, палива з біомаси (Puyo et al., 2024). Крім того, з дефіцитом викопного палива одночасно виникли численні екологічні проблеми, зокрема викиди парникових газів і глобальне потепління, що загострило потребу в максимально екологічно чистому виді палива (Ofremu et al., 2024). За останні десятиліття виконано кілька міжнародних проєктів зі створення та використання відновлюваних джерел енергетичних ресурсів для споживання первинної енергії. У останні роки все більше уваги промисловості закцентовано на виробництві рідких органічних продуктів та палива, в першу чергу, етанолу та бутанолу, з відновлюваних джерел сировини на основі біомаси (Quevedo-Amado et al., 2024). Термін «біомаса» інтерпретується по-різному залежно від того, в якій галузі знань він використовується, але в Законі України «Про альтернативні види палива» наведено його базове визначення як сировини для енергетичного використання, а саме: «Біомаса – невикопна біологічно відновлювана речовина органічного походження, здатна до біологічного розкладу, у вигляді продуктів, відходів та залишків лісового та сільського господарства (рослинництва і тваринництва), рибного господарства і технологічно пов’язаних з ними галузей промисловості, а також складова промислових або побутових відходів, здатна до біологічного розкладу». Так, **біоетанол** вважається основним відновлюваним біопаливом для використання в різних країнах, зокрема в Китаї, Бразилії, Сполучених Штатах Америки і деяких європейських країнах (Huzir et al., 2018). **Біобутанол** продемонстрував свою здатність бути альтернативою бензину,

оскільки він ефективно використовується як паливо у транспортних засобах без необхідності модифікації системи двигуна внутрішнього згоряння. Біобутанол має вищу температуру кипіння та вищій вміст енергії, ніж біоетанол (Lopez-Linars et al., 2020), тому він як паливо, на тлі доступних світових запасів нафти, що виснажуються, є перспективним джерелом енергії.

Біопаливо першого покоління – добре відоме й як звичайне біопаливо і зазвичай виготовляється з використанням цукру, крохмалю або рослинних олій за участю таких процесів як ферментація, дистиляція та переетерифікація. Для виробництва біопалива першого покоління цукор, крохмаль або рослинна олія, отримані з сільськогосподарських культур, перетворюються на біодизельне паливо або етанол шляхом переетерифікації, або дріжджового бродіння. Спирти, які зазвичай використовують як біопаливо, виготовляють шляхом бродіння цукру або крохмалю. У процесі бродіння переважно продукується етанол і незначна кількість бутанолу та пропанолу. У багатьох країнах етанол зазвичай використовують як добавку до бензину. Сільськогосподарські відходи – придатне джерело для виробництва біодизелю шляхом переетерифікації рослинної олії або тваринного жиру шляхом утворення метилових етерів жирних кислот у присутності каталізатора з подальшою дистиляцією. Біодизель можна використовувати замість нафтового дизеля у дизельних двигунах або в суміші обох палив. Основним обмеженням, пов’язаним з біопаливом першого покоління, є нерентабельне виробництво і використання харчової сировини, що створює проблему «їжа проти палива». Додаткова проблема, яка пов’язана з біопаливом першого покоління, це можливість втрати біорізноманіття, оскільки існує ймовірність вирощування монокультури та виникнення жорсткої конкуренції за володіння земельними та водними ресурсами (Cavelius et al., 2023).

Біопалива другого покоління виготовляється з нехарчових культур, лігноцелюлозної біомаси або деревних культур, сільськогосподарських, комунальних залишків або відходів. Біопаливо другого покоління є ефективною відповіддю на аргумент «їжа проти палива», оскільки воно використовує

залишки продовольчих культур, вирощених на ріллі, або спеціалізовані непродовольчі культури, які вирощені на ґрунтах не придатних для продовольчих культур. Нехарчовою сировиною для виробництва біопалива другого покоління є трави та інші культури, відпрацьовані рослинні олії, тверді міські відходи тощо. Етанол, який виробляють із швидкоростучих дерев, можна отримати шляхом ферментативного гідролізу біомаси і культивування відокремлених цукрів від волокон лігніну. Рослини, такі як солома та деревні рослинні залишки, проходять термохімічну попередню обробку (газифікацію) для виробництва синтез-газу, який є сумішшю монооксиду вуглецю, водню та інших вуглеводнів. Отриманий у такий спосіб гідроген зазвичай використовується як паливо, а інші вуглеводні можуть застосовувати як добавки до бензину. Обмеження, пов’язані з біопаливом другого покоління, охоплюють труднощі з вилученням цукру з паливних культур, високі капітальні витрати та винесення поживних речовин із ґрунту енергетичними культурами (Balan, 2014).

Виробництво біобутанолу ІІ покоління з поновлюваних нехарчових джерел сировини – целюлозовмісних відходів, має вирішити проблему використання сільськогосподарських відходів (Jaismal et al., 2021). Одним із методів комплексної попередньої підготовки лігноцелюлозної сировини є ультразвукова дезінтеграція (УЗД). Цей метод забезпечує значну деструкцію біомаси та дає можливість виділити складові компоненти лігноцелюлозної сировини (Konovalov et al., 2021). У подальшому, компоненти лігноцелюлозної біомаси можуть слугувати як субстрат для мікробіологічної конверсії мікроорганізмами роду *Clostridium* і для отримання біобутанолу (Pinko et al., 2021).

Біопаливо третього покоління пов’язано з використанням водоростей, які можна вирощувати навіть у стічних водах і які мають природний вміст олії понад 50 %. Водорості вважають дешевою, високоенергетичною відновлювальною сировиною, яка не потребує використання земельних ресурсів та спеціально підготовленої води. Досить високі капіталовкладення обмежують розвиток технологій біопалива з водоростей (Maliha et al., 2023).

Біопаливо четвертого покоління наразі виробляється в експериментальних умовах з біомаси, яка поглинула вуглекислий газ під час свого зростання. Процес виробництва біопалива четвертого покоління пов'язаний зі спалюванням кисневого палива (Rastegari et al., 2019). Вуглекислий газ можна зберігати на старих нафтових і газових родовищах або соляних водоносних горизонтах. Біопаливо четвертого покоління виробляється з використанням неорних земель і не потребує розщеплення біомаси. Це так зване фотобіологічне сонячне паливо. Технологія біопалива четвертого покоління робить тільки перші кроки, тому потребує значних капіталовкладень і значних обсягів досліджень, які мають зробити його альтернативним варіантом біопалива в довгостроковій перспективі.

Лігноцелюлозна біомаса, мабуть, найважливіша сировина для біопалива другого покоління, широко доступна в природі. Відходи сільського, лісового, комунального господарства є основним джерелом лігноцелюлозної біомаси (Mujtaba et al., 2023), а використання їх як сировини для виробництва хімічних речовин є ідеальним способом досягнення замкненої вуглецевої економіки. Однак дві основні проблеми перешкоджають цьому багатообіцяючому підходу. Завдяки гідролізу біомаси, який вивільняє потенційно інгібуючі речовини та утворює цукрову суміш, спільне використання пентоз/гексоз і толерантність до інгібіторів є двома ключовими моментами для ефективного бродіння гідролізатів біомаси (Nandal et al., 2020). Група (Lynd et al., 2017) виконала роботу з використання мікробної целюлози та інноваційних технологій переробки біомаси для виробництва етанолу. Отримані методи обробки можуть зрештою бути застосовані для ферментації целюлозного бутанолу (Ou et al., 2017; Lin et al., 2023).

У гідролізатах біомаси співіснують пентози (головним чином ксилоза та арабіноза) та гексози (переважно глюкоза, фруктоза, галактоза та маноза), і досягнення ефективного спільного використання пентози/гексози було проблемою протягом тривалого часу (Nandal et al., 2020). У більшості випадків ефект репресії вуглецевого катаболіту (CCR) гарантує, що пентози (наприклад,

ксилоза) будуть спожиті лише після того, як гексози (наприклад, глюкоза) будуть використані (Kim et al., 2010). Щоб подолати цю проблему у попередніх дослідженнях розглядалося порушення генів системи (Liang et al., 2015). Нокаутували ген *glcG*, що кодує фермент II у *C. acetobutylicum*, щоб полегшити CCR, після чого споживання ксилози та арабінози значно покращилось навіть за наявності глюкози. Крім того, ще одним поширеним підходом є посилення метаболізму пентози (Xiao et al., 2011). (Yu et al., 2015) надекспресували три гени, пов'язані з використанням ксилози (*xylT, xylA* та *xylB*), і досягли одночасного споживання глюкози та ксилози в *C. tyrobutyricum*. Це дослідження продемонструвало, що CCR можна певною мірою полегшити шляхом надмірної експресії генів метаболізму ксилози. Подібним чином (Xin et al., 2014) повідомили про *Clostridium* sp. штам BOH_3 з високою здатністю використовувати ксилозу. Цей штам може одночасно використовувати глюкозу та ксилозу в ABE-ферментації. На додаток до загальноприйнятого підходу до інактивації, було продемонстровано, що синтетичні консорціуми є перспективним інструментом для спільного використання пентози/гексози (Zou et al., 2023). Цей «Y-подібний» консорціум був розроблений для ортогонального використання ксилози та глюкози з порівняльними показниками, уникаючи CCR через просторову сегрегацію. Що більш важливо, його можна легко налаштувати для адаптації до різних середовищ із будь-яким співвідношенням ксилози/глюкози.

Під час попередньої обробки біомаси завжди утворюються такі інгібітори, як фурфурол, 5-гідроксиметилфурфурол (HMF), форміат, ацетат і левулінат. Тим часом режим попередньої обробки має суттєвий вплив на тип і кількість утвореного інгібітора (Iwaki, 2013). У низьких концентраціях ці сполуки не шкідливі для штамів клостридій, але можуть інгібувати інші бактерії, такі як *E. coli* (Zhang et al., 2012). Щоб зменшити концентрацію інгібіторів у гідролізаті біомаси, були розроблені методи детоксикації, такі як розбавлення (Jonsson et al., 2013), вапнування (Zhang et al., 2018) та фільтрація через активоване вугілля (Mussatto et al., 2004). На додаток до подальшої обробки, генетична маніпуляція

вгорі також є ефективним способом подолання затримки росту певними інгібіторами. Ідентифікували чотири генетичні ознаки, які сприяють толерантності до фурфуролу у *E. coli* (Wang et al., 2013). До них належать підвищена експресія *fucO, ucpA* або *pntAB* і делеція *yqhD*. Деякі метаногенні археї можуть навіть перетворювати фурфурол у фурфуриловий спирт, який можна використовувати як спосіб детоксикації (Boopathy, 2009). Ці приклади вказують на багатообіцяюче майбутнє для досліджень вирішення проблеми інгібіторів. Більш детальну інформацію можна знайти в багатьох інших оглядах, присвячених опису виробництва бутанолу з біомаси (Birgen et al., 2019; Guo et al., 2022; Palaniswamy et al., 2023).

Синтетичний газ, що складається переважно з CO і H_2 (з низьким вмістом CO_2), є ще однією недорогою сировиною, отриманою в результаті газифікації на металургійних заводах або в промисловості аміаку і метанолу (Zhao et al., 2020). Він може природним чином використовуватися деякими видами мікробів (Dure et al., 2015). CO і CO_2 можуть бути безпосередньо використані як джерело вуглецю для виробництва ацетату ацетогенами, що містять шлях Вуда-Люнгдала, який відомий як один із шести природних шляхів фіксації CO_2 (Gong et al., 2016).

Ацетоген *C. ljungdahlii* був прийнятий як мікробна платформа для асиміляції синтез-газу (Kopke et al., 2010). Однак тенденція на зменшення попиту на еквіваленти та низька продуктивність, будуть головними проблемами для бутанольного бродіння. (Charubin et al., 2019) розробили синтетичний синтрофний консорціум C. *acetobutylicum* і *C. ljungdahlii*, який здатний повністю утилізувати відходи H_2 і CO_2. У цій системі спільного культивування *C. acetobutylicum* здійснив ABE-ферментацію з виділенням H_2 і CO_2, тоді як *C. ljungdahlii* захопив відпрацьований газ і синтезував ацетат для першого штаму. Подальша адаптація *C. ljungdahlii* дозволила отримати загальний титр алкоголю 24,4 г/л (~10 г/л бутанолу), що є найвищим зареєстрованим значенням виробництва алкоголю для продуцентів *Clostridium.* Молярний вихід спирту збільшився з 0,60 моль/моль (чистий *C. acetobutylicum*) до 0,93 моль/моль

(спільна культура). Створили (Berezin et al., 2012) ацетогенний *Clostridium* sp. штам MT1962 для ферментації синтез-газу шляхом усунення виробництва ацетату та етанолу та запровадження шляху синтезу бутанолу. Вважалося, що сконструйований штам MTButOH1365 виробляє безпрецедентну концентрацію бутанолу 22 г/л під час безперервної ферментації синтез-газу. Питання зменшення еквівалентів у дослідженні не згадувалося. Зрозуміло, що H_2, перетворений гідрогеназою, забезпечить більшу частину необхідного [H]. Коли CO окислюється до CO_2, утворений [H] певною мірою сприятиме синтезу бутанолу. Однак для отримання цього результату знадобилося більше трьох тижнів бродіння, що свідчить про необхідність подальшої оптимізації процесу для підвищення продуктивності. Навпаки, ацетоген *C. carboxidovorans* може природним чином виробляти бутанол із синтез-газу, визначено (Durre et al., 2015) послідовність геному, яка може сприяти подальшому вивченню цього штаму.

Окрім вищезгаданої сировини для виробництва бутанолу можна використовувати низку інших ресурсів. Жирні кислоти (ЖК) є сполуками з сильно відновленими атомами вуглецю. Через β-окислення ацетил-КоА може вивільнятися з ЖК без втрати вуглецю, що становить привабливий процес 100 % утримання вуглецю. Крім того, ацетил-КоА є попередником кількох важливих хімічних речовин, зокрема й бутанолу. Однак частина відновних еквівалентів, що утворюються при β-окисленні, є у формі флавінаденіндинуклеотида ($ФАДН_2$), а не НАДН. Крім того, довголанцюгові жирні кислоти зазвичай нерозчинні й часто токсичні, що є ще однією проблемою, яка перешкоджає поширенню використання ЖК. Досягли виробництва бутанолу з ЖК у 2010 році (Dellomonaco et al., 2010). Автори розробили респіроферментативний метаболізм, у якому пов’язані β-окислення та подальше виробництво біопалива. Отриманий штам *E. coli,* зі сконструйованим регулоном і опероном, виробляв 2,05 г/л бутанолу з пальмітинової кислоти, розчиненої у співрозчиннику. Однак вихід бутанолу становив лише 0,18 г/г через недостатню кількість НАДН. Проте це дослідження продемонструвало можливість перетворення ЖК в бутанол та інші продукти.

Біомаса мікроводоростей є сировиною третього покоління і є перспективним субстратом для виробництва хімічних речовин, особливо біодизеля. Подібно до лігноцелюлозної біомаси, вуглеводи, отримані з мікроводоростей, також можна використовувати для виробництва бутанолу. Екстракція ліпідів і детоксикація необхідні при використанні кислотного гідролізу для отримання легкоферментованих вуглеводів. Досліджували АВЕ-ферментацію з використанням вуглеводів, отриманих із мікроводоростей. Після екстракції біомаси водоростей гексаном і детоксикації гідролізату штам *C. saccharobutylicum* міг продукувати 8,05 г/л бутанолу з виходом 0,25 г/г (Gao et al., 2016). Крім того, пряма АБЕ-ферментація екстрагованої гексаном біомаси водоростей сприяла утворенню 6,63 г/л бутанолу. (Cheng et al., 2015) повідомили про виробництво бутанолу із залишків біодизеля на основі мікроводоростей. Залишки мікроводоростей перед бродінням також необхідно гідролізувати до суспензії. Використовуючи *C. acetobutylicum* як штам для ферментації, було отримано 3,86 г/л бутанолу з виходом 0,13 г/г вуглеводів. Хоча титри бутанолу в двох перерахованих прикладах були відносно низькими, вони є перспективними для майбутніх досліджень використання мікроводоростей.

Порівняно з виробництвом бутанолу з біомаси або вуглеводів, отриманих із мікроводоростей, які були отримані з CO_2 за допомогою фотосинтезу, виробництво бутанолу безпосередньо з CO_2 є більш інтегрованим процесом. CO_2 — це газ, який активно виділяється під час протікання різних процесів, що спричиняє парниковий ефект. Останнім часом у багатьох дослідженнях використовували CO_2 як джерело вуглецю (Gong et al., 2016). Рослини та деякі фотосинтезуючі бактерії є природними утилізаторами CO_2, які використовують сонячне світло як джерело енергії. Ціанобактеріям приділяють все більшу увагу через їхню ефективну здатність фіксувати карбон (Knoot et al., 2018; Luan et al., 2018). Вперше досягли автотрофного виробництва бутанолу (Lan et al., 2011) та ввели кофермент А (КоА)-залежний бутаноловий шлях у *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Подальше впровадження толерантної до кисню КоА-ацилюючої альдегіддегідрогенази сприяло більш ефективному фотосинтетичному

біосинтезу бутанолу в ціанобактеріях. Титр бутанолу досягав 404 мг/л, що досить обнадійливо (Lan et al., 2013). Зовсім недавно досягли значного покращення у виробництві ціанобактеріального бутанолу. Після створення модульного шляху синтезу бутанолу найкращий продуцент *Synechocystis* sp. PC 6830 виробляв 836 мг/л бутанолу. Тривале культивування на основі живлення $NaHCO_3$ дозволило виробити 4,8 г/л бутанолу за 28 днів (Liu et al., 2019). Ці приклади демонструють багатообіцяючі перспективи виробництва бутанолу безпосередньо з CO_2.

Одним з основних завдань біотехнологічних досліджень стосовно енергетики є створення економічно ефективної схеми виробництва біопалива (Hasan et al., 2023). Окрім продуктивності штаму-продуценту важливу роль у собівартості кінцевого продукту відіграє і компонент ензиматичного середовища – субстрат (Ambaye et al., 2021). На собівартість цільового продукту впливає не тільки природа штаму і склад та вартість субстрату, важливим є також попередня підготовка та концентрація субстрату (Tigunova et al., 2013).

Ацетон-бутанол-етанольне бродіння (АБЕ) – хімічний процес розкладання вуглеводів ацетонобутиловими бактеріями і проходить анаеробно (без доступу кисню) з утворенням ацетону, бутилового та етилового спиртів, а також оцтової, масляної кислот та газів бродіння – водню та вуглекислого газу. Процес ацетонобутилового бродіння пов'язаний з перетвореннями (окисленням) органічних молекул субстрату, у результаті яких вивільнюється частина енергії та відбувається її накопичення в молекулах аденозинтрифосфата (АТФ) за рахунок субстратного фосфорилювання (Quintero-Diaz et al., 2023). У процесі бродіння, як правило, відбувається розщеплення вуглецевого кістяка молекули субстрату (Tigunova et al., 2013) і з'являються продукти бродіння – різні органічні кислоти (молочна, масляна, оцтова, мурашина), розчинники (етанол, бутанол, пропанол, ацетон), а також гази (вуглекислий газ та водень) (Dziemianowicz, et al, 2024). У процесі бродіння можна назвати два етапи – окислювальний і відновлювальний (Lin et al., 2023). Процес окислення заснований на відщепленні електронів у певних метаболітів за допомогою ферментів (дегідрогеназ) та

акцептування електронів іншими молекулами (окислення анаеробного типу) (Foulquier et al., 2022). Енергія, що вивільняється в ході цього процесу, запасається у вигляді АТФ. Другий процес – відновний, при якому проміжне з'єднання, що утворилося, відновлюється за рахунок переносу на нього електронів і протонів з тимчасового переносника. Відновлені органічні сполуки виділяються мікроорганізмами у зовнішнє середовище. Ацетонобутилове бродіння здійснюється мікроорганізмами, що належать до родів *Clostridium*, *Butyrvibrio*, *Butyribacterium*, *Sarcina*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* та *Megasphera* (Hristoskova et al., 2018). Рід *Clostridium* відноситься до сімейства *Bacillaceae*, як і інші представники цього сімейства (*Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum* та *Sporosarcina*). Клостридії грампозитивні, спороутворюючі бактерії, їх розміри варіюються в середньому від 2-3 до 7-8 мкм завдовжки і 0,5-1 мкм завширшки. Серед спороутворюючих анаеробів зустрічаються і гіганти – вегетативні клітини, що досягають 15-30 мкм завдовжки і 1,5-2,5 мкм завширшки. Вони дуже рухливі через перитрихально розташовані джгутики. Вегетативні клітини паличкоподібні, проте, форма їх може змінюватись в залежності від умов середовища. Овальні або кулясті ендоспори змінюють форму паличкоподібної материнської клітини, тому що їх діаметр, як правило, більший за ширину цієї клітини (Tigunova et al., 2022).

Фізіологічно клостридії відрізняються явно вираженим бродильним типом метаболізму, а також чутливістю до кисню – зростають лише в анаеробних умовах. Однак існують і перехідні форми від суворо анаеробних видів (*C. pasteurianum, C. kluyveri*) до майже аеротолерантних (*C. histolyticum*, C. *acetobutylicum*). Клостридії, як правило, не містять гемопротеїнів (цитохромів та каталази). Деякі види здатні утворювати цитохроми, якщо в живильному середовищі містяться їх попередники. Із запасаючих речовин поширені крохмалоподібні полісахариди (Xin et al., 2018).

Температурний оптимум зростання більшості відомих видів *Clostridium* лежить між 30 і 40 °С. Поряд із цими мезофільними мікроорганізмами зустрічається багато термофільних видів з оптимумом 60-75 °С

(*C. thermoaceticum* і *C. thermohydrosulfuricum*). Вони здатні зростати, як правило, у нейтральному чи лужному середовищі, а при підкисленні їх ріст практично повністю зупиняється (Sapireddy et al., 2021; Therien et al., 2017).

Клостридії різняться між собою стосовно субстратів, які можуть зброджувати (Cai et al., 2021). Одні види мікроорганізмів можуть зброджувати широке коло різних субстратів, інші – вузько спеціалізовані та здатні зброджувати лише один або кілька видів сировини (рис. 1.1).

Клостридії здатні конвертувати полісахариди (крохмаль, глікоген, целюлозу, геміцелюлози, пектини), органічні кислоти, білки, амінокислоти, гетероциклічні сполуки (Cao et al., 2021). Ряд мікроорганізмів використовують складні живильні середовища та/або ростові речовини, а інші – молекулярний азот, як єдине джерело (Du et al., 2020). За здатністю зброджувати різні субстрати мікроорганізми можна поділити на цукролітичні та пептолітичні. Цукролітичні клостридії розщеплюють переважно моно- або полісахариди, а пептолітичні клостридії розщеплюють білки та амінокислоти (Gonzales-Garcia et al., 2017). Маслянокисле бродіння здійснюють переважно мікроорганізми анаероби *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. lactoacetophilum* (Hasan et al., 2020). Їх основні продукти бродіння масляна та оцтова кислоти.

Оцтовокисле бродіння вуглеводів спостерігається у *C. aceticum* та *C. thermoaceticum* (Drake et al., 2006). Пропіоновокисле бродіння властиве *C. propionicum* з утворенням основних продуктів пропіонової та оцтової кислоти та вуглекислого газу (Benito-Vaquerizo et ql., 2020). Найбільш активні пектинолітичні види – *C. felsineum*, *C. laniganii*, *C. pectinolyticum*, *C. virens*, *C. pectinovorum* та інші пігментовані та непігментовані клостридії та плектридії (Brunt et al., 2020).

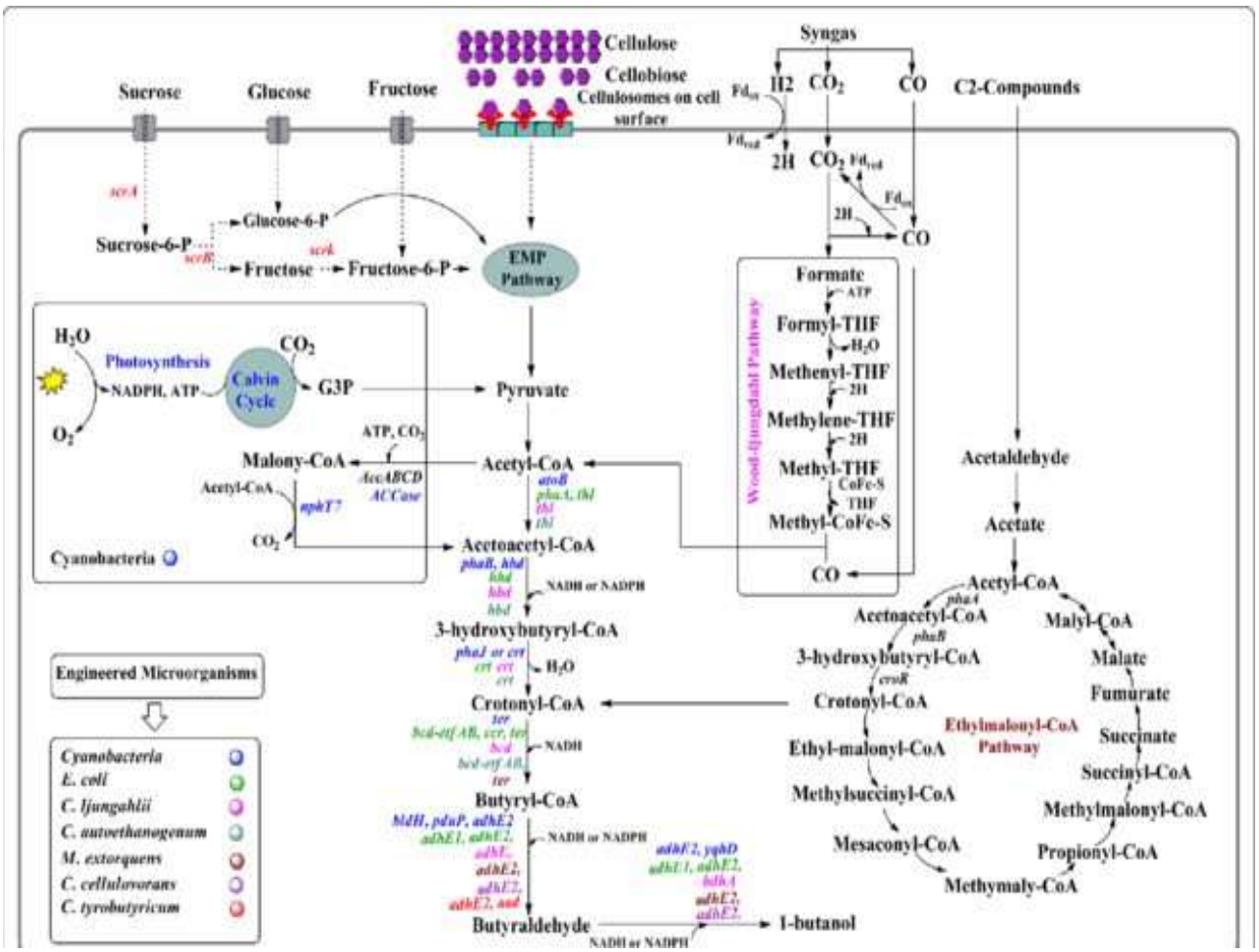


Рис. 1.1 Схематичне зображення утворення 1-бутанолу у різних видів мікроорганізмів з різноманітних субстратів (Wang et al., 2020)

Кожному виду властиві свої специфічні деталі обміну речовин, але їх загальною властивістю є здатність розкладати пектинові речовини з утворенням органічних кислот, розчинників і газів. Ряд мікроорганізмів мають дуже стійкі пектинолітичні властивості і виділяють пектинолітичні ферменти на середовищах без пектинових речовин. Для інших анаеробів (наприклад, *C. multifermentans*) синтез ферментів відбувається тільки при додаванні до середовища пектинів (індукований синтез ферментів) (Thomas, 2020). Пектинолітичні анаероби здійснюють зброджування цукрів за маслянокислим або ацетонобутиловим типом. Існує група високо спеціалізованих анаеробних спороутворюючих бактерій, що отримує енергію за рахунок зброджування целюлози з кінцевими продуктами бродіння оцтової, пропіонової, масляної та

молочної кислот, етиловим спиртом, воднем і вуглекислим газом і проміжним продуктом – глюкозою. Для таких бактерій при додаванні в живильне середовище глюкози або сахарози процес бродіння практично відсутній (цукри не засвоюються), а при одночасному внесенні глюкози та клітковини зброджується в основному клітковина. Це свідчить про високу спеціалізацію целюлозорозкладаючих мікроорганізмів.

Целюлозолітичні бактерії відрізняються як фізіологічними, так й морфологічними особливостями. Більшість целюлозолітичних спороутворюючих анаеробів мають вигляд тонких довгих паличок, що утворюють спори за плектридіальним типом. Зазвичай вегетативні клітини перебувають у адсорбованому стані на волокнах целюлози. Можливо, це пов'язано з тим, що ферменти, що гідролізують клітковину (целюлази) у середовище не виділяються, а прикріплені до поверхні клітин. Спороутворюючі клітини зазвичай знаходяться в розчині, і при спороутворенні змінюється характер їхнього зв'язку з середовищем, а спороутворення йде за рахунок ендогенного метаболізму (за рахунок внутрішньоклітинних запасів поживних речовин). Виділено кілька спеціалізованих видів анаеробних бактерій, які використовують органічні кислоти та розчинники як джерело вуглецю та енергії (Tirumalai, 2022).

Мікроорганізми *C. kluyveri*, як правило, отримують енергію за рахунок сполученого окислення-відновлення системи етиловий спирт – оцтова кислота і, в результаті, утворюються вищі жирні кислоти (в основному капронова та масляна). Не всі бактерії *C. kluyveri* здатні зброджувати вуглеводи, амінокислоти та пурини. Накопичення енергії через АТФ у таких анаеробів відбувається через механізм окисного фосфорилювання (Gupta et al., 2021).

Існують три види бактерій (*C. acidiurici*, *C. cylindrosporum* та *C. uracilicum*), що зброджують гетероциклічні сполуки. Вони здатні руйнувати гетероцикли з утворенням оцтової кислоти, вуглекислого газу та аміаку. Перші два види бактерій не здатні використовувати вуглеводи та білки (амінокислоти). Ці бактерії відносно швидко розщеплюють ксантин, гуанін, гуанозин, 6,8-

діоксипурин та порівняно повільно (і то після адаптації) – гіпоксантин та інозин (Wery et al., 2002).

Специфічність щодо субстратів у спороутворюючих анаеробів різко виражена. Деякі протеолітичні анаероби (наприклад, *C. sporogens*) не задовольняються середовищами, які містять набір амінокислот, вуглеводів, мінеральних солей, комплекс вітамінів і активатори мікробного росту. Такі виражені гетеротрофи ростуть лише на середовищах, що містять білки або продукти їхнього часткового гідролізу. Однак, існують анаероби (сульфаторедукуючі бактерії), що зброджують прості середовища, до складу яких входить кілька мінеральних солей (у тому числі сульфати) і органічна кислота (може засвоюватися і атмосферний азот).

Здатність фіксувати молекулярний азот поширена серед спороносних бактерій. Такий процес можуть здійснювати маслянокислі, ацетонобутилові та сульфаторедукуючі бактерії. Найбільш активні азотфіксатори – сахаролітичні анаероби (клостридії). Ставлення до кисню у різних фізіологічних груп спороутворюючих анаеробів не однакове. Більш стійкими до дії кисню є цукролітичні анаероби. Частина представників цієї групи – аеротолерантні форми *C. carnis*, *C. histolyticum*, здатні виявляти слабке зростання на платівках агару навіть в аеробних умовах. Чутливі до кисню і важко культивуються сульфатредукуючі бактерії. Їх зростання можливе лише в анаеробних умовах без кисню в середовищі культивування (Malleck et al., 2022).

В процесі АБЕ-ферментації вартість субстрату є одним із ключових факторів. На рис. 1.2 показано метаболічні шляхи АВЕ-ферментації клостридіями різних субстратів (*E1* – піруватферодоксиноксидоредуктаза*; E2* – тіолаза*; E3* – фосфатацетилтрансфераза*; E4* – ацетаткіназа*; E5* – ацетальдегіддегідрогеназа*; E6* – етанолдегідрогеназа*; E 7*– КоА трансфераза*; E8* – ацетоацетатдекарбоксилаза*; E9* – 3-гідроксибутирил-КоА дегідрогеназа*; E10* – кротоназа; *E11* – бутирил КоА-дегідрогеназа*; E12* – фосфат бутирилтрансфераза; *E13* – бутираткіназа*; E14* – бутиральдегіддегідрогеназа*; E15* – бутанолдегідрогеназа).

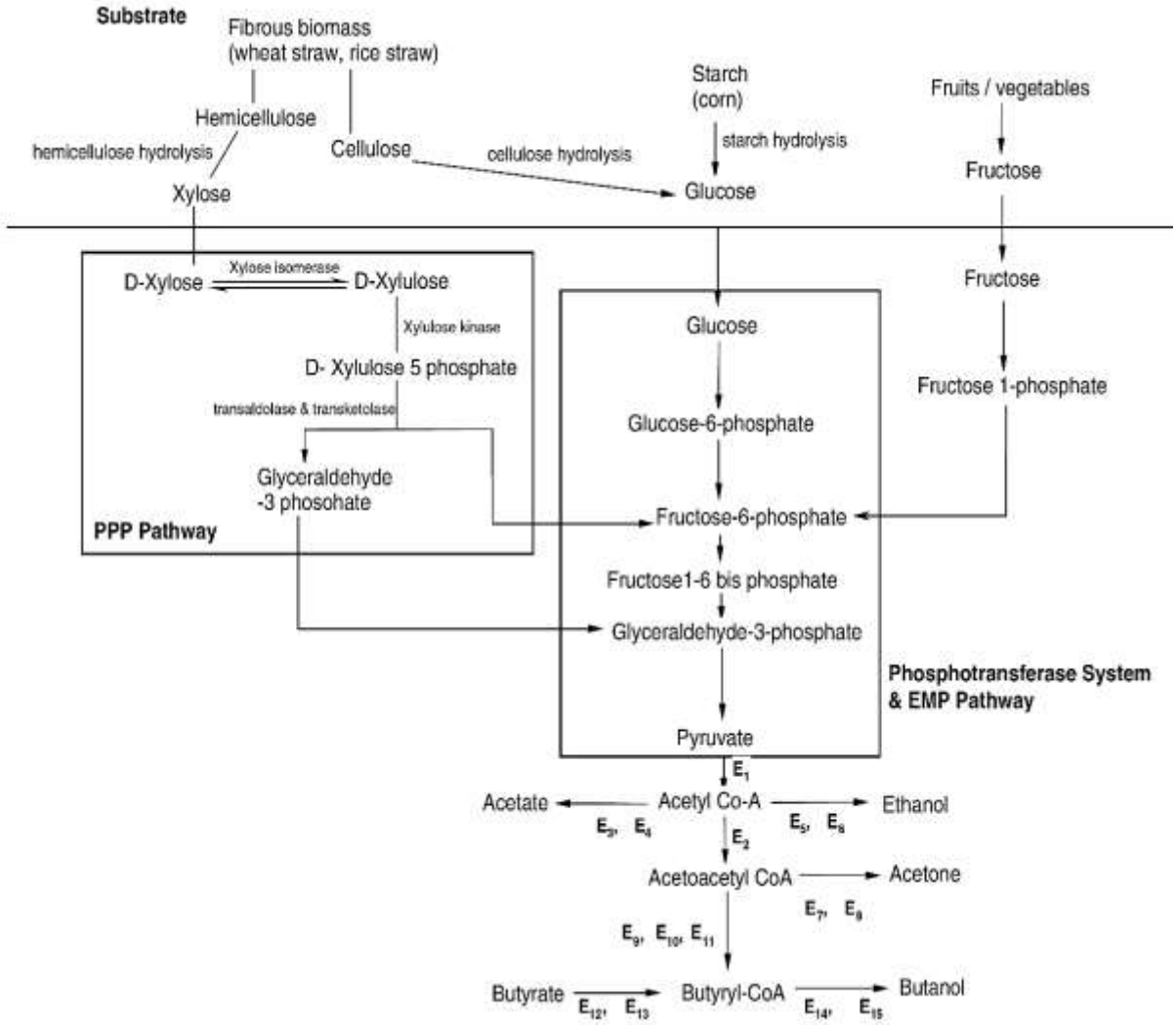


Рис. 1.2 Метаболічний шлях АВЕ-ферментації різних субстратів клостридіями (Ranjan et al., 2012)

Донедавна в АБЕ-процесі використовували переважно крохмалевмісні (кукурудза, картопля, пшениця, маніока тощо) або цукромісткі (цукрова тростина, буряк, різні меласи) субстрати. Можливість сахаролітичних клостридій зброджувати різні вуглеводи, зокрема моно- і дицукри, ксилозу та целобіозу, та полімери, наприклад, крохмаль та ксилан (Apiwatanapiwat et al., 2018), стимулювала пошуки альтернативних, більш дешевих субстратів (Zhou et al., 2023). Такими субстратами, надалі, виступають лігноцелюлозні та інші види сировини. Цілком зрозуміло, що економічно доцільно використовувати для отримання біопалива дешеву та відновлювану сировину (Mignogna et al., 2024),

наприклад, рослинну біомасу (деревні відходи, солому та інші види нехарчової рослинної сировини). Інформація стосовно регуляторних шляхів, що визначають форму і розмір клітинних стінок, дає можливість отримати рослини з поліпшеними характеристиками для виробництва біопалива (Sirangelo et al., 2023).

1.2 Метаболічна інженерія солвентогених клостридій

Об’єм виробництва біопалива наразі становить лише 2 % від усіх видів палива, які використовуються. За прогнозами об’єм використання біопалива на ринку пального до 2035 сягне 30 % (Panoutsou et al., 2021). Лише чотири види мікроорганізмів – *C. saccaroperbutylacetonicum, C. acetobutylicum, C. saccharoacetobutylicum і C. beijerinckii* – виявляють значну активність щодо синтезу бутанолу за відповідних умов (Feldmane et al., 2024). Серед них *C. acetobutylicum* – основна модель для АБЕ-ферментації, тоді як *C. beijerinckii* вважається потенційним кандидатом для АБЕ-ферментації з використанням лігноцелюлозної біомаси (Palaniswamy et al., 2023). Як альтернативу, в майбутньому можна використати для синтезу бутанолу декілька добре охарактеризованих мікроорганізмів (*E. coli* (Atsumi et al., 2008), *S. cerevisiae* (Steen et al., 2008), *Pseudomonas putida* (Nielsen et al., 2009) і *Bacillus subtilis* (Nawab et al., 2020)), які останнім часом привертають все більшу увагу. Порівняно з нативними мікроорганізмами, що виробляють бутанол, ці добре вивчені мікроорганізми мають швидкі темпи росту, охарактеризоване генетичне походження та чітко встановлені системи генетичних маніпуляцій і пов’язані з більш економічно вигідними процесами промислового виробництва (Jimenez-Bonilla et al., 2024; Su et al., 2024). Варто зауважити, деякі розроблені штами мають вищий вихід бутанолу та менше побічних продуктів, ніж клостридії, і, таким чином, є потенціальними продуцентами для виробництва бутанолу (Tapias et al., 2024).

На основі інформації про геном може бути побудовано метаболічну геномну

модель. Ця модель має пройти процес перевірки шляхом порівняння теоретичних даних та отриманих від реальної ферментації. Стратегію розвитку інтегрованого процесу отримання біопалива представлено на рис. 1.3.

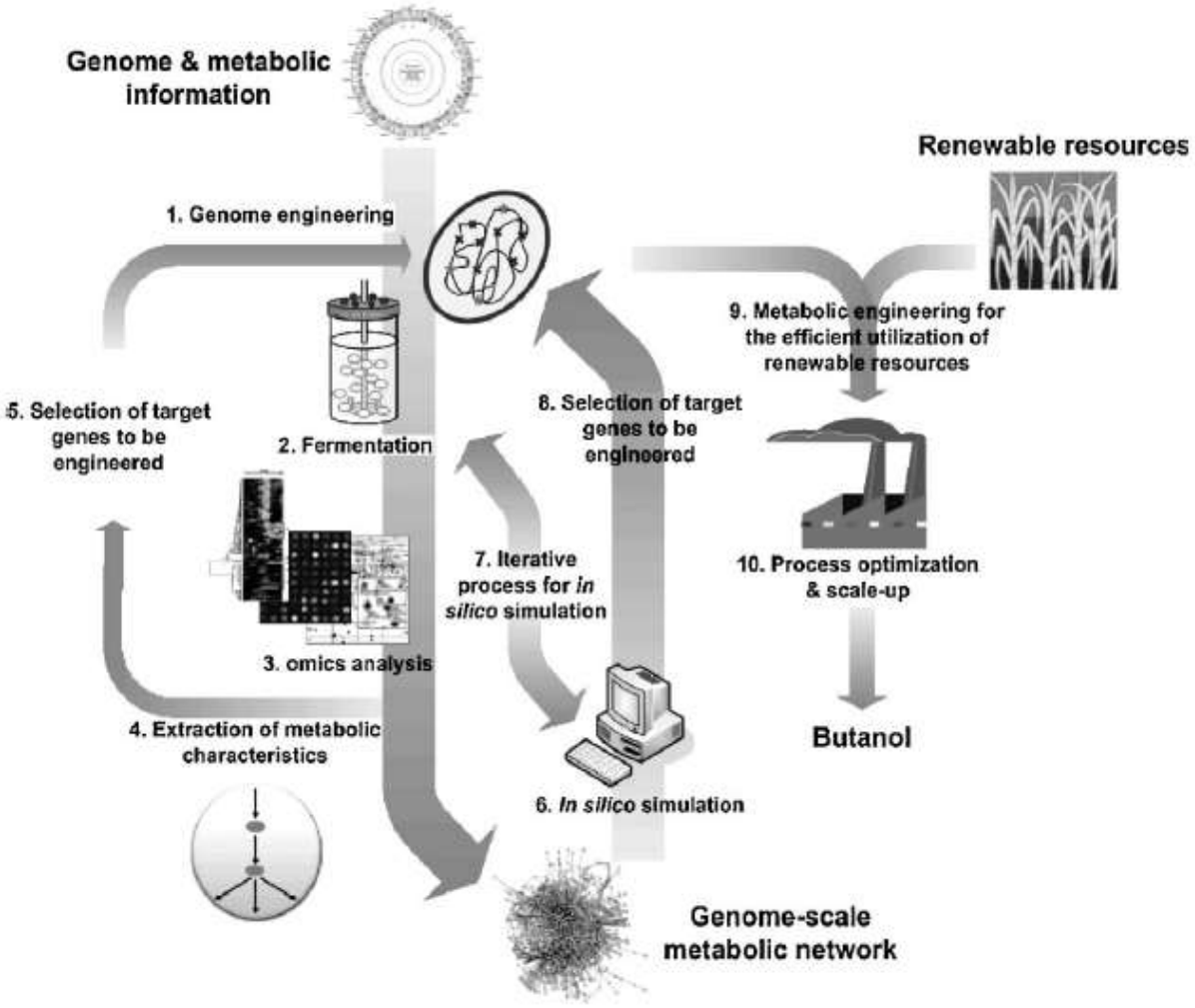


Рис. 1.3 Стратегія розвитку інтегрованого біопроцесу отримання біопалива (Lee et al., 2008)

Для виявлення генів-мішеней та шляхів для маніпуляції з ними, крім генетичного аналізу необхідно вивчити транскриптомне та протеомне профілювання штамів у різних генотипічних та екологічних умовах. Інтеграція всіх цих результатів може спричинити створення штаму з підвищеним виходом бутанолу. Дослідження останніх років пов’язані з пошуком нових надпродуктивних штамів-продуцентів бутанолу та дешевої нехарчової сировини як субстрату (Tigunova et al., 2017) й оптимізації біотехнології бутанолу. Можна

умовно виділити такі етапи оптимізації біотехнології бутанолу:

1 етап – первинна селекція штамів-продуцентів;

2 етап – визначення оптимальних технологічних параметрів (pH, температури, потреби в поживних речовинах) і оптимального режиму живлення та накопичення біомаси, виходу продукту у перерахунку на спожитий субстрат, швидкість утворення продукту;

3 етап – іммобілізація клітин-продуцентів;

4 етап – зміни генетичної структури мікроорганізму для збільшення накопичення бутанолу.

Генетичні маніпуляції з клостридіями стали можливими завдяки визначенню нуклеотидної послідовності (розшифрування) повного геному продуценту *C. acetobutylicum* ATCC 824. Було визначено, що геном *C. acetobutylicum* ATCC 824 складався з 3778 генів, хромосома – з 3940880 bp, а мегаплазміда pSOL1 – з 192000 bp, містить основні гени, які відповідають за спиртоутворення та кодують 178 поліпептидів (Tigunova et al., 2019). Саме ці гени та гени, які кодують мультиферментний комплекс, який розташований на поверхні клітини (целюлосома) є унікальним метаболічним профілем клостридій (Nolling et al., 2001). Вони демонструють роль горизонтального перенесення генів в еволюційному розвитку цих бактерій та обумовлюють шлях синтезу метаболітів (рис. 1.4).

Необхідність у масовому якісному та швидкому секвенуванні геному стимулювала появу численних модифікацій методів визначення послідовності нуклеотидів ДНК (Ren et al., 2021; Potschka et al., 2021). Розробка та впровадження полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР), а також автоматизація основних етапів «зчитування» ДНК спонукали до розвитку методу секвенування нового покоління (next-generation sequencing, СНП). Головною перевагою СНП є можливість багаторазового «прочитання» кожної молекули ДНК, що суттєво підвищує точність ідентифікації генетичних змін (Illumina, 2023).

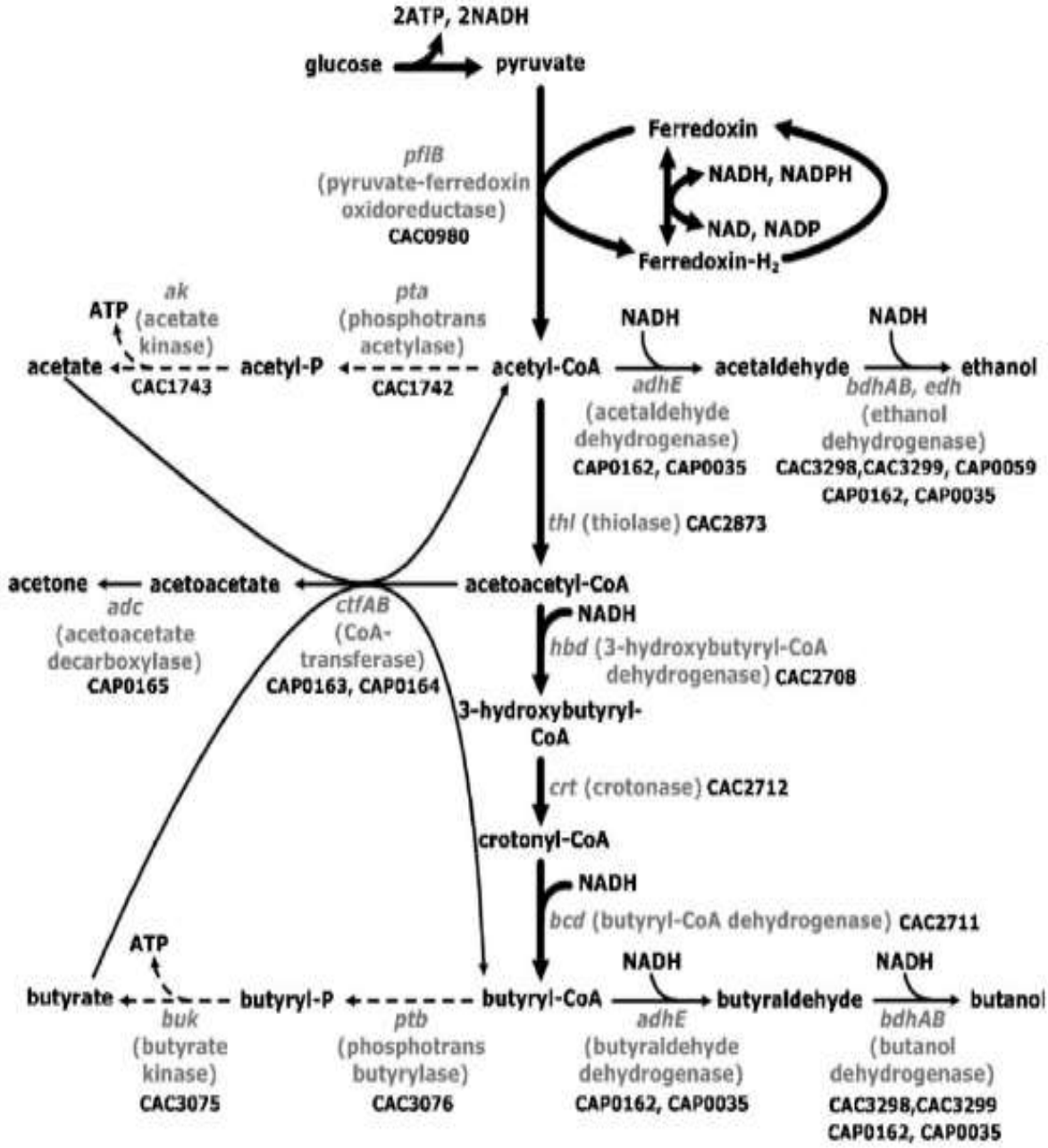


Рис. 1.4 Метаболічний шлях *C. acetobutylicum* (Lee et al., 2008)

Разом з тим, цей метод дозволяє за один запуск приладу зібрати декілька геномів мікроорганізмів у випадку виділення їх ДНК з чистих культур, а також визначити видовий склад мікробіоти окремого біотопу (Landlinger et al., 2010). Процес секвенування на платформах СНП складається з декількох етапів. На першому етапі здійснюють процес підготовки «бібліотеки» ДНК, який включає фрагментування ДНК за допомогою ферментів або ультразвуку з подальшим приєднанням до цих фрагментів універсальних олігонуклеотидних адаптерів

відомої послідовності та індексів за допомогою лігування.

Адаптери необхідні для подальшої ампліфікації фрагментів. Другий етап полягає у проведенні ампліфікації кожного фрагмента ДНК методом ПЛР (Millon et al., 2013). Фрагмент ДНК за допомогою послідовності адаптера гібридизується з одним або двома праймерами, які іммобілізовані на твердій поверхні (мікрокулька або скляна комірка) та беруть участь у ПЛР. На третьому етапі через комірку пропускається реакційна суміш, що містить набір реагентів для секвенування (Kumar et al., 2019). Відбувається автоматичне покрокове зчитування нуклеотидів з кінців фрагментів і визначення їхньої послідовності.

Сьогодні у світі представлено платформи секвенування другого покоління (СДП) різних виробників, які використовують наступні технологічні підходи: секвенування шляхом синтезу (Sequencing by Synthesis) – Illumina, BGIseq, IonTorrent, 454 і секвенування шляхом лігування (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) – ABI SOLID. Останнім часом домінували платформи секвенування другого покоління, які характеризуються низькою вартістю, високою продуктивністю і короткими довжинами послідовностей читання (Illumina, 2023).

Найбільш детально АБЕ-процес розглянуто в роботі (Tigunova et al., 2013). Гени, які відповідають за АБЕ-процес у *C. acetobutylicum* ATCC 824 можуть входити або не входити до складу певних груп (кластерів). В утворенні ацетату беруть участь два ензими – ацетаткіназа (*ak*) та фосфотрансацетилаза (*pta*), гени яких входять до складу ацетатного оперону (Boynton et al., 1996). Із синтезом бутирату пов’язані бутираткіназа (*butK*) та фосфотрансбутирилаза (*ptb*), які входять до складу бутиратного оперону. Обидва набори цих генів співіснують у тандемі на хромосомі та формують оперони, в яких *ptb* розташований у 5’-напрямі від *butK*, а *pta* – від *ak*.

У перетворені КоА бере участь ензим тіолаза (*thl*), ген якої не входить до складу функціональних одиниць організацій генетичного матеріалу, в яких декілька оперонів. Основні гени, які відповідають за перетворення 3-гідроксибутирил-КоА до бутирил-КоА складають оперон бутирил-КоА синтезу

(BCS), а саме кротоназа (*crt*), бутирил-КоА дегідрогеназа (*bcd*), гени двох субодиниці флавопротеїну транспорту електронів (*etfA,B*), ß-гідроксибутирил-КоА дегідрогеназа (ß*hbd*) (Boynton et al., 1996). Гени, які відповідають за утворення бутанолдегідрогенази (*bdhAB*) не входять до складу кластерів. Гени ацетальдегіддегідрогенази (*aad*), ацетил-КоА:ацетат/бутират:КоА трансферази (*ctfAB*), ацетонацетатдекарбоксилази (*adc*) складають оперон солвентогенезу (*sol*), який міститься на мегаплазміді pSOL1 (Nair et al., 1999). Гени ферментів основного метаболізму, такі як гідрогеназа (*hydA*), флаводоксин (*flav*), рубредоксин (*rub*), транскрипційний фактор, який відповідає за активацію споруляції (*Spo0A*), взагалі не належать до кластерів (Cornillot et al., 1997). Слід відмітити, що залежно від виду та штаму бактерій роду *Clostridium* кількість генів та їх розташування у кластерах може змінюватися (Cruz-Morales et al., 2019). Таким чином, селективне використання позитивного ефекту *Spo0A* на утворення продуктів АБЕ ферментації є необхідним для підвищення продуктивності. Для цього необхідно щоб *Spo0A* функціонував як ген активації солвентогенезу без функції активації споруляції (Humphreys et al., 2023).

Як правило, різні види клостридій мають подібні метаболічні шляхи для АБЕ-ферментації, які можна розділити на три різні фази росту (фаза ацидогенезу, фаза солвентогенезу та фаза спорогенезу) і утворюють три основні види продуктів:

1) солвенти (ацетон, етанол і бутанол);

2) органічні кислоти (оцтова кислота і масляна кислота);

3) гази (вуглекислий газ і гідроген) (Tigunova et al., 2013).

Під час експоненціального росту починається фаза ацидогенезу, яка супроводжується змінами внутрішньоклітинного мікрооточення через накопичення ацетату і бутирату. Як результат утворюється надлишок АТФ в максимально можливому обсязі за анаеробних умов, але баланс між утворенням і використанням відновних еквівалентів [зменшено/окислений співвідношення НАД(Ф)Н/НАД(Ф)$^+$] є безумовно необхідним для нереспіраторного метаболізму (Lütke-Eversloh et al., 2011). На завершальному етапі фази ацидогенезу

відбувається підкислення середовища (pH 4,5) і більш високі рівні АТФ і НАД(Ф)Н/НАД(Ф)$^+$ стають основними стресовими сигналами для активації синтезу солвентогенних ензимів, які швидко змінюють метаболічну активність фази ацидогенезу до фази солвентогенезу (Jiang et al., 2009). Згодом, активація генної схеми може бути спричинена різними речовинами, такими як бутирилфосфат (Zhao et al., 2005), мурашина кислота (Wang et al., 2011) та іншими факторами навколишнього середовища (Kumar et al., 2013), які потім змінюють клітинну діяльність з виробництва продуктів АБЕ ферментації (Peabody et al., 2016). Як наслідок, ацетат і бутират повторно засвоюються з утворенням похідних ферменту А (КоА) (ацетил-КоА і бутирил-КоА), використовуючи ацетоацетил-КоА як донор КоА, і етанол, і бутанол виробляються різними дегідрогеназами (Grimmler et al., 2016) в умовах обмеження відновних еквівалентів.

Після входу в стаціонарну фазу клітини синтезують гранулозу як внутрішньоклітинну складову сполуку, надалі разом із цим ініціюється процес спороутворення і припиняється утворення продуктів АБЕ ферментації (Jones et al., 1982). З точки зору промислового застосування, споруляція є внутрішнім недоліком клостридій, продуцент без спороутворення може бути більш ефективним для АБЕ бродіння. Уникнення спороношення без припинення утворення продуктів АБЕ ферментації сприяло б продуктивності специфічних клітин і спрощенню біообробки. Однак, процес утворення спор — це ретельно організований каскад подій як на транскрипційному, так і на посттрансляційному рівнях за участю багатьох сигма-факторів, факторів транскрипції, протеаз і фосфатаз. Механізм процесу спороутворення на молекулярному рівні ще не повністю зрозумілий (Alsaker et al., 2005; Hocq et al., 2019). Що стосується солвентогенних клостридій, секвеновані геноми *Clostridium* містять гени для всіх основних специфічних етапів для споруляції, транскрипцій і сигма-факторів (*spo0A, sigH, sigF, sigE, sigG* і *sigK*), які беруть участь у споруляції (Al-Hinai et al., 2014, 2015). На жаль, досі не зрозуміло, як специфічні для споруляції фактори впливають на утворення продуктів АБЕ

ферментації (Jones et al., 2011) і чому деякі аспорогенні мутанти не здатні синтезувати солвенти (Papoutsakis, 2008). З оприлюдненням геномних даних для кількох солвентогенних клостридій, зокрема *C. saccharobutylicum* NCP262 (Poehlein et al., 2013), *C. beijerinckii* (Wu et al., 2012), *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Lee et al., 2008; Ehsaan et al., 2016; Poehlein et al., 2017), *C. acetobutylicum* DSM 1731 (Bao et al., 2011) і *C. acetobutylicum* EA2018 (Hu et al., 2011), метаболічний шлях для виробництв бутанолу всебічно з'ясовано і опосередковується він КоА (Jin et al., 2011; Lei et al., 2012).

Клостридії можуть поглинати широкий спектр цукрів гексози, пентози та олігомери через фосфоенолпіруватзалежну фосфотрансферазну систему (PTS) та/або не-PTS транспортні системи (Lee et al., 2001, 2005). Згодом гексози та пентози, спочатку через пентозофосфатний шлях (PPP), розкладаються до пірувату через шлях Ембден – Мейєрхоф – Парнас (EMP) з продукуванням АТФ і НАДН (Yang et al., 2015; Ma et al., 1997). Надалі, ацетил-КоА і бутирил-КоА є ключовими проміжними продуктами перетворюються в окислені продукти (наприклад, ацетон, ацетат або CO_2) або відновлені продукти (наприклад, бутанол, етанол або бутират) через шість ключових ферментів (тіолазу, 3-гідроксибутирил-КоА-дегідрогеназу, кротоназу, бутирил-КоА-дегідрогеназу, бутиральдегіддегідрогеназу та бутанолдегідрогеназа). Теоретично 1 моль глюкози можна перетворити на 1 моль бутанолу (0,41 г/г), 1 моль ацетону (0,32 г/г) або 2 молі етанолу (0,51 г/г), але фактичний АБЕ-вихід суттєво зменшується через виробництво біомаси, незасвоєння оцтової та масляної кислоти (Seedorf et al., 2008).

Синтез 1 молю бутанолу потребує 4 моль НАДН, але відновлення рівня НАДН відбувається під час фазового переходу. Це свідчить про те, що збільшене співвідношення НАДН/$НАД^+$ сприяє перерозподілу процесу синтезу і виробництва продуктів АБЕ ферментації (Berrios-Rivera et al., 2002; Vemuri et al., 2007). Таким чином, підвищення внутрішньоклітинного рівня НАДН, – наприклад, шляхом підвищення регуляції утворення НАДН або зниження регуляції шляху споживання НАДН – сприяє посиленню утворення бутанолу

(Inui et al., 2008). У клостридій три метаболічні шляхи регулюють внутрішньоклітинний потік НАДН/електронів: – НАД -фередоксинредуктаза та гідрогеназа (Verdar-Schara et al., 2008); – комплекс Bcd/EtfAB і гідрогеназа (Li et al., 2008), і – біфуркаційна гідрогеназа, що окислює НАДН і фередоксин одночасно (Cai et al., 2011). Нещодавно, після з'ясування кристалічної структури тіолази *C. acetobutylicum* (CaTHL) у відновленому/окисленому станах, CaTHL міг бути опосередкованим модуляцією окисно-відновного перемикання оборотного дисульфідного зв'язку між двома каталітичними залишки цистеїну, Cys88 і Cys378, що забезпечує метаболічні та ферментаційні стратегії для підвищення виробництва бутанолу (Kim et al., 2015).

Подібно до ефекту дозування НАДН, високий рівень АТФ не тільки ефективно спрямовує використання вуглецю для бутанолу шляхом блокування синтезу бутирату, а й покращує продуктивність клітин шляхом зниження токсичності бутанолу (Ventura et al., 2013; Herrmann et al., 2008). Однак, утворення бутанолу ефективно пригнічує АТФ, а потім знижує експресію піруваткінази і фосфогліцераткінази (Ma et al., 2015). Враховуючи вуглецевий і окисно-відновний баланси, 2 молі АТФ утворюється шляхом гліколізу, а відновлювальні еквіваленти можуть бути регенеровані в бутаноловому шляху, а потім відновлений фередоксин передає свої електрони НАД(Р)+ без утворення молекулярного водню. Таким чином, штучне збільшення накопичення АТФ (шляхом інактивації ацетатного та бутиратного шляхів) може покращити виробництво та селективність бутанолу, але розподіл енергії стає проблемою (Lan et al., 2013). Що більш важливо, економія енергії в анаеробних бактеріях досить суттєва, проте майже нічого не відомо про генетичну регуляцію енергетичного та окисно-відновного статусу клостридій. Зокрема, регуляторний механізм формування гранульозу та реутилізація, механізм регуляції, що лежить в основі переходу між ацидогенезом і солвентогенезом, а також молекулярні регуляторні перемикачі між утворенням і передачею окисно-відновних сигналів, все ще невідомі (Kihara et al., 2019).

Однією з основних проблем генної інженерії будь-яких мікроорганізмів є

підбір та розроблення векторів для перенесення генетичної інформації. Найбільш перспективними є вектори на основі плазмід – позахромосомних автономних реплекаційних двохланцюгових кільцевих молекул ДНК. Виділяють два види плазмід: автономні – не пов'язані з хромосомою бактерії (F-плазміди) та інтегровані – вбудовані в хромосому плазміди (R-плазміди). F-плазміди несуть інформацію, яка забезпечує їхнє власне кон'югативне переміщення із однієї клітини до іншої, а R-плазміди несуть гени стійкості до антибіотиків. Існують плазміди, які мають специфічний набір генів, що відповідають за утилізацію неспецифічних метаболітів (плазміди деградації) та плазміди, в яких знайдено гени з невідомими функціями. Якщо дві або більше плазмід не можуть існувати в одній клітині, то їх відносять до однієї групи несумісності. Одні плазміди несуть специфічну точку початку реплікації і можуть реплікуватися лише в клітинах певного виду, а для інших плазмід це місце ініціації реплікації менш специфічне і вони реплікуються у різноманітних бактеріальних клітинах.

Генетичні маніпуляції із клостридіями було спрямовано на зміну генів обраного штаму для підвищення накопичення бутанолу, збільшення толерантності штаму, розширення діапазону сировини (субстрату) для культивування та промислового виробництва бутанолу незмішаного з одержанням інших продуктів АБЕ ферментації (Cheng et al., 2019).

1.3 Незернова рослинна біомаса як субстрат для культивування штамів-продуцентів бутанолу

Розуміння процесів росту та розвитку рослинних клітин дозволяє створювати рослини з покращеними властивостями для виробництва біопалива. Нові знання про структуру рослин дали можливість розробки високоефективної сировини для цього процесу (Basu et al., 2008). Можливим є також отримання вже підготовленої сировини (целюлози) для зброджування, яку можна переробляти безпосередньо у біопаливо. Для цього створюють мікроорганізми, що синтезують легкоконвертовану целюлозу (Шульга та ін., 2013). Знайдено нові

види (ціанобактерії), які використовують сонячне світло як джерело енергії для виробництва полісахаридів та целюлози. Вони синтезують відносно чисту целюлозу у формі гелю, що легко розщеплюється. Важливим кроком у підготовці сировини було створення ензимів, здатних впливати на процес вироблення лігніну – ключового компоненту клітинної стінки рослин. Запропоновано модель, за якої метилування попередника лігніну може бути одним із способів інгібування синтезу лігніну, оскільки, чим менше лігніну, тим легше працювати з клітинними стінками. Необхідно зазначити дослідження з інтегрування генів мікроорганізмів у рослини (Ohmiya et al., 2003). Експресія генів ензимів, що розщеплюють целюлозу в рослинах, призводило до нестабільності клітинної оболонки під час росту рослини.

Ферментативний розпад компонентів деревини, який здійснюється в природі, як уже зазначалося, асоціаціями мікроорганізмів і протікає дуже повільно. До факторів, які уповільнюють цей процес, слід віднести: кристалічну структуру полімерів (індекс кристалічності); компактність структури полімерів, яка обмежує поверхню, що атакується ферментами; присутність лігніну (лігнін являється фізичним бар'єром для дії ферментів і відноситься до найбільш стійких компонентів деревини); полімерність субстрату (від числа мономерних сегментів залежить число актів ферментативного розщеплення). У природі зустрічаються мікроорганізми, які мають окремі каталітичні функції, а також ті, які володіють всіма основними ферментативними системами розщеплення та утілізації полімерів рослинних тканин (це, наприклад, базидіоміцети, про які вже зазначалося вище). Однак, проблему ферментативного гідролізу можна вирішити і шляхом використання ферментних препаратів геміцелюлаз та целюлаз із *Trichoderma reesei* та *Aspergillus niger*. Ступінь деструкції геміцелюлози та целюлози ферментними препаратами може досягати 80-95 %. Однак ферментні препарати досить дорогі і їх використання призводить до значного зростання вартості. Пошуки збільшення продукції целюлаз найбільш перспективними штамами грибів не принесли певних успіхів. Тому почали енергічно розвиватися дослідження з молекулярного клонування генів целюлаз.

В якості донорів генів целюлаз використовують бактерії родів *Cellvibrio, Cellulomonas, Pseudomonas, Clostridium, Rumonococcus, Tr. reesei*.

Із основних напрямків генетичної інженерії в галузі біоконверсії рослинної сировини слід виділити наступні:

1. Конструювання штамів мікроорганізмів, здатних з високою ефективністю утилізувати під час росту та ферментації основні компоненти гідролізатів деревини.

2. Конструювання штамів мікроорганізмів, що мають високу стійкість до токсичних компонентів гідролізатів деревини, а також використання цих речовин в якості джерела вуглецю.

3. Конструювання суперпродуцентів целюлаз та геміцелюлаз для прямої та непрямої біоконверсії та ферментації поліцукридів рослин.

4. Отримання, вивчення та конструювання мікроорганізмів, активних щодо деструкції лігніну та інтермедіатів його розпаду.

5. Конструювання нового покоління штамів для гідролізної та інших галузей промисловості на основі сахароміцетів.

6. Часткове або повне суміщення виробництва білку одноклітинних мікроорганізмів з масштабним виробництвом ферментів, вітамінів, пігментів, нуклеотидів, антибіотиків тощо на основі нового покоління штамів, отриманих шляхом гібридизації та молекулярного конструювання.

7. Отримання гібридів дріжджів та рослинних клітин для суміщення виробництва лікарських сполук та кормового білку.

8. Поліпшення властивостей популяції целюлолітичних мікроорганізмів, які проживають в рубці жуйних тварин та використовуються для отримання компосту, біогазу.

Що ж конкретно необхідно зробити для вирішення поставлених задач? Першим етапом будь-якої генно-інженерної роботи являється клонування необхідного гену. Так як целюлази представляють складний комплекс ферментів, то в цьому випадку необхідно клонувати гени всіх ферментів — і компонентів комплексу, що ускладнюється рядом обставин. Для досягнення

ефективного гідролізу целюлози необхідні ферменти, щонайменше, трьох типів — ендоглюканази (ЕГ), целобіогідролази (ЦБГ) та β-глюкозидази (БГ), причому найбільш ефективний гідроліз кристалічної целюлози здійснюється при синергічній взаємодії всіх цих ферментів. Більшість мікроорганізмів має по декілька ферментів кожного типу — в цілому їх загальна кількість може перевищувати 20 ферментів. Клонувати гени всіх ферментів досить важко, а відсутність чіткої картини щодо механізму ферментативного гідролізу целюлози не дає можливості визначити мінімальний набір цих ферметів, необхідних для ефективної роботи целюлозного комплексу. Крім того, ці комплекси, у різних мікрооргінізмів незбалансовані, їх необхідно відкоригувати, тобто гени, відповідальні за синтез певних ферментів комплексу, бажано отримати із різних організмів. Суттєве значення для генетичної інженерії целюлаз має вибір організма-донора для клонування генів, який визначається властивостями синтезованих цим організмом целюлазних ферментів. Найбільш жорсткі вимоги пред'являються до ферментів, які планується використати в технологічних процесах. Вони повинні володіти такими властивостями:

- високою термостабільністю (час перетворення протягом декількох діб при 60-65 ºС);
- низьким інгібуванням кінцевим продуктом реакції;
- високою питомою активністю;
- високою константою адсорбції на целюлозі.

Нині невідомий організм, здатний продукувати ідеальний комплекс. Целюлази *T. reesei* та інших грибних комплексів мають високу питому активність та здатність до адсорбції, але низьку термостабільність та сильно інгібуються кінцевими продуктами реакцій (Malgas et al., 2020).

Перші дослідження з клонування генів целюлаз були розпочаті в 1980-1981 р. і за останні 20 років досягнуто значного прогресу в цій галузі. Для клонування генів целюлаз створено банк генів ДНК відповідних мікроорганізмів. Системи відбору клонів з генами целюлаз практично у всіх випадках базувалися на їх експресії в клітинах організма-рецепієнта, тобто в клітинах проводилося

тестування целюлазної активності. Були досягнуті певні успіхи з клонування ендоглюканази *Thermomonospora* УХ; клоновано гени целюлаз із *C. fimi*, целюлазний комплекс із *C. thermocellum*, клоновано гени екстремально термофільної бактерії *Caldocellum saccharoliviticum* тощо (Wang et al., 1993).

На сьогодні Україна є одним із провідних світових виробників та експортерів продукції рослинництва, що за даними ФАО та Світового банку входить до першої десятки виробників та першої п'ятірки експортерів. Експорт продуктів рослинного походження у структурі зовнішньої торгівлі України 2019 року становив 12 914,9 млн дол. США (зростання, порівнюючи з 2018 роком 130,6 %), зокрема зернових культур 9 633,6 млн дол. США (зростання, порівнюючи з 2018 роком — 133,1 %), що становило, відповідно, 25,8 % та 19,2 % загального обсягу експорту товарів 2019 року. За даними ННЦ «Інститут аграрної економіки», 2019 року також були встановлені абсолютні рекорди за обсягами зарубіжних поставок соняшникової (6,1 млн т), соєвої (375 тис. т) та ріпакової (151 тис. т) олій. Загальна частка продукції агропромислового комплексу в товарній структурі українського експорту 2019 року склала 37,9 %, зокрема: живі тварини та продукти тваринного походження — 2,6 %, жири та олії тваринного або рослинного походження — 9,5 % (Братішко та інші, 2020).

За даними Державної служби статистики України (Братішко та інші, 2020) посівна площа під зерновими та зернобобовими культурами 2019 року становила 15 318 тис. га. Зміни за останні 30 років відбувалися в межах від 12 495 тис. га (2003 р.) до 16 210 тис. га (2013 р.). Необхідно відмітити стале зростання посівних площ соняшнику від 1 601 тис. га 1991 року до 6 117 тис. га 2018 року (2019 року — 5 928 тис. га). Загальні тенденції також свідчать про зростання як урожайності, так і обсягів виробництва (валових зборів) зернових, бобових та олійних культур.

Характер зміни обсягів виробництва та врожайності зернових, зернобобових культур і соняшнику свідчить про те, що в Україні щорічно утворюються десятки мільйонів тонн рослинної біосировини — незернової частини врожаю сільськогосподарських культур. Дані щодо обсягів виробництва

основних сільськогосподарських культур усіма категоріями виробників 2019 року (Братішко та інші, 2020) наведено в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Обсяги виробництва основних сільськогосподарських культур 2019 року (Братішко та ін., 2020)

Сільськогосподарські культури	Обсяги виробництва, тис. ц		
	Господарства всіх категорій	Сільськогоспо-дарські підприємства	Господарства населення
Зернові та зернобобові, зокрема:	751432,0	599820,8	151611,2
пшениця	283278,6	225777,9	57500,7
кукурудза на зерно	358800,5	306644,1	52156,4
ячмінь	89167,8	53685,4	35482,4
жито	3346,8	1792,9	1553,9
тритикале	424,2	424,2	-
овес	4220,0	1326,5	2893,5
гречка	850,2	333,1	517,1
сорго	1920,3	1677,4	242,9
просо	1697,3	1307,8	389,5
рис	545,7	545,7	-
горох та ін. зернобобові	7098,6	6230,3	868,3
інші зернові	82,0	75,5	6,5
соя	36987,1	33384,0	3603,1
ріпак	32803,2	32478,5	324,7
соняшник	152541,2	130886,5	21654,7

Як видно з табл. 1.1, основними за обсягами виробництва культурами в

Україні є кукурудза на зерно, пшениця, соняшник, ячмінь, соя та ріпак. При цьому, за даними Біоенергетичної асоціації України (Братішко та інші, 2020), для виробництва енергії та твердих біопалив використовується менше 1 % зібраного обсягу соломи, що свідчить про суттеві резерви подальшого використання цієї біосировини. Сумарна частка виробництва всіх інших культур сільськогосподарськими підприємствами України 2019 року не перевищувала 2 %. Відповідно й обсяги незернової частини врожаю сільськогосподарських культур є найбільшими. Отже, з точки зору загальної доступності та поширення, основною рослинною сировиною для подальшого використання та переробки, наприклад у технологіях біопалив, приготування кормів тощо, є незернова частина шести найбільш поширених сільськогосподарських культур: кукурудзи, пшениці, соняшнику, ячменю, сої та ріпаку.

За рекомендаціями Біоенергетичної асоціації України (Geletukha & Zhelezna, 2014) в середньому для України рекомендуються такі частки загального обсягу утворення рослинних відходів для використання в енергетичних цілях (кількість сировини, що може бути без істотних втрат для родючості грунту забрана з поля): для соломи зернових культур — до 30 %, для відходів виробництва кукурудзи на зерно та соняшнику — до 40 %.

Враховуючи, що співвідношення зернової та незернової частин сільськогосподарських культур (коефіцієнт відходів) знаходиться в межах від 0,8 (ячмінь) до 1,9 (соняшник), та враховуючи рекомендації щодо раціональної частки використання сільськогосподарської сировини на рівні 30-40 % для різних культур, можна оцінити об’єм незернової частини біомаси основних сільськогосподарських культур 2019 року в Україні в 44,49 млн т (табл. 1.2).

Відповідно ефективність заготівлі та подальшого застосування цієї сировини (табл. 1.2) залежатиме від технологічних можливостей та особливостей її збирання, накопичення та зберігання (Michaelidaes, 2012), зокрема від технології збирання незернової частини врожаю для кожної з культур.

Таблиця 1.2

Ресурсний потенціал незернової частини біомаси основних сільськогосподарських культур в Україні 2019 року (Братішко та ін., 2020)

Сільськогоспо-дарські культури	Обсяги виробництва зерна, млн т	Коефіцієнти відходів	Частка використа-ння	Ресурсний потенціал
Кукурудза на зерно	35,88	1,3	0,4	18,66
Пшениця	28,33	1,0	0,3	8,50
Соняшник	15,25	1,9	0,4	11,59
Ячмінь	8,92	0,8	0,3	2,14
Соя	3,70	1,3	0,3	1,44
Ріпак	3,28	2,2	0,3	2,16
Разом	95,36	-	-	44,49

З урахуванням тенденцій виробництва основних сільськогосподарських культур та прогнозів виробництво основних експортно-орієнтовних культур в Україні через 10 років може скласти: пшениці – 34 млн т; кукурудзи – 39 млн т; ячменю – 10,2 млн т. На основі цього можна спрогнозувати зміни об’єму незернової частини біомаси основних сільськогосподарських культур в Україні до 2029 року (табл. 1.3).

Наприклад, за даними досліджень вчених ННЦ «Інституту механізації та електрифікації сільського господарства», на збиранні незернової частини врожаю соняшнику та кукурудзи досліджувані в роботі (Адаманчук та інші, 2019) технологічні варіанти збирання забезпечують повноту збирання стеблової маси від 3,5 до 85,4 %.

Отже, з урахуванням тенденцій виробництва зернових, зернобобових культур та соняшнику в Україні та рекомендацій щодо раціональної частки використання сільськогосподарської біосировини на енергетичні цілі,

прогнозований об’єм рослинної біомаси — незернової частини врожаю основних сільськогосподарських культур, що може бути використана для подальшої переробки, зокрема в технологіях біопалива, 2029 року становитиме 48,29 млн т.

Таблиця 1.3

Прогноз ресурсного потенціалу незернової частини біомаси основних сільськогосподарських культур в Україні до 2029 року, млн т

(Братішко та ін., 2020)

Роки	Сільськогосподарські культури						
	Кукурудза на зерно	Пшениця	Соняшник	Ячмінь	Соя	Ріпак	Разом
2019	18,66	8,50	11,59	2,14	1,44	2,16	44,49
2020	18,82	8,66	11,75	2,30	1,60	2,32	45,46
2021	18,98	8,82	11,91	2,46	1,76	2,48	45,62
2022	19,15	8,99	12,08	2,63	1,93	2,65	45,79
2023	19,31	9,15	12,24	2,79	2,09	2,81	45,95
2024	19,47	9,31	12,40	2,95	2,25	2,97	46,11
2025	19,63	9,47	12,56	3,11	2,41	3,13	46,27
2026	19,79	9,63	12,72	3,27	2,57	3,29	46,43
2027	19,96	9,80	12,89	3,44	2,74	3,46	46,60
2028	20,12	9,96	13,05	3,60	2,90	3,62	46,76
2029	20,28	10,20	13,68	2,45	1,68	2,51	48,29

1.4 Стратегія вдосконалення виробництва біобутанолу з лігноцелюлозної сировини

Покращення лігноцелюлозної ферментації за допомогою консорціуму мікроорганізмів. Складність процесу, метаболітичного шляху утворення бутанолу та деградації лігноцелюлози може, суттєво обтяжувати ферментацію

лігноцелюлозної сировини, що призводить до низького рівня виробництва бутанолу за використання монокультур (Guo et al., 2022). У природі лігноцелюлозна біомаса цілком розкладається та засвоюється мікробними консорціумами, які поєднують гриби та бактерії (de Gonzalo et al., 2016). У зв'язку з цим було імітовано природні мікробні угруповання для створення синтетичного «Y-подібного» консорціуму, який складався з двох штамів з однаковими шляхами біосинтезу бутанолу та ортогональною здатністю до метаболізму глюкози і ксилози. Утворений консорціум міг не тільки пристосовуватися до змін навколишнього середовища, й одночасно використовувати цукри C5/C6 у різних співвідношеннях з найбільш ефективним виробництвом бутанолу із суміші цукрів та мав однакове ефективне ортогональне споживання C5 і C6 цукрів. Подібним чином целюлозний бутанол можна виробляти за допомогою співкультивування анаеробної культури *C. saccharoperbutylacetonicum* і гриба білої гнилі *Phlebia* sp. MG-60-P2. Наступний нокаут піруватдекарбоксилази і спільне використання культури *Phlebia* sp. KO77 і *C. saccharoperbutylacetonicum* демонстрували синергетичне посилення оцукрювання та збільшення виробництва бутанолу від 2,5 г/л до 3,2 г/л порівняно з спільними культурами *Phlebia* sp. MG-60-P2 і *C. saccharoperbutylacetonicum*. Отже, створення мікробних консорціумів із здатністю до синтезу бутанолу і розкладання лігноцелюлозної біомаси має потенціал для покращення виробництва лігноцелюлозного бутанолу (Guo et al., 2022).

Способи підвищення біоконверсії. Для зміни комплексу характеристик сировини та гальмування зворотного зв'язку для виробництва лігноцелюлозного бутанолу використовували різні види попередньої обробки субстрату: фізичну, хімічну або біологічну; чотири процеси бродіння, гідроліз і ферментацію (SHF), одночасне оцукрювання та ферментацію (SSF), одночасне оцукрювання та коферментацію (SSCF) і процеси консолідованої біообробки (CBP) (Parisutham et al., 2014; Haldar et al., 2020).

Одночасне оцукрювання та бродіння (SSF). Порівняно з SHF, одночасне

оцукрювання та ферментація (SSF) має менше етапів обробки, нижчі витрати на робочий процес, менший ризик забруднення та нижче гальмування зворотного зв'язку цукру у ензимах, що підвищує ефективність гідролізу і бродіння та призводить до більш високого накопичення бутанолу (Amiri et al., 2018). Однак режим роботи SSF є складним у ряді способів.

Під час процесу SSF, відповідність оптимуму температури між ензимолізом (45-50 ºС) і АБЕ-бродінням (35-37 ºС) є основною перешкодою для досягнення високої активності целюлази, вивільнення цукру та виробництва бутанолу (He et al., 2017; Li et al., 2018). З цією метою отримано *C. acetobutylicum* з покращеною термотолерантністю за 39-45 ºС і використано у високотемпературному SSF з попередньо обробленою кукурудзяною соломою. Оптимізовано процес SSF за 42 ºС з 12-годинним попереднім гідролізом кислотою в надлишку з отриманням 10,8 г/л бутанолу та 18,2 г/л продуктів АБЕ ферментації у культуральній рідині (Wu et al., 2021).

Виникнення дисбалансу у швидкості утворення цукру шляхом ферментативного гідролізу та споживання цукру клостридіями (Qureshi et al., 2008). У такому випадку водорозчинні олігомери целюлози мають використовуватися для модифікації процесу SSF, в якому хімічно були приготовлені водорозчинні олігомери та попередньо оброблена целюлоза, що одночасно піддавалися ензиматичному гідролізу і АБЕ-бродінню. Цей процес називається одночасним осахарюванням і бродінням (SCSF) (Seifollahi et al., 2019). Процес SCSF дає можливість досягнути вищого співвідношення бутанолу/лігноцелюлозної біомаси (г/г), і підходить для попередньої обробки та використання ензиматичного гідролізу лігноцелюлозної біомаси як субстрату (Balat, 2011). Нещодавно поєднання з періодичним підживленням (одночасне оцукрювання, бродіння і відновлення) було розроблено та застосовано для стратегії АБЕ-бродіння з рисової соломи, попередньо обробленої лугом. Після оптимізації початкового вмісту твердих речовин і ензимів за допомогою серійних аналізів SSF, максимальна концентрація бутанолу і продуктивність бутанолу були збільшені до 24,80 г/л та 0,344 г/л/год, відповідно, за трьох

підживлень біомасою. Такі дані вказують, що показало, що може значно підвищити продуктивність бродіння лігноцелюлози, якщо супроводжується ефективним використанням ензимів (Valles et al., 2021).

Консолідовані біопроцеси. Нещодавно розроблено CBP, який поєднує виробництво целюлази, гідроліз лігноцелюлози та бродіння сумішей цукрів в єдиний послідовний процес з одним видом мікроорганізмів або мікробним консорціумом для лігноцелюлозної ферментації (Olson et al., 2012; Jiang et al. 2019). Кілька процесів CBP було проведено для ферментації лігноцелюлози до бутанолу за допомогою генної інженерії цукролітичних штамів (Lin et al., 2015; Bao et al., 2019; Tian et al., 2019), спільним культивуванням штамів *C. cellulolyticum* (Salimi et al., 2013) і *C. thermocellum* (Nakayama et al., 2011). Наприклад, мікробний консорціум *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* M5 і *C. acetobutylicum* NJ4 були створені для ефективної АВЕ-ферментації використовуючи ксилан через CBP. У цьому дослідженні штам *T. thermosaccharolyticum* M5 міг ефективно розщеплювати ксилан, накопичуючи 19,73 г/л ксилози протягом 50 год, а штам *C. acetobutylicum* NJ4 міг ефективно використовувати ксилозу, зменшуючи субстратне інгібування ксиланази та ксилозидази. Синергія двох штамів давала 13,28 г/л бутанолу із 70 г/ л ксилану за оптимальних умов (Jiang et al., 2020).

Двоступеневе та багатоступеневе бродіння. Порівняно з періодичним бродінням, методом одноступеневого безперервного бродіння можна досягти високої продуктивності АБЕ ферментації, але нижчої його концентрації, що свідчить про те, що такий тип бродіння не вповні доцільний для промислового застосування (Zheng et al., 2015). Однак, ефективним є застосування біореактора з іммобілізованими клітинами і багатоступеневою ферментацією для безперервного АБЕ-бродіння (Chang et al., 2016). Системи двоступеневого і багатоступеневого бродіння можуть ефективно та повною мірою використовувати субстрати, асимілювати кислоти, досягаючи підвищеної продуктивності й концентрації продуктів АБЕ ферментації протягом тривалого бродіння (Chang et al., 2016). Так, для підвищення титру бутанолу

використовували чотириступеневу безперервну ферментацію патоки з тростини, досягаючи концентрації 13,75 г/л продуктів АБЕ ферментації із продуктивністю виробництва 0,439 г/л/год за градієнтного режиму розведення (Ni et al., 2013). Крім того, було розроблено процес нової двоступеневої ферментації, що поєднував кислотогенний процес бродіння з наступним процесом АБЕ ферментації для максимального використання цукру та накопичення бутанолу з рисової соломи, попередньо обробленої лугом (Chi et al., 2019).

Удосконалення процесів бродіння для бутанолу з лігноцелюлозної сировини. Загалом процеси попередньої обробки мають три основні недоліки (Sahoo et al., 2018):

1) для цього потрібні спеціальні інструменти та обладнання для попередньої обробки лігноцелюлозних матеріалів;

2) утворення та вивільнення інгібіторів, що негативно впливають на ферментативний гідроліз і бродіння, внаслідок чого виникає потреба додаткового етапу детоксикації, що збільшує загальну кількість витрати (Jonsson et al., 2013);

3) використання «незелених» хімікатів як каталізаторів у кількох методах попередньої обробки з подальшим виникненням негативних компонентів середовища.

Консолідована система бродіння, за якої відбувається ензиматичний напівгідроліз паперової маси (93,2 % глюкану) без попередньої обробки та з низьким вмістом ензиму, дає можливість отримати високі рівні целобіози (13,9 г/л) і глюкози (21,3 г/л) за допомогою АБЕ-ферментації, яка була настільки ж ефективною як з використанням комерційних цукрів без інгібіторів (Zhao et al., 2019). Розроблено нові методи детоксикації й усунення токсичних інгібіторів, але за їх використання отримано збільшений об’єм стічних вод, підвищуються витрати енергії та цукру і ці втрати є перешкодами для економічної доцільності та екологічної стійкості виробництва біобутанолу у промислових масштабах (Baral et al., 2014; Xue et al., 2017).

Таким чином, мутагенез, генетичні маніпуляції та метаболічні зміни було

застосовано для конструювання штамів, стійких до інгібіторів, які можуть досягати ферментації лігноцелюлозного бутанолу без детоксикації або утворення стічних вод. Наприклад, мутант *C. acetobutylicum* із надмірною експресією PTSGlcG продемонстрував підвищену толерантність до інгібіторів. Отримано 10,1 г/л бутанолу за використання гідролізату кукурудзяної соломи (CSH) без детоксикації, що призводило до збільшення концентрації на 300 % і 400 %, порівняно з контролем (2,5 і 2,0 г/л) і PTSGlcG-дефіцитними штамами, відповідно (Wu et al., 2019). Подібним чином впроваджено стратегію «виштовхувати–тягнути» шляхом надмірної експресії гена транс-еноіл-коензим А редуктази (ter) і повторної асиміляції кислоти шляхом, не пов'язаним із синтезом ацетону, що був створений для перенаправлення вуглецю з бутирату та ацетат до бутирил-КоА. Метаболізм ксилози був сконструйований шляхом надмірної експресії xylT (CA_C1345) та інактивації xylR (Clo cel_0594) і araR (Clocel_1253), що дало змогу отримати 4,96 г/л бутанолу з екстрагованих лугом качанів кукурудзи (Wen et al., 2020).

*Стратегія покращення фізіологічних функцій мікроорганізм*ів. Фізіологічна продуктивність мікробів має вирішальне значення для успішного біологічного бродіння. Поліпшення ефективності через метаболічну інженерію спирається на інтеграцію знання стосовно фізіологічної функціональності та ефективних біоінженерних підходів (Zhang et al., 2009). Наприклад, застосування pro (область-попередник)–mtg (мікробна трансглутаміназа) у *C. acetobutylicum* покращило стійкість до окисного стресу, викликало ріст продуктивності і виробництво продуктів АБЕ ферментації (Tao et al., 2015). У минулому багато штамів, отриманих стратегіями метаболічної інженерії, не були стабільними і не демонстрували очікуваного фенотипу, оскільки фізіологічні стресові реакції мікроорганізмів ігнорувалися. Таким чином, мікроорганізми повинні мати не тільки потужну метаболічну здатність, й володіти високого фізіологічною міцністю й адаптованістю для того, щоб ефективно працювати в реальних біологічних процесах.

Перспективи синтезу бутанолу. Зазвичай, види клостридій здійснюють

фракційну АБЕ-ферментацію лігноцелюлозної сировини, зокрема: целюлози та геміцелюлози (Bharathiraja et al., 2017). Однак, важливі етапи попередньої обробки обмежують ефективність бродіння лігноцелюлозної біомаси, оскільки становлять значну частку вартості процесу. Тому вкрай важливо розвивати більш рентабельні процеси попередньої обробки, які зводять до мінімуму утворення інгібіторів, спричиняють зниження енерговитрати, зменшують операційні витрати та одночасно максимізують виробництво продуктів АБЕ ферментації з ретельним урахуванням властивостей вихідної сировини (Zhang et al., 2021).

Втрата карбону може відбуватися у формі ксилози під час попередньої обробки біомаси та виділення значної кількісті карбону у формі CO_2 під час бродіння та когенераційних процесів (Sanchez et al., 2014). Інноваційним способом підвищення ефективності виробництва продуктів АБЕ ферментації за допомогою газового бродіння є шлях Вуда-Люнгдала, під час якого ацетогени зброджують CO_2 та H_2 для отримання летких жирних кислот і спиртів, як продемонстровано на прикладі *C. carboxidivorans* (Shen et al., 2017; Chakraborty et al., 2019; Muller et al., 2019). Крім того, ефективне використання ксилози в геміцелюлозі також є ключовим фактором зниження собівартості виробництва біобутанолу.

Щоб збільшити конкурентоспроможність бутанолу, створити економічно ефективну промислову технологію з використанням лігноцелюлозної сировини необхідно додатково оптимізувати попередню обробку та гідроліз біомаси. Крім того, необхідно мати відповідний продуцент для підтримки метаболічного шляху синтезу, ефективне транспортування цукру, використання суміші зброджувальних цукрів, а також хорошу толерантність у процесі промислового виробництва бутанолу, що може додатково підвищити ефективність бродіння та знизити витрати на цей процес.

Продуктивність лігноцелюлозної ферментації може бути покращена таким чином:

1) інтеграцією та інтенсифікацією процесу для подальшого збільшення продуктивності та економічної конкурентоспроможності ферментації

лігноцелюлози до бутанолу, зокрема інтеграцією а) попередньої обробки з гідролізом, б) гідролізу з ферментацією, і навіть в) гідролізу, бродіння та відновлення продукту;

2) адаптацією та вдосконаленням фізіологічних характеристик цільових мікроорганізмів: швидким трансформуванням гексоз і пентоз; толерантністю до бутанолу, проміжного продукту масляної кислоти та інгібіторів в сировині; стійкістю до умов стресу з низьким pH і за наявності органічних кислот і бутанолу, високою метаболічною активністю; можливістю підтримувати відповідний метаболічний шлях протягом усього процесу бродіння;

3) виробництвом бутанолу з лігноцелюлози з урахуванням клітинного стресу, проблем токсичності бутанолу в процесі бродіння та неоднорідності промислового виробництва.

Отже, попередня обробка лігноцелюлози, фізіологія і характеристики продуцентів, вуглецева ефективність, технологія екстракції та відновлення бутанолу мають бути відповідним чином оптимізовані для поліпшення фізіологічної діяльності мікробів для досягнення як підвищеної, так і постійної концентрації бутанолу в поєднанні з функціями біологічної стабільності клітин (Шульга та ін., 2024).

За сучасних умов вирішальним чинником підвищення рівня енергетичної безпеки та зменшення антропогенного впливу на довкілля будь-якої країни є належне опанування нетрадиційних і поновлюваних джерел енергії. У паливно-енергетичних комплексах провідних країн світу, в тому числі і України, передбачається поступове зростання ролі альтернативної енергетики та поновлюваних видів палива, зокрема біопалива. Разом із тим, в багатьох секторах економіки України існують целюлозовмісні побічні продукти виробництва, які можуть бути використані для отримання одного із видів біопалива – біобутанолу. Саме цьому питанню присвячена дисертаційна робота.

Здійснивши оцінку інформації, з літературних джерел, методами узагальнення та аналізування на захист виносяться такі основні положення:

Вперше досліджено штам-продуцент бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570, секвеновано його геном та проведено філогенетичний аналіз.

Вперше виділено з природних джерел новий лігнолітичний штам *Streptomyces graminifolii*, визначено нуклеотидну послідовність гена 16S рРНК та проведено філогенетичний аналіз штаму.

Розроблено дизайн конструкції нового рекомбінантного штаму-продуценту бутанолу та показано, що видалення великої субодиниці гліцеролдегідратази (*dhaB*) за допомогою адаптованої ніказної системи *S. pyogenes* типу II CRISPR/Cas9 формує мутант, що виробляє бутанол як основний продукт.

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.

Удосконалено технологію отримання біобутанолу на основі виявлення фізіологічних та біохімічних властивостей одержаних штамів мікроорганізмів.

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

Обґрунтовано можливість використання адаптивного стресу для підвищення накопичення цільового продукту за рахунок зміни метаболічних шляхів у клітинах мікроорганізмів, опосередковано через дію стресових факторів.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Штами-продуценти та сировина

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), вищі гриби-продуценти целюлаз *Pleurotus djamor*, *P. ostereatus*, *Hohenbuehelia myxotricha*, *Auriporia aurea*, *Leucoagaricus leucothites*, *Schizophyllum canmune*, *Spongipellis litschaueri*, *Crinipellis* з «Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного Національної академії наук України», подрібнену лігноцелюлозну сировину комунального походження (рис. 2.1, рис. 2.2, рис. 2.3); сік, багасу та незернову біомасу сорго цукрового (*Sorghum saccharatum* (L.) Moench) сорту Energodar (НБС, ІХБГ), hybrid AMBR-1 (НБС, ІХБГ), hybrid-720 (Alta Seads Advanta US), hybrid ST-207 (RAGT Semences) (рис. 2.4), міскантусу цукроквіткового сорт Снігопад *Miscanthus sacchariflorus* (НБС) та дротовидного 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 *Zey 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 дротовидного проса після автогідролізу – целюлоза, арабіногалактан та лігнін (Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря Національної академії наук України); скоп ПрАТ «Київський картонно-паперовий комбінат» та біомасу вичавок (загальна вологість 4 %) після виробництва яблучного соку.

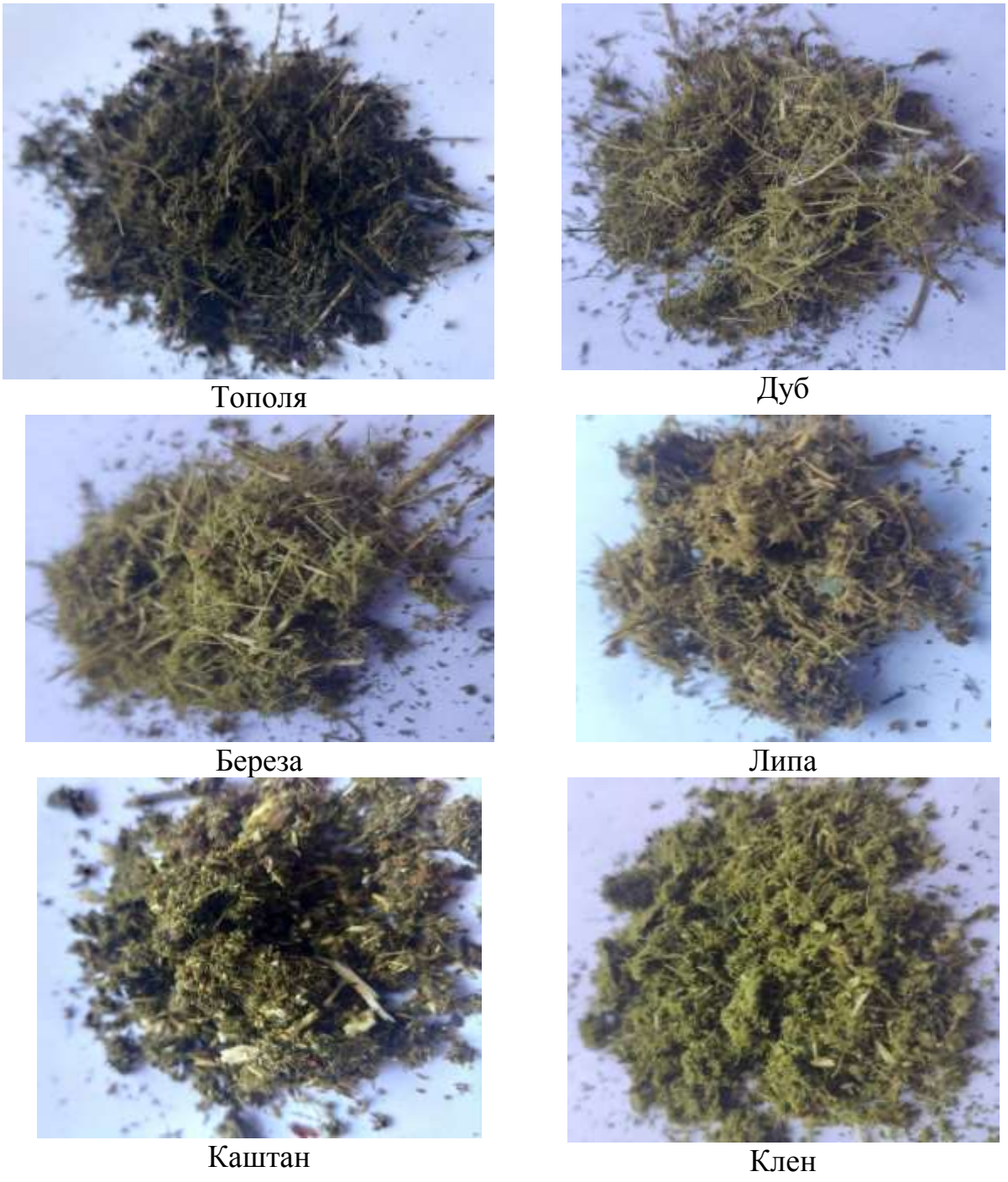


Рис 2.1 Подрібнена біомаса кронування гілок комунального походження

Для проведення хімічних досліджень органічну сировину комунального походження заготовляли у червні-листопаді 2023 р. Свіжозрізані гілки довжиною до 1,5-2,0 м (діаметром до 2 см) із зеленою листковою масою заготовляли як обрізки дерев. Опале листя відповідних видів збирали під час листопаду в суху погоду, без опадів.



Рис. 2.2 Подрібнене опале листя



Газон



Різнотрав’я



Міскантус гігантський



Міскантус цукровий



Міскантус китайський



Сорго цукрове

Рис. 2.3 Подрібнені трав’яні відходи

Для збирання трав використовували косарки з бункерним накопичувачем.

Рослини міскантусу гігантського та сорго цукрового зрізали цілком. Сировину подрібнювали на лабораторному млині МІЛЛЕР-2000 (Китай) і без зберігання одразу направляли на хімічний аналіз. У роботі також використовували гліцерол (BASF, ФРН), фурфурол (Thermo Fisher Scientific, Литва), алопуринол (Сандоз, Україна).

Для отримання лігнолітичних бактерій використовували мікроорганізми, які були виділені з ґрунтів Києва (один зразок), Чернігівської (три зразки), Вінницької (один зразок), Чернівецької (два зразки) та Хмельницької областей (два зразки). Характеристики ґрунтів з яких виділяли актиноміцети наведено в табл. 2.1.

Зразки відбирали стерильним шпателем та переносили в стерильні банки. На банки наклеювали етикетки, де вказували дату, назву зразка та місце забору. Для підрахунку мікроорганізмів та виявлення колоній мікроорганізмів методом граничних розведень готували розведення суспензії ґрунту у співвідношенні 1:10000. Для вітального фарбування відібрані бактерії за допомогою петлі вносили на предметне скельце з краплею води, фіксували над полум'ям пальника та фарбували метиленовим синім. Для фарбування зразків за Грамом було проведено дослідження з використанням відповідних барвників (Erkmen, 2021). Мікроскопіювання проводили за допомогою мікроскопу «Laboval» (Німеччина). Фото робили за допомогою фотоапарату «Canon PowerShot A640» (Японія). Для характеристики колоній мікроорганізмів використовували стереомікроскоп Zeiss Stemi 2000 (Німеччина).

Вичавки пастоподібної консистенції отримували з яблук сорту Голден Делішес та Папіровка за допомогою соковитискача (Philips, Нідерланди). Для отримання соку відбирали дозрілі плоди яблук вагою 100-120 г без пошкоджень шкідниками або хворобами, наявних зовнішніх дефектів, наростів, деформацій, жовтого кольору зі шкірочкою середньої товщини, щільною, еластичною, сухою, жовтуватим м'якушем, щільним, дрібнозернистим, соковитим, ароматним, кисло-солодким за смаком.

Всі проведені експериментальні дослідження щодо біомаси рослин

відповідають міжнародним рекомендаціям. Дослідження видів рослин, що знаходяться під загрозою зникнення, не проводили.

Таблиця 2.1

Характеристики зразків ґрунтів для виділення лігнолітичних бактерій

Зразок	Місце виділення зразка	Характеристики зразків	Кількість мікроорганізмів, млн. КУО/г
1	Чернігівська область	Ґрунт піщаний, біля 1 % коренів рослин, 20 % рослинних решток.	160,0±6,0
2	Чернігівська область	Ґрунт чорнозем, 30 % піску, 40 % рослинних коренів, 20 % рослиних решток.	100,0±5,0
3	Чернігівська область	Ґрунт глинистий, 20 % піску, 20 % рослинних решток, 10 % коренів рослин, біля 2 % мушель.	926,0±37,4
4	Вінницька область	Ґрунт глинистий, 20 % піску, 20 % рослинних решток, 5 % коренів рослин, біля 1 % мушель.	234,0±9,0
5	м. Київ	Ґрунт дерново-підзолистий, наявні рослинні рештки та корені біля 30 %.	684,0±22,0
6	Хмельницька область	Ґрунт дерново-підзолистий, наявні рослинні рештки та корені біля 20 %.	896,0±18,2
7	Хмельницька область	Ґрунт пісчаний, переважають рослинні корені (біля 60 % від проби), біля 15 % чорнозему, наявні рослинні рештки.	465,0±15,0
8	Чернівецька область	Ґрунт пісчаний, переважають рослинні корені (біля 85 % від проби), біля 5 % чорнозему, наявні рослинні рештки.	224,0±33,0
9	Чернівецька область	Ґрунт чернозем, переважають рослинні корені (біля 95 % від проби), близько відсотка складає пісок, наявні часточки решток рослин.	743,0±29,8



1 2 3 4

Рис. 2.4 Біомаса *Sorghum saccharatum*: 1 – сорт Energodar, 2 – hybrid AMBR-1, 3 – hybrid-720, 4 – hybrid ST-207

2.2 Умови культивування та поживні середовища

Дослідження актиноміцетів проводили з використанням вівсяного агару (20 г/л вівсянки відварювали, проціджували та додавали 2 % агару). Посівну культуру вирощували в колбах об'ємом 750 мл протягом 28 годин за 28 ºС на качалках (240 хв$^{-1}$) у посівному середовищі (ПС) об'ємом 50 мл. Склад ПС (%): соєве борошно – 1,5; дріжджовий автолізат – 0,5; глюкоза – 2,0; pH середовища до стерилізації 7,4. Для приготування автолізату 1 кг пресованих дріжджів суспендували у 2,5 л води підігрітої до 50-55 °С додавали толуол (5 мл на 1 л). Суспензію витримували у термостаті за температури 50-55 °С протягом 48 год. Фільтрували і стерилізували за 0,5 атм протягом 20 хв. Посівний матеріал у кількості 5 % вносили в колби з 95 мл ензиматичного середовища.

Для визначення накопичення бутанолу за використання гліцерину використовували середовище наступного складу (г/л): гліцерин сирець (від 10,0 до 20,0), дріжджовий екстракт – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,6; $(NH_4)_2HPO_4$ – 1,6; pH 6,5.

Середовище стерилізували протягом 30 хв та тиску 1 атм. Для визначення накопичення бутанолу за використання топінамбура кореневі бульби мили, чистили, подрібнювали та віджимали сік за допомогою соковитискача (Philips, Нідерланди). Сік розводили до 19,6 % сухих речовин та додавали (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 0,6; $(NH_4)_2HPO_4$ – 1,6; pH доводили до 6,68.

Як активаційне середовище використовували стандартний диференційний підсилений бульйон (Condolab, Іспанія). Культивування клостридій проводили в анаеростаті «Crystal» (ФРН) за температури 35 ºС в атмосфері азоту. Анаеростат поміщали у термостат за температури 35±1 ºС.

Як інокуляційне використовували середовище наступного складу (г/л): гліцерол – 20; дріжджовий екстракт – 1; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,6; $(NH_4)_2HPO_4$ – 1,6; pH – 6,5. Середовище стерилізували автоклавуванням за режимом 1 атм 30 хв. Первісна концентрація внесеного інокуляту складала 5 % об'ємних, а в дослідженні впливу концентрації посівного на накопичення бутанолу – варіювала. Як ензиматичне середовище для дослідження яблучних вичавок як субстрату для культивування використовували їх у різній кількості, KH_2PO_4 – 1,5 г/л, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2 г/л, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,01 г/л, $(NH_4)_2SO_4$ – концентрація залежала від потреби, для зберігання C:N балансу в середовищі і водопровідну воду. Середовище стерилізували автоклавуванням за режиму 0,5 атм протягом 30 хв.

Для підтвердження целюлозолітичних властивостей штамів використовували тверде середовище наступного складу (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 0,6; $(NH_4)_2HPO_4$ – 1,6; агар – 30; pH – 6,2. Стерелізували протягом 30 хв за тиску 1 атм. У середовище занурювали стерильні диски (стерилізували протягом 30 хв за тиску 2 атм) із фільтрувального паперу (1,0 г) на які висівали з рідкого середовища відповідні штами крапельним методом.

Для приготування середовища з незернової біомаси ріпаку використовували наважки 5,0 г/л води та стерилізували під тиском 2 атм протягом 2 год. Незернову біомасу ріпаку сушили при температурі 30±1 ºС протягом 168 год. Вологість сировини визначалась за допомогою вагового

аналізатору вологості RADWAG MA 50/C/1 (Польща). Ваги-вологоміри складаються з лабораторних ваг 3 класу точності та вбудованим над ними пристроєм для сушіння, що дозволяє використовувати їх як традиційні лабораторні ваги, так і як автоматизований прилад для визначення вмісту вологи в зразках. Визначення вмісту вологи в зразках матеріалів та речовин здійснювали термографічним методом.

Суху біомасу подрібнювали за допомогою лабораторного млину «Циклон МШ 1» (Україна) до розміру 200 меш (рис. 2.5). Затори стерилізували за тиску 1 атм протягом 30 хв.



Рис. 2.5 Подрібнена незернова рослинна біомаса: 1 – соя *Glycine max*, 2 – пшениця *Triticum* sp., 3 – ячмінь *Hordeum* sp., 4 – просо *Panicum virgatum*

Культивування зразків проводили в колбах з рідким середовищем або на чашках Петрі. Інокулят ферментували протягом 24 год та визначали накопичення бактерій за стандартом мутності. Після ферментації в інокуляті визначали залишкову кількість гліцерину за SN/T 3344-2012 Determination of free glycerin in crude glycerol та наявність продуктів АБЕ ферментації.

Культивування проводили у 500 мл колбах з заповненням 250 мл середовища та гідрокислотними модулями. Колби зважували та термостатували за температури 35±1 ºС. Після 72 год культивування клітини осаджували протягом 10 хв з використанням ультрацентрифуги «Labofuge 400R» (Німеччина) за швидкості 13000 об/хв і вилучали продукти бродіння з культуральної рідини.

Культивування мікроорганізмів на твердих середовищах проводили з використанням стандартного диференційного підсиленого клостридіального середовища (Condalab, Іспанія) у анаеростаті «Crystal» (ФРН) в атмосфері азоту. Анаеростат поміщали у термостат за температури 35±1 ºС. Для приготування затору з зеленої маси ріпаку брали наважки по 20,0 г речовини на літр води та стерилізували за 2 атм протягом 2 год.

Сік та багасу пастоподібної консистенції отримували зі зеленої маси *Sorghum saccharatum* (L.) Moench за допомогою соковитискача (Philips, HR 1945/80, Нідерланди). Як ферментаційне середовище використовували затор із сухої біомаси концентрацією 60 г/л (рис. 2.6 а), багасу концентрацією 60 г/л (рис. 2.6 б) та сік сорго (рис. 2.6 в). Затори стерилізували за тиску 1 атм 30 хв, сік – 0,5 атм 30 хв.

Визначення термографічним методом вмісту вологи в речовинах та матеріалах полягало у встановленні маси підготовленого зразку до і після його висушування шляхом нагрівання. Випаровування вологи із зразка під час нагрівання приводило до зменшення його маси, що дозволяло виключно за даними вимірювань маси розраховувати вміст у досліджуваному зразку вологи, яка була до початку процесу сушіння зразку.

Визначення вмісту вологи в одному і тому ж зразку було реалізовано з однаковою точністю за суттєво різних за значеннями температурах сушіння зразка (різниця буде полягати виключно в часі проведення процедури).



Рис. 2.6 Сировина для ферментації *Sorghum saccharatum*: а – суха незернова біомаса сорту Energodar, б – багаса, в – сік

Ваги-вологомір визначають та автоматично розраховують вміст вологи та сухого залишку за наступними формулами:

$$B = \frac{(m_0 - m)}{m_0} \times 100\%, \qquad (2.1)$$

де відношення маси випареної вологи до початкової маси зразка (масова частка вологи).

$$B = \frac{(m_0 - m)}{m} \times 100\%, \qquad (2.2)$$

де відношення маси випареної вологи до залишкової маси зразка.

$$B = \frac{m}{m_0} \times 100\%, \qquad (2.3)$$

де відношення залишкової маси зразка до початкової маси зразка (масова частка сухих речовин, «сухий залишок»).

Для визначення сирої золи проби висушували за температури 60-65 ^{o}C до повітряно-сухого стану. Тигель прожарювали у муфельній печі за температури 525±25 ^{o}C протягом 2 год, охолоджували в ексикаторі і зважували на терезах 2-го класу точності. Цей процес повторювали до досягнення постійної маси тигля, тобто різниця результатів двох послідовних зважувань не повинна була

перевершувати 0,001 г. Прожарений і доведений до постійної маси тигель зберігали в ексикаторі.

У попередньо висушений тигель вносили пробу масою близько 0,5-2 г. Пробою заповнювали не більше половина тигля. Тигель з пробою зважували з точністю до 0,001 г, потім ставили у холодну піч і підвищували температуру до 200-250 ^{o}C (до появи диму). Після припинення виділення диму температуру печі доводили до 525±25 ^{o}C і прожарювали тигель з пробою протягом 4-5 годин. Відсутність частинок вугілля і рівномірний сірий колір золи свідчили про повне озолення матеріалу.

Масову частку сирої золи (X) у відсотках розраховували за формулою

$$X = \frac{(m_2 - m_0)}{m_1 - m_0} \times 100, \qquad (2.4)$$

де m_0 – маса тигля, г;

m_1 – маса тигля з наважкою до озолення, г;

m_2 – маса тигля з золою, г.

Масову частку сирої золи (X_1) у відсотках в перерахунку на суху речовину розраховували за формулою

$$X_1 = \frac{X \times 100}{100 - W}, \qquad (2.5)$$

де X – масова частка сирої золи в досліджуваній пробі, %;

W – вологість досліджуваної проби, %.

Для визначення целюлози використовували азотно-спиртову суміш, що складалася з одного об’єму концентрованої азотної кислоти (щільність 1,4 г/мл) і чотирьох об’ємів 95 %-го етанолу.

Наважку повітряно-сухого зразку масою близько 1 г вносили у конічну колбу місткістю 250 мл і додавали мірним циліндром 25 мл азотно-спиртової суміші. До колби приєднували зворотній холодильник і кип’ятили зразок з сумішшю на водяній бані 1 годину. Не можна допускати занадто бурхливого кипіння для уникнення викидів целюлозної маси у холодильник і на стінки колби. Після закінчення кип’ятіння зразку давали змогу осісти і обережно

зливали рідину через попередньо висушений до постійної маси пористий фільтр. Зразок, що потрапив на фільтр, змивали знову у колбу, використовуючи 25 мл свіжої азотно-спиртової суміші і знову кип'ятили у колбі зі зворотнім холодильником протягом 1 години. Таку обробку виконували три-чотири рази.

Після останньої обробки целюлозу відфільтровували на висушеному до постійної маси скляному пористому фільтрі, використовуючи відсмоктування, промивали 10 мл свіжої азотно-спиртової суміші, а потім гарячою водою. За промивання ретельно змивали всю целюлозу з колби на фільтр. Відмивку від кислоти перевіряли за допомогою індикатору метиловому помаранчевому, наносячи краплину його розчину на целюлозу на фільтрі. За наявності кислоти індикатор набував червонуватого відтінку. В цьому випадку промивку продовжували. Якщо індикатор не змінював кольору, промивання вважали завершеним. Індикатор змивали гарячою водою і ретельно її відсмоктували. Фільтр з целюлозою сушили у сушильній шафі за температури 103±2 °С до сталої маси і зважували.

Масову частку «вогкої» целюлози (C) у відсотках до абсолютно сухої деревини, розраховували за формулою

$$C = \frac{m_1 - m_0}{g} \times 100, \qquad (2.6)$$

де m_0 – маса пустого фільтру, г;

m_1 – маса фільтру з залишками зразку, г;

g – маса абсолютно сухого вихідного зразку, г.

Розбіжність між результатами двох паралельних визначень не повинна перевищувати 1,0 %.

Для визначення лігніну наважку повітряно-сухої проби, зваженої з похибкою не більше 0,001 г, масою 0,5-1 г клали у конічну колбу місткістю 300 мл. У колбу заливали 100 мл 2 %-вого розчину соляної кислоти і ретельно перемішували. До колби приєднували зворотній холодильник і кип'ятили зразок з сумішшю на плитці 2 години, підтримуючи рівномірне слабке кипіння розчину. Після цього колбу знімали з плитки, давали вмісту трохи охолонути і

фільтрували через воронку з паперовим фільтром діаметром 10 см. Залишок на фільтрі кілька разів промивали водою до зникнення кислої реакції промивних вод (проба за лакмусом), а потім ацетоном до тих пір, поки фільтрат на ставав безбарвним. Незабарвлений залишок промивали ацетоном тричі по 15 мл. Промитий залишок гідролізували за допомогою реактиву Джайме-Кнолле (6 об'ємів 75 %-ного розчину сірчаної кислоти і 1 об'єм концентрованої ортофосфорної кислоти).

Залишок з фільтром переносили у стакан місткістю 400 мл і додавали 15 мл реактиву Джайме-Кнолле. Вміст стакану перемішували, щоб фільтр з залишком увесь просочився реактивом. Потім стакан розміщували у термостат при 40 °С і через 10 хв. вміст перемішували до зникнення шматочків фільтрувального паперу, через 35 хв стакан виймали і вміст розводили дистильованою водою до 200 мл, потім кип'ятили на плитці протягом 30 хв. Після кип'ятіння осаду давали осісти протягом 10 хв.

Розчин фільтрували під вакуумом через беззольний фільтр, розміщений на воронці Бюхнера. Фільтр попередньо висушували протягом 1 год за 130 °С і зважували разом з бюксом. Залишок на фільтрі ретельно відмивали від кислоти гарячою водою, до якої для покращення промивання додавали 5 г натрій хлориду на 1000 мл води. Якість відмивання контролювали за індикатором (лакмус).

Фільтр з осадом переносили у бюкс, сушили за 105 °С протягом 4 год, охолоджували в ексикаторі і зважували разом з бюксом. Потім фільтр з осадом розміщували у фарфоровому тигелі, який необхідно було попередньо прожарити у муфельній печі за температури 525±25 °С до досягнення постійної маси. Тигель з золою охолоджували в ексикаторі і зважували.

Масову частку лігніну у досліджуваній пробі (X) у відсотках розраховували за формулою

$$X = \frac{(m_2 - m_3) - (m_4 - m_5)}{m_1} \times 100, \qquad (2.7)$$

де m_1 – маса наважки, г;

m_2 – маса бюкса з фільтром і лігніном, г;

m_3 – маса бюкса з фільтром, г;

m_4 – маса тигля з золою, г;

m_5 – маса тигля, г.

Масову частку лігніну (X_1) у відсотках в перерахунку на суху речовину розраховували за формулою

$$X_1 = \frac{X \times 100}{100 - W}, \qquad (2.8)$$

де, X – масова частка лігніну в досліджуваній пробі, %;

W – вологість досліджуваної проби, %.

Розбіжність між результатами двох паралельних визначень не повинна перевищувати 0,8 %.

Визначення водорозчинних речовин – пектинів та поліцукрів (крохмаль, арабіногалактан). Наважку повітряно-сухих зразків масою близько 2 г вносили в конічну колбу місткістю 250 мл і заливали 100 мл дистильованої води. До колби приєднували зворотній холодильник і ставили у киплячу водяну баню, де рівень води був дещо вище рівня води у колбі. Протягом всього екстрагування підтримували сталий рівень води у бані за рахунок додавання киплячої води. Процес тривав 3 години. Потім зразок відфільтровували на попередньо висушеному до сталої маси пористому скляному фільтрі з відсмоктуванням, змиваючи зразок з колби на фільтр гарячою дистильованою водою. Фільтр зі зразком сушили до постійної маси у сушильній шафі за температури 103±2 ºС і зважували.

Масову частку речовин розчинних у гарячій воді (E) у відсотках розраховували за формулою:

$$E = \frac{g - (m_1 - m_0)}{g} \times 100, \qquad (2.9)$$

де m_0 – маса пустого фільтру, г;

m_1 – маса фільтру з залишками зразку, г;

g – маса абсолютно сухого вихідного зразку, г.

Розбіжність між результатами двох паралельних визначень не повинна

перевищувати 0,5 %.

Для визначення загальної кількості геміцелюлоз повітряно-суху наважку 5±0,01 г розміщували у колбі. У колбу з наважкою додавали 20-кратну кількість дистильованої води і нагрівали у киплячій водяній бані протягом години. Потім витяжку зливали у мірну колбу декантацією, залишок у колбі заливали новою порцією гарячої води і витримували ще протягом 30 хв на киплячій бані. Приєднували фільтрат до першого і, якщо потрібно, враховували вміст цукру в ньому. Залишок з фільтру ретельно переносили знову у колбу, змиваючи 2 %-вим розчином соляної кислоти. До використаної кислоти у колбу приливали таку її кількість, щоб загальний об'єм складав 225 мл. Після цього колби зі зворотнім холодильником нагрівали протягом 5 год у бурхливо киплячій водяній бані. Фільтрували і після охолодження переливали у мірну колбу на 250 мл, нейтралізували до слабо кислої реакції (за лакмусом) розчином лугу і осаджували основним оцтовокислим свинцем. У такому вигляді витяжку залишали до наступного дня.

Після цього витяжку у колбі доводили до мітки, відфільтровували рідину і брали паралельні проби для визначення цукру за Бертраном, як описано у попередній методиці. Масову частку цукру розраховували, як зазвичай, враховуючи розбавлення і наважку, а знайдену величину для перерахунку на геміцелюлози множили на 0,9.

Для екстрагування смол та жирів використовували установку типу Сокскліта. Для дослідження брали 10-20 г зразку з точністю до четвертого знаку після коми. У зливну трубку насадки вводили невелику кількість знесмоленої вати, змоченої хлористим метиленом і розміщували наважку на 1,0-1,5 см нижче рівня переливу насадки.

У попередньо висушену до постійної маси і зважену колбу наливали хлористий метилен у кількості, що становить 1,5-2,0 об'єму насадки. З'єднували насадку з холодильником і колбою і ставили її на нагрівальний прилад. Нагрів колби повинен був відрегульований так, щоб забезпечити 8 переливів за 1 год. Екстрагування тривало 3 год. Загальна кількість переливів – 24.

Після закінчення екстрагування відганяли через насадку чистий розчинник до тих пір, поки у колбі не залишилося 5-7 мл екстракту. Після цього її нагрівали до постійної маси у сушильній шафі за температурі 105±2 ºС протягом 3-4 годин. Після охолодження в насадці до кімнатної температури колбу з екстрактом зважували з точністю до четвертого знака.

Масову частку смол та жирів (w) у відсотках розраховували за формулою

$$w = \frac{(m_1 - m\ ) \times 100}{m_2 \times (100 - W)} \times 100, \qquad (2.10)$$

де, m – маса сухої колби, г;

m_1 – маса колби з екстрактом, г;

m_2 – маса повітряно-сухої проби, г;

W – вологість досліджуваної проби, %.

Визначення калорійності досліджуваних зразків

Калорійність зразків досліджували на калориметрі IKA C200 за стандартизованим методом, шляхом спалювання зразку в атмосфері кисню в калориметричній бомбі (рис. 2.7).

Для вивчення впливу стресових факторів додавали у середовище: фурфурол у концентрації 0,1–1 г/л, з кроком 0,1 г/л; $ZnSO_4$ у концентрації (г/л): 0,0001; 0,005; 0,001; 0,005; алопуринол у концентраціях (г/л): 0,01; 0,025; 0,05. Для вивчення впливу гліцеролу використовували середовище з глюкозою (20 г/л), як контроль, гліцерол (20 г/л), та суміш глюкози і гліцеролу у співвідношеннях 1:1, 1:2, 1:3. Для вивчення впливу різної концентрації кисню (повітря) використовували перемішування культуральної рідини в шейкері-інкубаторі за швидкості від 50 до 130 об/хв з кроком 10 об/хв. Цитологічні дослідження мікроорганізмів проводили за допомогою мікроскопу «Laboval» (ФРН). Фотографії робили за допомогою фотоапарату «Canon PowerShot A640» (Японія).



1 2

Рис. 2.7 Калориметрична бомба (1) та калориметр C200 (2)

2.3. Попередня підготовка сировини

Біомасу дротовидного проса, сої, ріпаку, скопу та пшениці сушили за температури 30±1 °С протягом 48 год. Висушену біомасу (вологість 7 %) подрібнювали до розміру 200 меш за допомогою лабораторного млина «Циклон МШ 1» (Україна).

Паробаричну попередню обробку лігноцелюлозної сировини виконували за методикою на спеціально створеному обладнанні за температури 180-260 °С під відповідним тиском з наступним різким скидом тиску до атмосферного. При цьому відбувалось розділення (розволокнення) лігноцелюлозної сировини. В результаті отримували кашоподібну суміш, яку або відразу використовували як субстрат, або фракціонували наступним чином (рис. 2.8).

Процес фракціонування можна описати наступними стадіями. Суміш продуктів 620 г після автогідролізу переносили у воронку Бюхнера і відфільтровували рідку фракцію (310 г). Повітряно-сухий залишок поміщали у конічну колбу 500 мл і заливали гарячою водою 300 мл. Гідромодуль 50

(відношення тверда фаза/рідина). Екстракцію розчинних вуглеводів проводили протягом 3 годин на водяній бані за температури 200 ºС. Після чого повторно проводили розділення на воронці Бюхнера.



Рис. 2.8 Схема фракціонування лігноцелюлозної біомаси після вибухового автогідролізу

Отриманий твердий залишок висушували. Для запобігання руйнування водорозчинних цукрів фільтрат упарювали на водяній бані, при цьому одночасно відбувалась відгонка фурфуролу разом з водою. Арабіногалактан осаджували етанолом з гідромодулем 5. Осад відфільтровували і промивали етанолом з наступною сушкою. Видалення етанолу з розчину фільтрату проводили на роторному випарювачі. В результаті отримували концентрат розчинних цукрів.

Наявність фурфуролу після вибухового автогідролізу визначали методом газової хроматографії. Використовували газовий хроматограф «Agilent-7890A» (США) з полумяно-іонізаційним детектором; кварцеву капілярну середньо полярну колонку HP-5 довжиною 30 м, внутрішнім діаметром 0,320 мм, товщиною нанесеної фази 0,25 мкм; газ-носій – гелій (300 мл/хв.); програмування температури аналізу – 40 – 280 ºС (5 ºС/хв.); температура випарювача – 250±5 ºС; температура детектора – 280±5 ºС. Об’єм проби становив 1,0 мкл. Обробку

результатів аналізу здійснювали з використанням методу абсолютного градуювання за площами хроматографічних піків.

Визначення залишкового метанолу в гліцерині сирцю проводили методом газової хроматографії за допомогою газового хроматографа (Agilent-7890A, США) з полум'яно-іонізаційним детектором згідно з міжнародним стандартом ASTM D7716-11a Стандартний метод визначення залишкового метанолу в гліцерині методом газової хроматографії. Визначення вільного гліцерину за міжнародним стандартом SN/T 3344-2012 Визначення вільного гліцерину в гліцерині сирці. Газова хроматографія. Склад гліцерина сирцю за міжнародним стандартом SN/T 2995-2011 Стандартний метод визначення вільного і загального гліцерину в метилових ефірах біодизельного палива B-100 метод газової хроматографії. Вміст лужного металу у відході після отримання біодизеля гліцерині-сирці визначали за допомогою титрування хлоридною кислотою.

Органозольну підготовку сировини проводили з ацетоном в колбах на 200 мл зі зворотнім холодильником. 60 г сировини поміщали у колбу та доливали 100 мл водного розчину ацетону (50 мл води та 50 мл ацетону) та 0,1 % сірчаної кислоти, як каталізатору, кип'ятіння проводили протягом 60 та 90 хв.

Ензиматичний гідроліз попередньо підготовленої біомаси здійснювали за допомогою целюлозного ферментного комплексу целюлоз з *Trichoderma reesei* ATCC 26921(Sigma, США) та целобіаз з *Aspergillus niger* (Sigma, США) та β-глюкозидазами в оптимальних умовах, рекомендованих виробником: температура процесу — 50 °C, pH = 5,0 (допустимий діапазон 50–65 °C; pH 4–5). За лужного гідролізу відбувається часткове розщеплення лігніну і такий гідроліз здійснюють за рахунок 1 %-го розчину NaOH за температури 100 °C. Кислотний гідроліз виконували за 100 °C з 1 % H_2SO_4.

Дослідження процесу ультразвукової дезінтеграції (УЗД) рослинної сировини з отриманням біобутанолу проводили на базі лабораторії кафедри охорони праці та біотехнічних систем у тваринництві Національного університету біоресурсів і природокористування України. Етапи досліджень включали підготовку рослинної сировини з приготуванням суспензії на основі

подрібненої сировини, обробку отриманої суспензії ультразвуком та її подальше культивування для отримання біобутанолу. Попередня підготовка рослинної сировини включала двоетапне подрібнення сировини до заданого середньозваженого розміру подрібнених часток (200 меш), змішування всієї маси подрібненої сировини, приготування суспензій із заданим вмістом сухих речовин і подальшу обробку ультразвуком. Для попереднього подрібнення використовували дробарку «Елікор-5» (ПАТ «Електромотор», Україна), а для остаточного подрібнення — лабораторний млин «ЛЗМ-1» (ТОВ «ЛІС», Україна). Середньозважений розмір подрібнених частинок сировини визначали на лабораторному ситі «РЛУ-3» (ТОВ «Статус», Україна) з набором лабораторних сит. Рослинну сировину подрібнювали до середньозваженого розміру частинок 0,78 мм (проходячи лабораторне сито № 64 і витримуючи на ситі № 67). Подрібнену сировину перемішували протягом 5 хв за допомогою лабораторного барабанного змішувача періодичної дії. Для приготування суспензії використовували водопровідну воду очищену з відповідною масовою часткою подрібненої рослинної сировини з урахуванням її вологості. Для зважування сировини використовували лабораторні ваги ТВЕ-1 (ТОВ «НВП «Техноваджі», Україна).

УЗД суспензії проводили за допомогою лабораторної ультразвукової ванни, що складається з гастроємності з нержавіючої сталі стандартного розміру «GN ¼» («Торгооборуд», Україна) глибиною 65 мм, на дні якої кріпилися п’єзокерамічні Ультразвукові перетворювачі Ланжевена (рис. 2.9) з робочою частотою 28 кГц і потужністю ультразвуку 60 Вт (ПП «Ворон», Україна).

Живлення лабораторної установки здійснювалось від ультразвукового генератора UCE-NT 1500 («UCE Ultrasonic», Китай) потужністю 1,5 кВт, який забезпечував заданий час роботи та автоматичне налаштування резонансної частоти ультразвукових перетворювачів у діапазоні 20–40 кГц. Після УЗД сировину одразу відправляли на культивування.

Досліджували вихід бутанолу з одиниці об’єму суспензії та масу сухих речовин (г/л) залежно від тривалості ультразвукової обробки суспензії (т, хв),

вмісту сухих речовин у суспензії (с, %). і питома потужність ультразвуку (мк, Вт/л). Питому потужність ультразвуку (μ) змінювали зміною об'єму суспензії при постійній потужності перетворювачів. Тривалість ультразвукової обробки суспензії 5 і 25 хв, вміст сухих речовин 50 і 100 г/л, питома потужність ультразвуку становила 0,18 та 0,72 Вт/л.

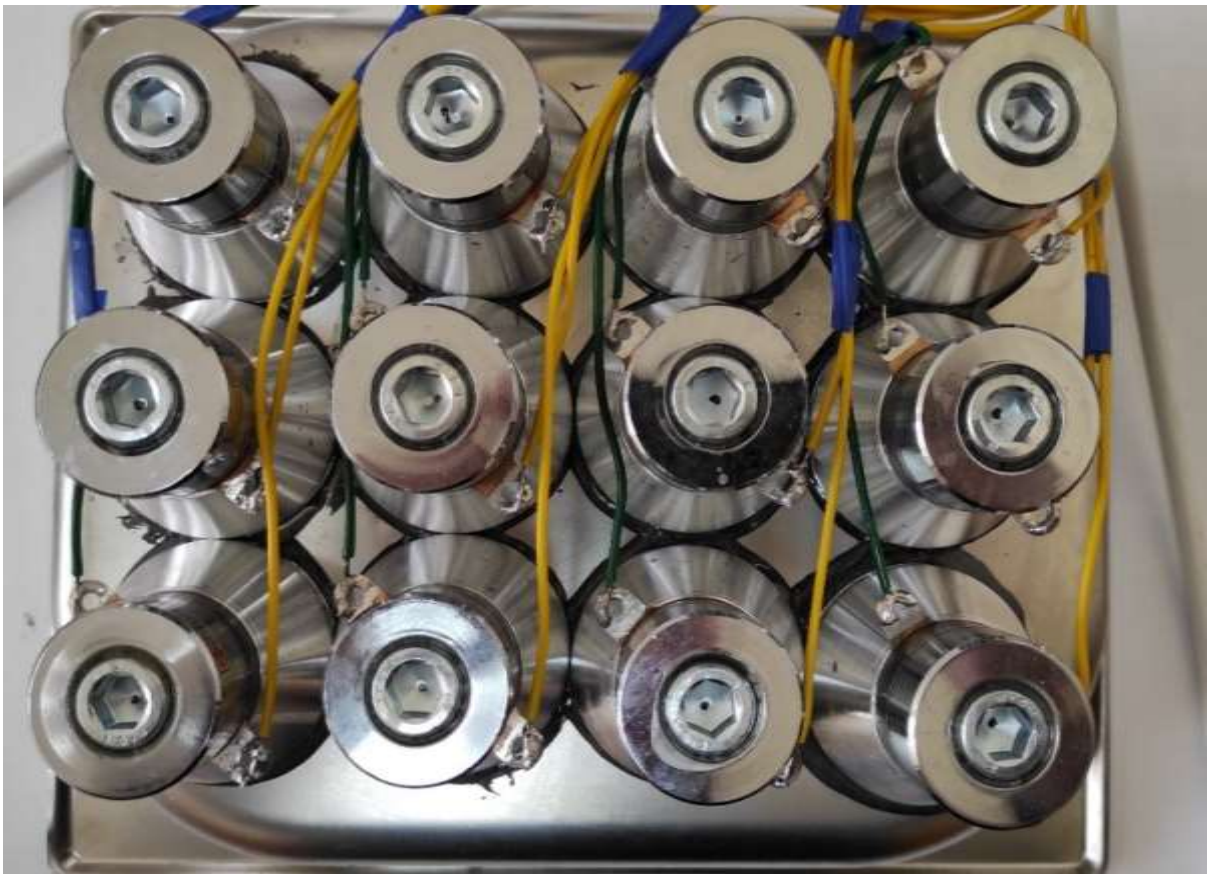


Рис. 2.9 Лабораторна ультразвукова ванна з випромінювачами (вид знизу)

2.4 Ліофілізація штамів-продуцентів

Для визначення впливу захисного середовища на життєздатність клітин штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 в процесі ліофілізації досліджували захисні середовища наступного складу (%): глюкоза або цукроза – 1,0; 10,0; 30,0; желатоза – 10,0; агар-0,2. Для одержання желатози 10 %-вий розчин желатини готували з використанням бідистильованої води, автоклавували протягом 1 години. Одержаний розчин желатози фільтрували

через фільтрувальний папір, а потім використовували для приготування захисних середовищ. Для одержання суспензії клітин культуральну рідину осаджували центрифугуванням і ресуспендували в захисних середовищах до концентрації (1-2)х10^9 клітин/мл.

Бактерії вносили в захисне середовище з розрахунку концентрації клітин 4х10^6 клітин/мл, потім суспензію в кількості 5 мл вносили у флакони об'ємом 25 мл. Отримані зразки заморожували в низькотемпературному холодильнику «LAB 11/EL19LT» («Elcold», Данія) за температури –80 ^oC. Заморожені зразки переносили в спеціальних касетах в попередньо охолоджену камеру (температура конденсатора –50 ^oC) ліофільної сушарки «CRUODOS-50» («TELSTAR», Іспанія). Тривалість висушування становила 72 год (рис. 2.10).



Рис.2.10 Ліофілізовані бактерії у флаконах

Для виведення живих клітин із стану анабіозу ліофілізований матеріал доводили дистильованою водою до об'єму 5 мл і витримували бактерії за кімнатної температури протягом 0,5 год. Кінцеву вологість контролювали за допомогою аналізатора вологості.При підготовці ліофілізованого матеріалу для досліджень необхідно було виконати дві умови: максимально точно відновити

попередній (до висушування) об’єм матеріалу та вивести живі клітини із стану анабіозу. Для виконання цих умов ліофілізований матеріал доводили дистильованою водою до об’єму 5 мл і витримували бактерії за кімнатної температури в дистильованій воді протягом 30 хв.

2.5 Іммобілізація штамів-продуцентів

Для іммобілізації клітин як носії використовували смужки тканини бельтінгу (Promfiltr, Україна) з площею поверхні 35,4 см^2, феритові кільця (Epcos, ФРН) діаметром 2,1 см^2 та кільця Рашига (Biowin, Польща) діаметром 0,5 см^2 (рис. 2.11). Носії стерилізували автоклавуванням за 2 атм протягом 2 год.

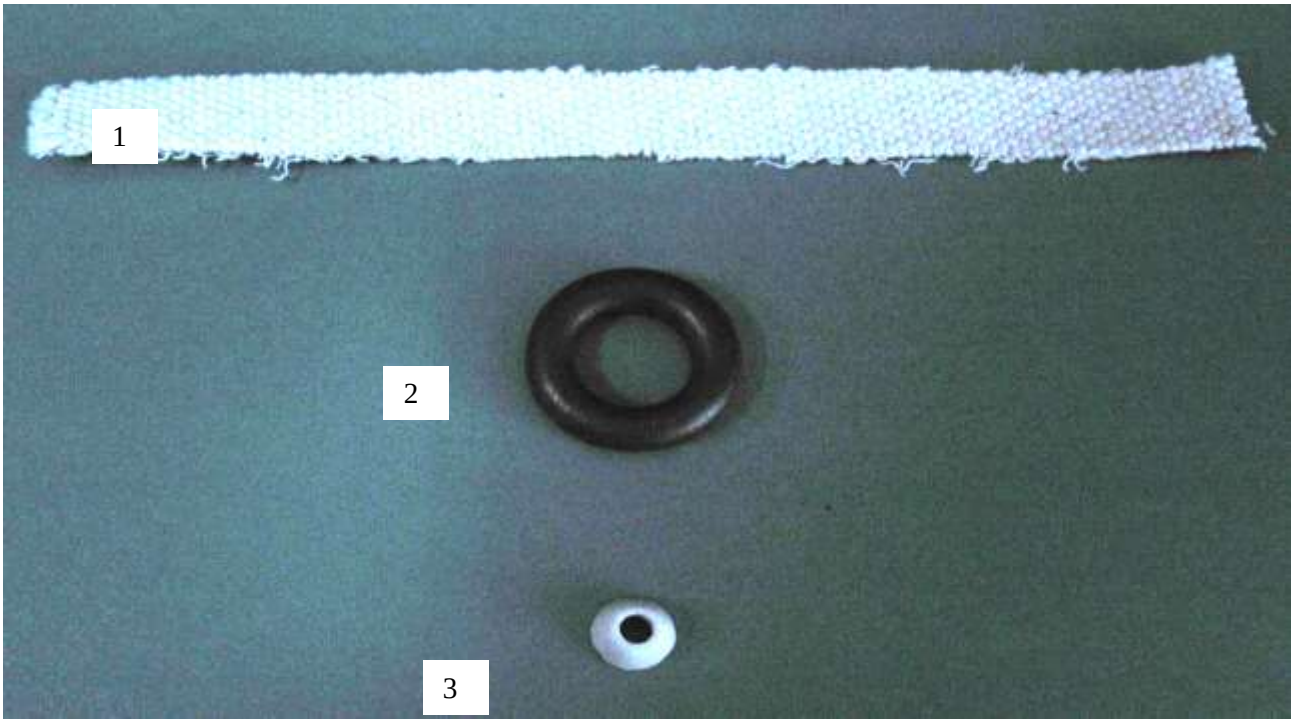


Рис. 2.11 Носії для іммобілізації: 1 – смужки бельтінгу, 2 – феритові кільця, 3 – кільця Рашига

Іммобілізацію клітин на носіях проводили протягом 12 год статичним способом методом адсорбційної іммобілізації. Культивування іммобілізованих клітин культури на носіях проводили за використання техничного гліцерину як субстрату. Через 5 діб культивування припиняли, клітини осаджували за допомогою ультроцентрифуги «Labofuge 400R» (Німеччина), супернатант

переганяли та визначали продукти бродіння.

2.6 Встановлення концентрацій продуктів АБЕ ферментації

В якості негативного контролю використовували стерильне ензиматичне середовище з додаванням $FeCl_3$. Кількість маслянокислого заліза, що утворювалось, визначали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-3 при довжині хвилі 540 нм, чутливості 2. Побудовано калібрувальний графік (ензиматичне середовище з різною концентрацією маслянокислого заліза) та визначено концентрацію масляної кислоти у культуральний рідині. Вихідне середовище слугувало стандартом (рис. 2.12).

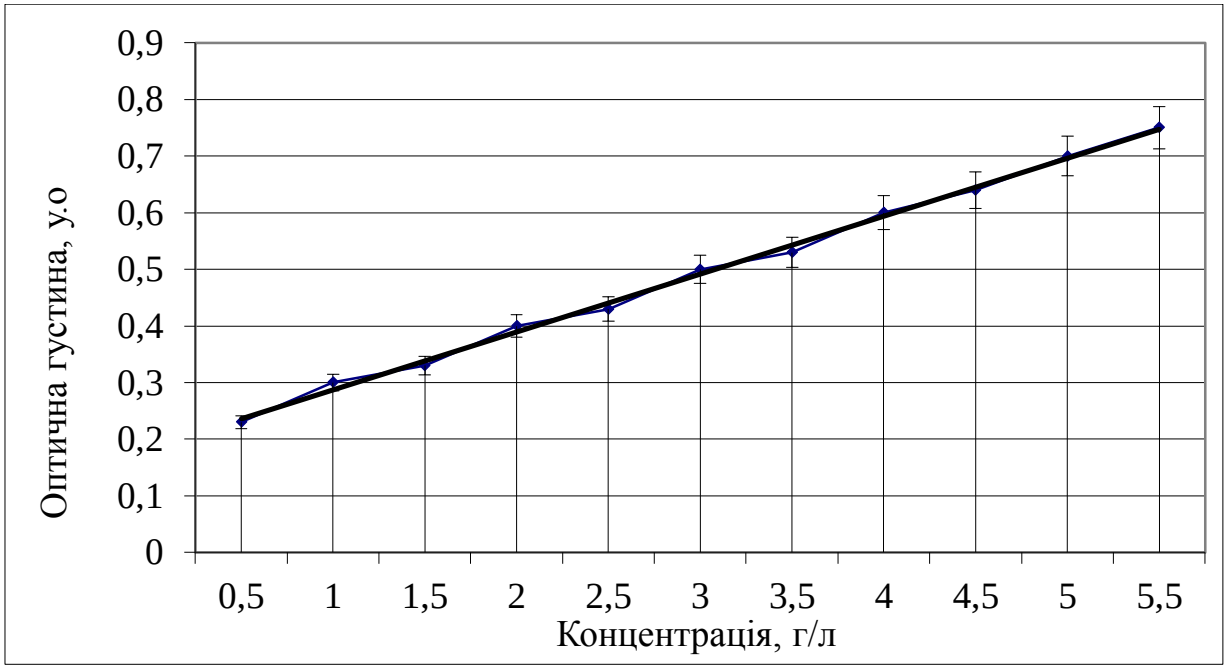


Рис. 2.12 Калібрувальний графік визначення концентрації масляної кислоти

Наявність етанолу, ацетону та бутанолу в культуральній рідині визначали за допомогою газового хроматографа (Agilent-7890A, США) з полум'яно-іонізаційним детектором і набивною колонкою довжиною 3 м, фаза – карбовакс 1500 на хроматоні N-A-W-DMSC (0,20-0,25 мм). Температура колонки 60±2 ºС, випарювача 160±5 ºС, співвідношення потоків азот-водень-повітря 1:1:10. Для

визначення концентрації бутанолу у культуральній рідині було побудовано калібрувальний графік з використанням різних концентрацій бутанолу у дистильованій воді (рис. 2.13).

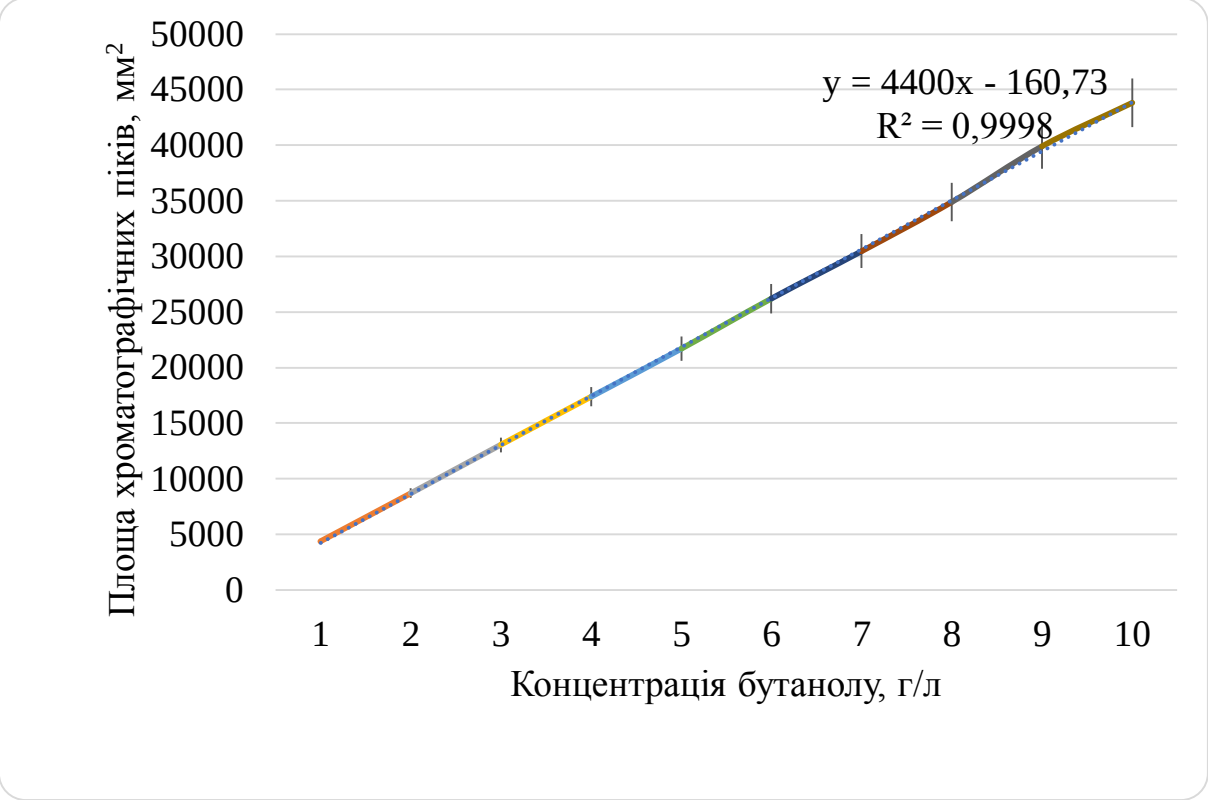


Рис. 2.13 Калібрувальний графік залежності площі хроматографічних піків від концентрації бутанолу

2.7 Секвенування геному штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 та аналіз даних

Ампліфікацію гена 16S рРНК здійснювали за допомогою універсальних праймерів (Fermentas, Латвія) 27f та 907r (27F 5’-AGAGTTTGATGGCTCAG-3’; 907r 5’-CCGTCAATTCCATTTGAGTTT-3’) та 27f і 1492r (27F 5’-AGAGTTTGATGGCTAG-3’; 1492r 5’-TACGGTTACCTTGTTACGACT T-3’). ПЛР проводили на ампліфікаторі «Mastercycler personal 5332» (Eppendorf). Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера з сульфатом амонію,

0,2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Taq-полімерази (Fermentas, Латвія), 2,0 мМ хлориду магнію (Fermentas, Латвія), 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 0,0002 мл.

Після ампліфікації генів нуклеотидну послідовність отриманого амплікону визначали за допомогою секвенатора «ABI PRISM 310 Genetic Analyser» (Applied Biosystems, США). Результат секвенування отримували шляхом порівняння прямої та зворотньокомплементарної послідовностей з використанням програми CLC Main Workbench (CLC bio). Гомологічні послідовності відбирали з бази даних GenBank. Молекулярно-філогенетичний аналіз здійснено за допомогою методу максимальної правдоподібності. Для з'ясування систематичного положення досліджуваних штамів зі спорідненими було проведено вирівнювання відповідних нуклеотидних послідовностей в програмі ClustalW та побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків в програмі MEGA6.

Тотальну ДНК виділяли шляхом лужного лізису з подальшим очищенням протеїну хлороформом (Merk, Німеччина) та екстракцією NaCl (Aplichem GmbH, Німеччина). Отриману загальну ДНК аналізували, як описано (Shekelyan et al. 2021; Wilson, 2001). Секвенування проводили за допомогою Іллюміна NovaSeq (Illumina, США). Бібліотеку секвенування готували за протоколом Іллюміна без ПЛР. Протокол non-ПЛР використовували з метою уникнути артефактів з розподілу рідів 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 штамами, 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

2.8 Конструювання рекомбінантного штаму-продуценту бутанолу

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 данних 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.

MATLAB toolbox CellNetAnalyzer розраховує потік метаболітів через метаболічну мережу, тим самим дозволяє прогнозувати швидкість росту організму або швидкість виробництва біотехнологічно важливого метаболіту.

Першим кроком є математичне представлення метаболічних реакцій. Фундаментальною ознакою цього подання є таблиця у формі числової матриці стехіометричних коефіцієнтів кожної реакції. Ці стехіометрії накладають обмеження на потік метаболітів через мережу. Обмеження, лежать в основі MATLAB toolbox CellNetAnalyzer, диференціюючи підхід з теоретичних моделей, що базуються на біофізичних рівняннях, що потребують багатьох кінетичних параметрів, що важко виміряти. Метаболічні реакції представлені у вигляді стехіометричної матриці (S), розміром m*n. Кожен рядок цієї матриці являє собою одну унікальну сполуку (для системи з m сполуками) і кожен стовпчик представляє одну реакцію (n реакції). Записи в кожному стовпчику є стехіометричними коефіцієнтами метаболітів, що беруть участь у реакції. Існує негативний коефіцієнт для кожного споживаного метаболіту та позитивний коефіцієнт для кожного метаболіту, який виробляється. Для кожного метаболіту, який не бере участі в певній реакції, використовується стехіометричний коефіцієнт нуля. S – рідкісна матриця, оскільки більшість біохімічних реакцій включають лише кілька різних метаболітів. Потік через всі реакції в мережі представлений вектором v, який має довжину n. Концентрації всіх метаболітів представлені вектором x, довжиною м. Система магнітних балансових рівнянь у стаціонарному стані -(dx / dt = 0).

По-перше, побудована метаболічна реконструкція мережі, яка складається зі списку стехіометрично збалансованих біохімічних реакцій. Далі ця реконструкція перетворюється на математичну модель, утворюючи матрицю (мітку S), в якій кожен рядок являє собою метаболіт, і кожен стовп представляє собою реакцію. У стаціонарному стані потоки через кожну реакцію дають рівняння Sv = 0. Оскільки у великих моделях є більше реакцій, ніж метаболітів, існує більш ніж одне можливе рішення цього рівняння. Цільова функція визначається як Z = cTv, де c – вектор ваг (що вказує, наскільки кожна реакція сприяє об'єктивній функції). На практиці, коли бажана лише одна реакція для максимізації або мінімізації, c – вектор нулів з одним у положенні реакції, яка представляє інтерес. Нарешті, лінійне програмування може бути використане

для ідентифікації певного розподілу потоків, що максимізує або мінімізує цю цільову функцію, одночасно дотримуючись обмежень, що накладаються рівняннями балансу маси та межами реакції.

Будь-яке V, що задовольняє це рівняння, вважається в нульовому просторі S. Sv = 0. У будь-якій реалістичній великомасштабній метаболічній моделі є більше реакцій, ніж існують сполуки (n > m). Іншими словами, є більше невідомих змінних, ніж рівнянь, тому для цієї системи рівнянь немає єдиного рішення.

Математично ціль представляється «об'єктивною функцією», яка вказує, наскільки кожна реакція сприяє фенотипу. Взагалі, математичні уявлення про метаболічні реакції та фенотип визначають систему лінійних рівнянь з обмеженнями.

Обмеження представлені двома способами: рівняннями, які балансують вхідні і вихідні результати реакції, а також нерівності, які встановлюють межі системи. Матриця стехіометрів накладає обмеження на баланс потоку (тобто маси), забезпечуючи, щоб загальна кількість будь-якої сполуки, що виробляється, дорівнювала загальній кількості споживаної в стаціонарному стані. Кожна реакція також може бути дана верхня і нижня межі, які визначають максимальні та мінімальні допустимі потоки реакцій. Ці баланси та межі визначають простір допустимих розподілів потоку системи, тобто темпи, при яких кожен метаболіт споживається або виробляється за допомогою кожної реакції. Інші обмеження також можуть бути додані.

Для побудови моделі за основу була взята модель для *C. pasteurianum* DSM 525 та 28 основних реакцій. Відсоток загального потоку бутанолу, розраховувався на припущення, що ферменти функціонують при їхній Vmax максимальна швидкість реакції (h-1) та використовують кількість кожного білка на клітину.

Також було застосовано обмеження зворотності термодинамічних реакцій, що базуються на розрахунках вільної енергії Гіббса методом групового вкладу (Підгорний та ін., 2020). Це було зроблено шляхом обчислення вільної енергії

Гіббса всіх реакцій шляху, використовуючи раніше опубліковані методи та оціночні значення для стандартної вільної енергії утворення Гіббса ΔfG'∘est та оцінкою стандартної вільної енергія реакції Гіббса

$$\Delta rG'^{\circ}est=\Sigma i=1mni\Delta fG'^{\circ}est, \quad (2.11)$$

$$\Delta rG'=\Delta rG'^{\circ}est+RTln(\Pi i=1m(ci\gamma i)ni), \quad (2.12)$$

Негативна енергія реакції Гіббса необхідна для метаболічної реакції, і була розрахована для м-сполук хімічної реакції з стехіометричними коефіцієнтами n, де R – ідеальна газова константа, а припустима температура T – 298 ºK. Мілімолярні концентрації c_i, компонентів реакції та безмірних коефіцієнтів активності γi були використані для розрахунку концентраційно-залежного терміну вільної енергії Гіббса рівняння реакції. Як показано раніше, стандартна похибка в ΔfG'∘est та ΔrG'∘est членах, розрахована за теорією групових внесків, перевищувала вплив іонної сили, незважаючи на ілюстрацію її сильного впливу на ΔrG '. Враховуючи ці результати, для наших розрахунків коефіцієнти активності були встановлені на 1. Для запропонованих шляхів у *C. pasteurianum* DSM 525, не похідних до мережевих баз даних (наприклад, KEGG), були розраховані комбінації концентрацій метаболітів, що дають негативні значення ΔrG 'для кожної реакції на шляху. Шляхи, нездатні для отримання негативних значень ΔrG 'для кожної реакції, термодинамічно недосяжні. Отримані метаболічні концентрації порівнювали з виміряними концентраціями фізіологічного метаболіту *C. pasteurianum* DSM 525 (якщо це можливо) для оцінки практичності запропонованої реакції, подібної до того, що робили для гліколізу (Schmitz et al., 2019). Для випадків, коли не всі дані про метаболіт були доступними, були розраховані діапазони концентрацій метаболітів, при яких є можливим запропонований шлях. Відзначено, що в даний час існує широкий спектр короткочасних термодинамічних аналізів метаболічних шляхів. Окрім очевидних точних ΔfG'∘est і розрахунків іонної сили цитоплазми, вплив внутрішньоклітинних змін pH на ΔrG'∘est не враховується в наших розрахунках,

оскільки для всіх випадків прийнято pH 7. Крім того, залишки заряду виконувалися, використовуючи тільки основні протоновані види при pH 7, щоб вони відповідали розрахункам ΔfG'∘est (Підгорний та ін., 2020).

Було враховане й значення «потоку специфічних протонів» (SPF). Це значення є негативним, коли протони залишають клітину і позитивні, коли протони беруться до комірки. Для випадку з *C. pasteurianum* DSM 525 SPF (Schmitz et al., 2019) дуже негативний при експоненціальному рості (ацидогенезі) і трохи виявляється позитивним у стаціонарній фазі (сольвентогенезі). У цьому дослідженні SPF було обмежено певними значеннями шляхом обмеження реакції обміну протонів (сумарний потік протонів в межах / межах систем). Діапазон SPF був між -30 ммольH^+/год·гСВК (протонний вихід) та 5 ммольH^+/год·гСВК (приплив протонів), а межі були вибрані з експериментальних спостережень.

Обмеження потоку співвідношення були включені безпосередньо в стехіометричну матрицю, що дозволило вирішити проблему балансування потоку шляхом простого лінійного програмування. Було досліджено декілька співвідношень потоку, наприклад, критична точка метаболічної гілки була виявлена під час використання пулу метаболітів ацетил-КоА. У клостридіальному метаболізмі ацетил-КоА можна використовувати для одержання продуктів АБЕ ферментації або макромолекул для отримання біомаси. Маршрути, зроблені ацетил-КоА, або регенерують або споживають різні кількості АТФ і НАД(Р)+. Зрештою, балансування цих кофакторів визначає виробництво продуктів АБЕ ферментації. Велика кількість ступенів свободи, пов'язана з моделлю клостридіального метаболізму в геномному масштабі, дозволяє отримати велику кількість комбінацій з виробництва продуктів АБЕ ферментації, що задовольняють балансування кофактора та загального балансу маси, одночасно забезпечуючи цільові функції оптимізації. Таким чином, співвідношення потоку в кінцевому підсумку зменшує кількість ступенів свободи системи і може використовуватися для визначення селективності. Наступний приклад демонструє застосування співвідношення потоку,

пов'язаного з споживанням ацетил-КоА, і включенням співвідношення цього потоку в стехіометричну матрицю. При АБЕ ферментації є дві можливості для ацетил-КоА (Tigunova et al., 2013): (2.13) використання тіолазним ферментом (THL) для перетворення на ацетоацетил-CoA і (2.14) використання фосфатрансацетилазним ферментом (ПТА) для перетворення в ацетилфосфат. Реакції, які каталізуються цими ферментами, наведені в рівняннях.

$$2\text{ацетил}-\text{КоА}-\!\!\rightarrow -\text{THL}\text{ацетил}-\text{КоА}+\text{КоА}, \quad (2.13)$$

$$\text{ацетил}-\text{КоА}+\text{ортофосфат}-\!\!\rightarrow -\text{ПТА}\text{ацетил-фосфат}+\text{КоА}, \quad (2.14)$$

Далі передбачається співвідношення потоків для цих реакцій. Для цього гіпотетичного прикладу передбачається, що через реакцію THL, ніж реакція ПТА (рівняння 2.15), протікає в два рази більше потоку. Зрештою, для розрахунку співвідношення потоку можна використовувати біохімічні витоки різних потоків за допомогою конкуруючих реакцій, якщо вони відомі. Потік через реакцію, каталізується THL, є f (rTHL), а потік через реакцію, каталізуючу ПТА, становить f (rPTA). Це співвідношення потоку називається f (rTHL): f (rPTA) і представлено як рівняння 2.15:

$$f(\text{rTHL}):f(\text{rPTA})=f(\text{rTHL})/f(\text{rPTA})=2, \quad (2.15)$$

Щоб побудувати це обмеження співвідношення потоку в стехіометричній матриці (S), перше рівняння переставляється наступним чином:

$$f(rTHL) - 2f(rPTA) = 0, \quad (2.16)$$

Далі до стехіометричної матриці додано новий рядок. У цьому новому рядку додаються два значення (всі інші значення в рядку дорівнюють нулю). У колонці, що представляє реакцію, каталізуючу THL, коефіцієнт 1 додається до матриці. У колонці, що представляє реакцію, каталізуючу PTA, додано коефіцієнт -2 (у новому рядку). З цими доповненнями, коли буде вирішено

рівняння потоку ($S \cdot v = 0$), співвідношення потоків для реакцій рівняннянь буде рівно 2. Якщо вибране співвідношення потоку призводить до неможливого рішення метаболізму мережа, рішення рівняння потоку не буде знайдено. З метою переорієнтації потоку метаболізму на шлях виробництва бутанолу *C. pasteurianum* DSM 525 було використано опублікований алгоритм OptForce (https://www.maranasgroup.com/submission/optforce.htm), що надає можливість ідентифікувати як перехресні експресії гена, так і нокдауни, необхідні для метаболічної мережі, для отримання цільової кількості вказаного продукту.

2.9 Спільне культивування

Для підготовки сировини за допомогою вищих грибів *P. djamor*, *P. ostereatus*, *H. myxotricha*, *A. aurea*, *L. lusciana*, *S. canmune*, *S. litschaneri*, *Crinipellis*, їх культивували протягом двох тижнів за температури 28 ºС на заторі з дротовидного проса. Для подальших досліджень використовували культуральну рідину разом з біомасою грибів, стерильну та не стерильну. Стерилізували за тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

Для підготовки сировини за допомогою *A. awamori* UCM F-100017, *A. niger* IFBG 4, *A. orizae* IFBG 49-B добову культуру гриба у кількості 4 % від об'єму середовища вносили разом з штамом-продуцентом бутанолу. Для отримання посівної культури гриба використовували солодове сусло з 8 % вмістом редукуючих речовин. Культивування проводили проготягом 24 годин за 30 ºС, у 750 мл качалочних колбах з 50 мл заповненням у шейкері-інкубаторі «BIOSAN» (Латвія) за швидкості 240 об/хв. Для зрівняння ефективності со-культивування використовували средовища з додаванням 5 % масляної кислоти, як попередника синтезу бутанолу.

Спільне культивування *S. graminifolii* та *Clostridium* sp. UCM B-7570 було проведено за двома схемами. В першому випадку інокулят обох культур вносили у ферментаційне середовище одночасно. У другому – *S. graminifolii* вносили в ензиматичне середовище та культивували в шейкері-інкубаторі «BIOSAN ES-

20» (Латвія) протягом 72 годин за температури 28 °С та швидкості перемішування 240 об/хв, після чого додавали *Clostridium* sp. UCM B-7570 та термостатували у стані спокою за 35 °С.

2.10 Статистична обробка результатів

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. Різниця між двома середніми значеннями вважалася вірогідною при $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3
СТВОРЕННЯ МОДЕЛІ РЕКОМБІНАНТНОГО ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТУ З ПІДВИЩЕНИМ НАКОПИЧЕННЯМ БУТАНОЛУ

3.1. Філогенетичний аналіз *Clostridium* sp. UCM B-7570

Для ідентифікації видів бактерій широко використовують молекулярно-генетичні методи. Найпопулярнішим є секвенування гена 16S рРНК з наступним порівнянням між секвенованим фрагментом і послідовностями в GenBank (Johnson et al., 2019). У результаті секвенування 16S рРНК *Clostridium* sp. UCM B-7570 виявлено 99 % схожість із типовим штамом *C. pasteurianum* DSM 525. 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. (рис. 3.1). 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. Масштабна шкала вказує на 0,01 заміни на позицію нуклеотиду.

Тому ми пропонуємо, щоб назва *Clostridium pasteurianum* була обмежена тими штамами, які генетично тісно пов'язані з ATCC 6013 (до яких входять штами *C. pasteurianum* DSM 525 і *C. pasteurianum* CECT). 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. Послідовності генів 16S рРНК, ідентифіковані в цьому дослідженні, доступні в GenBank під такими номерами доступу: NR_104822.1 *C. pasteurianum* ATCC 6013, NR_113023.1 *C. pasteurianum* DSM 525, FR870440.1 *C. pasteurianum* CECT.

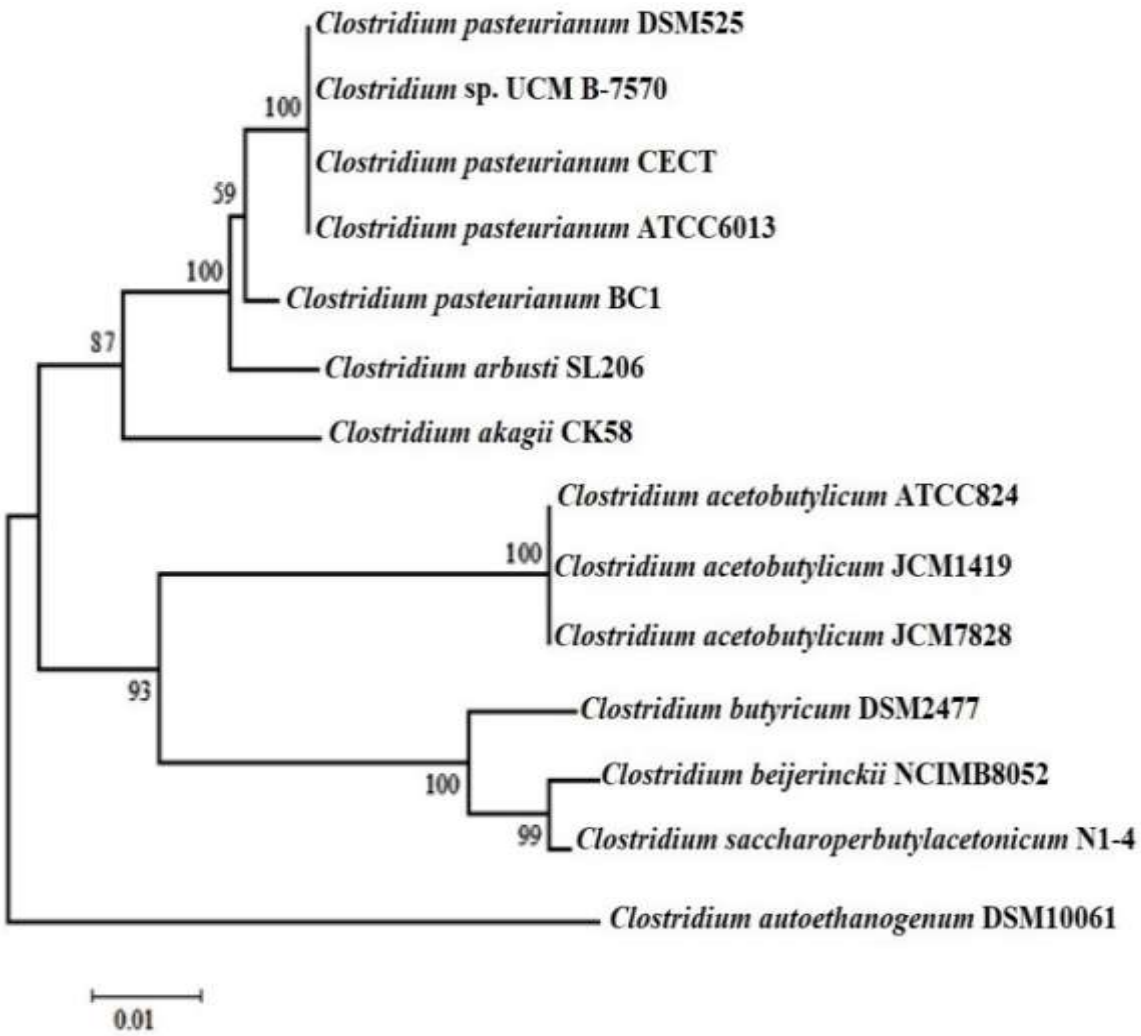


Рис. 3.1 Дендрограма генетичних зв'язків між *Clostridium* sp. UCM B-7570 та різними видами роду *Clostridium*

3.2 Визначення основних характеристик геному штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570

Сумарну ДНК виділяли методом м'якого лізису із подальшою очисткою від білків хлороформом в присутності NaCl. Одержану сумарну ДНК аналізували елекрофоретично (рис. 3.2) та спектрофотометрично (табл. 3.1). Геном штаму *Clostridium* sp. складається з 6 каркасів загальною довжиною 4 470 321 bp (рис. 3.3). Синій графік – розподіл GC-вмісту. Найбільший зі скаффолдів становив 2 195 989 bp, а найменший – 19 406 bp. Вміст гунін-цитозину (ГЦ) геному визначено на рівні 29,7 %, що відповідає вмісту ГЦ геномів інших видів

Clostridium (табл. 3.2).

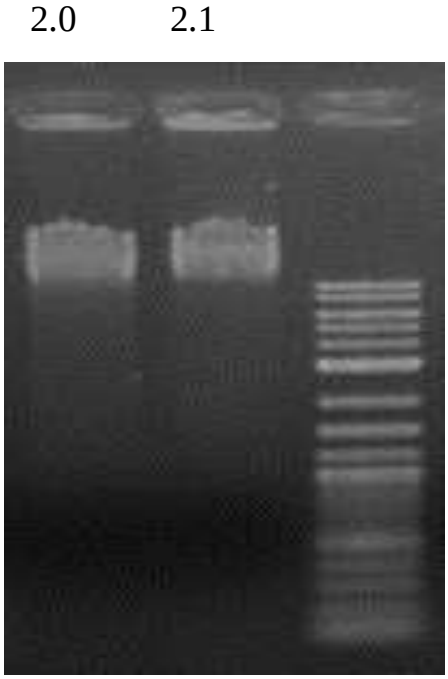


Рис. 3.2 Електрофореграмма сумарної ДНК штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570

Таблиця 3.1

Спектрофотометричний аналіз виділеної ДНК

	Clostridium sp. 2.0	*Clostridium* sp. 2.1
Концентрація	734,0 нг/мкл	761,7 нг/мкл
260/230	2,1	2,2
260/280	1,9	1,96
Об`єм	100 мкл	100 мкл

Геном кодує 4262 гени, 4057 з яких кодують протеїнів. Геном також містить 30 оперонів рРНК і 80 оперонів тРНК. Цей геном, як і у більшості видів *Clostridium*, містить обидва гени резольвази xerD/xerC, необхідні для організмів

із кільцевими геномами. Таким чином, можна припустити, що хромосома цього штаму має кільцеву будову (рис. 3.4).

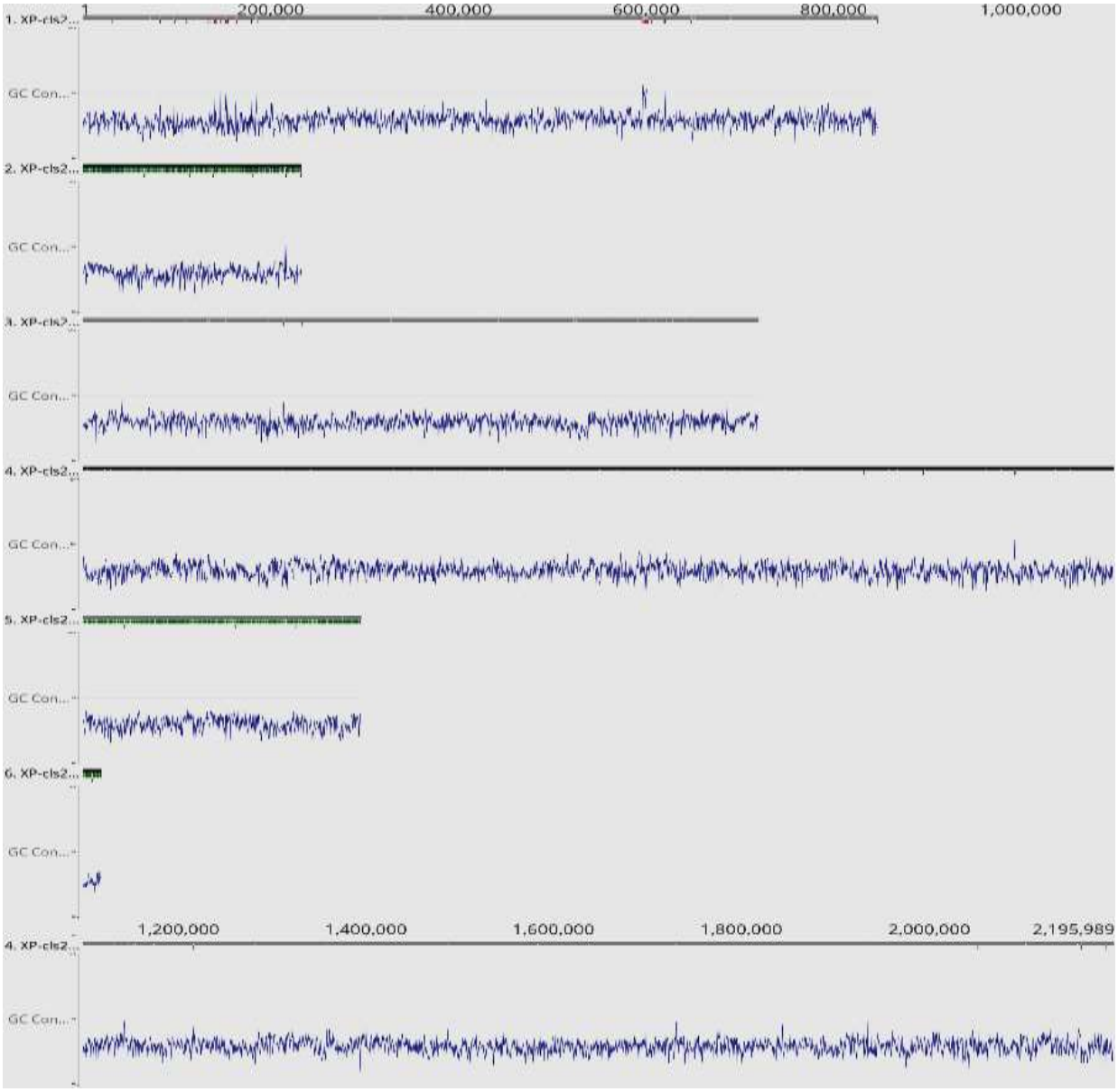


Рис. 3.3 Мапа геному штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 без транспозонів

На рис. 3.4 мапу геному *Clostridium* sp. UCM B-7570 зображено як кільцеву хромосому та показано приблизне розташування ключових геномних особливостей, які обговорюються в цьому дослідженні. Два крайніх кола вказують на розташування ділянок кодування гена (синій) у ланцюгах плюс (один) і мінус (коло два). Гени, що кодують тРНК та рРНК, показані кольором фуксії та світло-блакитним відповідно. Коло три показує вміст G+C (відхилення

від середнього), а коло чотири зображує перекіс G+C у плюсових (зелених) і мінусових (фіолетових) ланцюгах. Шкала генома вказана в Mbp на самому внутрішньому колі. Для побудови карти геному використовувався онлайн-інструмент Proksee.

Таблиця 3.2

Основні характеристики геному *Clostridium* sp. UCM B-7570

Геном	**Значення**
Хромосома	
Розмір bp	4 470 321
ГЦ-вміст	29,7
Кількість генів	4262
Гени, які кодують протеїни	4057
рРНК оперони	14
тРНК оперони	59
нкРНК	6
Скефолди	
XP-cls21_AS6_SC1	847277
XP-cls21_AS6_SC2	232621
XP-cls21_AS6_SC3	719772
XP-cls21_AS6_SC4	2195989
XP-cls21_AS6_SC5	296059

Мультилокусний філогенетичний аналіз штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 виявив, що його найбільш близьким видом є *Clostridium pasteurianum* DSM 525 (Pyne et al., 2016) із 100 % a.a. ідентичності по 8 локусам (*gyrB*, *rpoB*, *rpoD*, *atpD*, *infB*, *truA*, *groL* та *recA*). Так, *Clostridium* sp. є новим штамом *C. pasteurianum*. У геномі штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 ідентифіковано гени задіяні у ферментації бутанолу (рис. 3.4).

Центральний ферментативний метаболізм *C. pasteurianum* є безпрецедентним за своєю природою, оскільки в цьому організмі поєднуються метаболічні шляхи, які існують незалежно один від одного в інших клостридіях (Pyne et al., 2016).

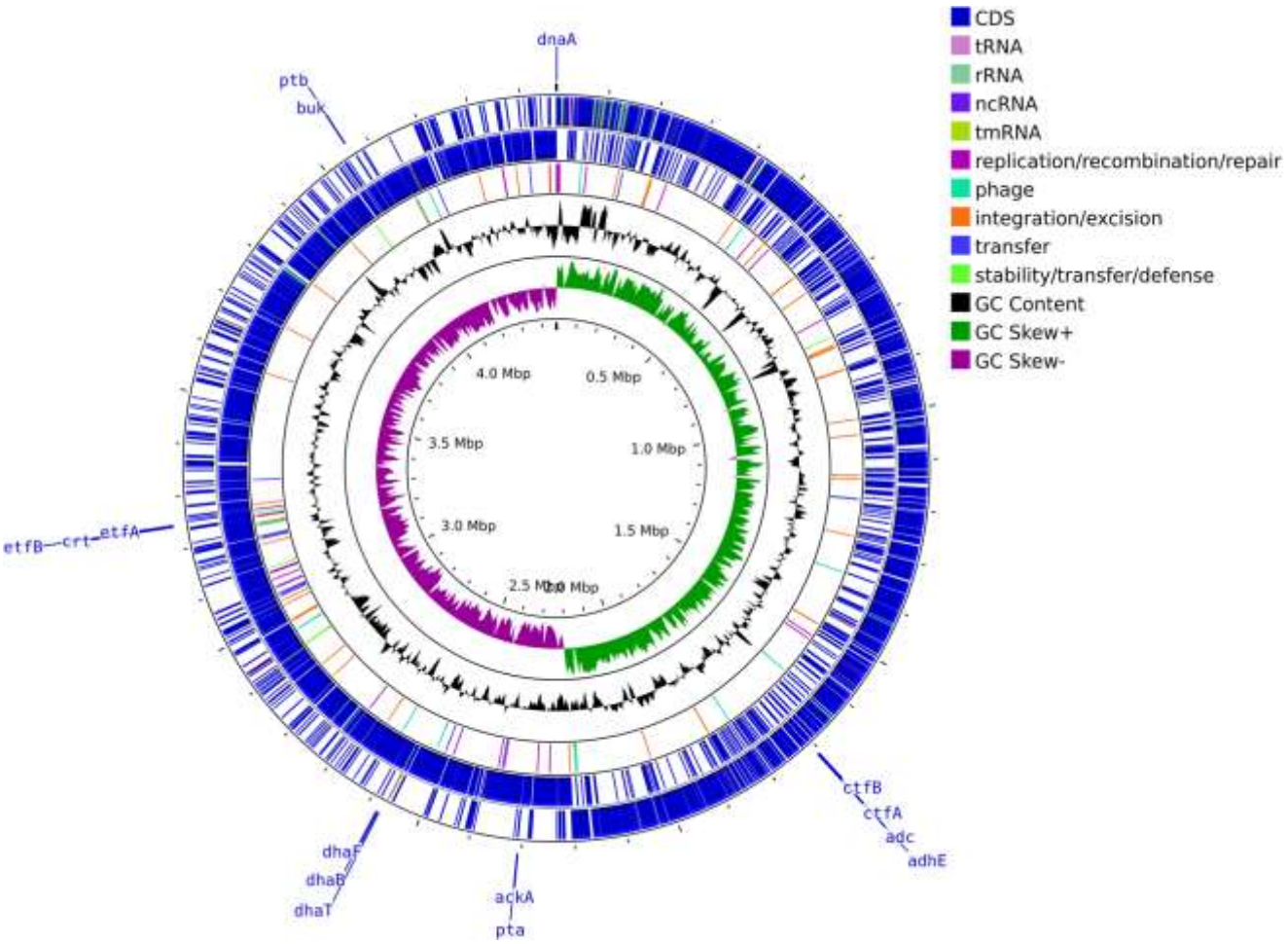


Рис. 3.4 Мапа хромосоми *Clostridium* sp.UCM B-7570

Слід відмітити, що *C. pasteurianum* має шляхи утворення бутирату та бутанолу, характерні для виробництва продуктів АБЕ ферментації у інших клостридіях, наприклад, *C. acetobutylicum* та *C. beijerinckii* (Tigunova et al., 2013). І навпаки, цей організм зазвичай не виробляє ацетон, основний побічний продукт історичного ферментативного АВЕ-процесу. Крім того, за певних умов культивування *C. pasteurianum* виявляє високоактивний 1,3-пропандіоловий шлях, подібний до *C. butyricum*, у якого відсутній активний шлях виробництва

бутанолу. Центральний метаболізм *C. pasteurianum* є складним і суттєво залежить від субстрату.

3.3. Характеристика кластерів генів основних метаболічних шляхів

У данному дослідженні було визначено та проаналізовано гени, що кодують ензими, які беруть участь у ферментації бутанолу (рис. 3.5 і табл. 3.3).



Рис. 3.5 Кластерна організація генів, які беруть участь у метаболізмі бутанолу

П’ять генів (*hbd, etfB, etfA, bcd і crt*), залучених до метаболізму бутанолу, показано разом із їхніми нуклеотидними позиціями. Подібно до *C. acetobutylicum* і *C pasteurianum* (Pyne 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*). 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 B-7570 також містив гени золь-оперону, організовані в солвентогенний оперон. Його було ідентифіковано на кластері 4. Цей метаболічний шлях відповідає за виробництво ацетону з ацетоацетил-КоА (рис. 3.6 і табл. 3.4). Чотири гени (*adhE, ctfA, ctfB і adc*), що беруть участь у

метаболізмі ацетону та ацетил-КоА, показані разом із їхнім положенням у хромосомах. Чотири подібні послідовності до біфункціональної ацетальдегід-КоА/алкогольдегідрогенази (ацетальдегіддегідрогенази/алкогольдегідрогенази), кодованої генами *adhE* та a*dhE1* у *C. pasteurianum* DSM 525, були виявлені в геномі *Clostridium* sp. UCM B-7570. Також були виявлені гени, що кодують ензими, які беруть участь у метаболізмі ацетату та бутирату: ацетаткіназу (*ackA*), фосфатацетилтрансферазу (*pta*), бутираткіназу (*buk*) та фосфатбутирилтрансферазу (*ptb*) (табл. 3.5).

Таблиця 3.3

Характеристики кластера генів метаболізму бутанолу

Ген	Орієнтація	Початок	Кінець	Продукт	Локус
crt	реверс	3244343	3243495	3-гідроксибутирил-КоА дегідрогеназа	OSC52_15505
etfA	реверс	3245488	3244475	Переносник електронів флавопротеїн субодиниця альфа/ FixB родина протеїнів	OSC52_15510
etfB	реверс	3246293	3245511	Переносник електронів флавопротеїн субодиниця бета/ FixB родина протеїнів	OSC52_15515
bcd	реверс	3247451	3246312	ацил-КоА дегідрогеназа	OSC52_15520
hbd	реверс	3248255	3247467	Коротколанцюгова енол-КоА гідротаза	OSC52_15525

Нарешті, гени, що кодують шлях біосинтезу 1,3-пропандіолу, були локалізовані на 2 каркасах геному штаму (рис. 3.7 і табл. 3.6). Вісім генів (*dhaT,*

orfY, orfW, dhaG, dhaF, dhaE, dhaC і dhaB), які беруть участь у метаболізмі 1,3-пропандіолу, показані разом з їхнім нуклеотидним положенням у хромосомі. Велика субодиниця гліцеролдегідратази є протеїном, який бере участь у біосинтезі 1,3-пропандіолу. Ензим кодується геном *dhaB* і був ідентифікований у геномі *C. pasteurianum*, але не в *C. acetobutylicum* або C. *beijerinckii*.

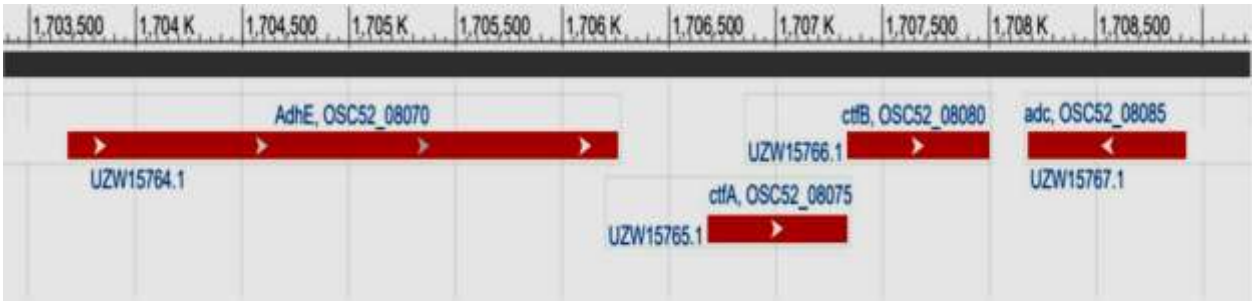


Рис. 3.6 Кластерна організація генів, які беруть участь у метаболізмі ацетону та ацетил-КоА

Таблиця 3.4

Характеристики кластера генів метаболізму ацетону

Ген	Орієнтація	Початок	Кінець	Продукт	Локус
adhE	форвард	1703680	1706259	Біфункціональна ацетальдегід-КоА/алкоголь дегідрогеназа	OSC52_08070
ctfA	форвард	1706680	1707333	3-оксикислота КоА-трансфераза субодиниця А	OSC52_08075
ctfB	форвард	1707334	1707999	3-оксикислота КоА-трансфераза субодиниця В	OSC52_08080
adc	реверс	1708925	1708185	Ацетоацетат декарбоксилаза	OSC52_08085

Таблиця 3.5

Характеристики генів, які беруть участь у метаболізмі ацетату та бутирату

Гени	Оріентація	Початок	Кінець	Продукт	Локус
ackA	реверс	2306818	2305613	Ацетат кіназ	OSC52_10940
pta	реверс	2306953	2307954	Фосфат ацетилтрансфераза	OSC52_10945
buk	реверс	4059338	4058271	Бутират кіназа	OSC52_19225
ptb	реверс	4060318	4059413	Фосфат бутирилтрансфераза	OSC52_19230

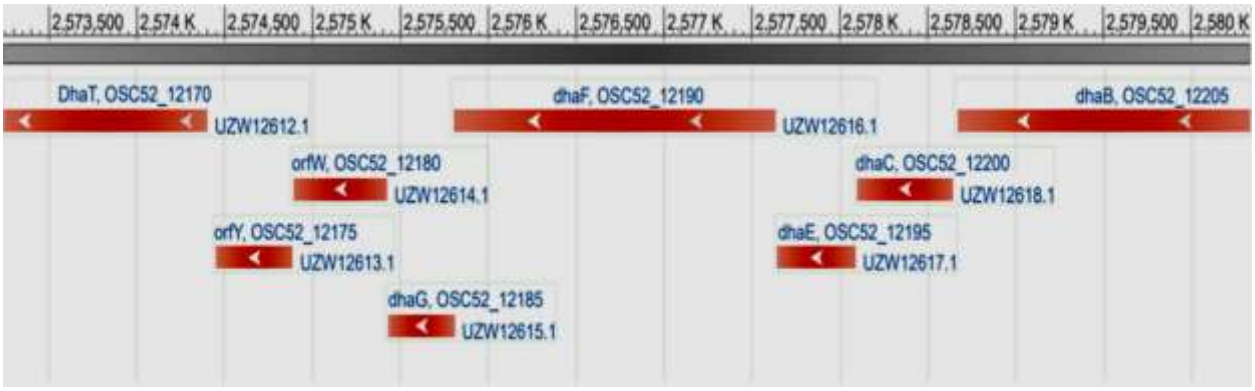


Рис. 3.7 Кластерна організація генів метаболізму 1,3-пропандіолу

Рід *Clostridium* охоплює різні види, які можуть використовувати широкий спектр субстратів за допомогою різноманітних метаболічних шляхів, утворюючи різні біопродукти (Olorunsogbon et al., 2024). Одним із найбільш актуальних застосувань клостридій є виробництво біобутанолу (Ponsetto et al., 2024). Багато видів роду *Clostridium* в даний час вивчаються як біотехнологічно важливі види, зокрема *C. pasteurianum* (Zhang, 2024). Він вважається найбільш перспективним виробником біопалива через його здатність перетворювати гліцерин на бутанол, але відсутність ефективного підходу генної інженерії для маніпулювання цим видом, а також недостатня інформація про організацію геному перешкоджає широкому використанню *C. pasteurianum* (Pyne et al., 2013).

Таблиця 3.6

Організація кластерів генів та анотація метаболізму 1,3-пропандіолу

Гени	Орієнтація	Початок	Кінець	Продукт	Локус
dhaT	реверс	2574398	2573241	1,3-пропандіол дегідрогеназа	OSC52_12170
orfY	реверс	2574884	2574453	heme-звязуючий протеїн	OSC52_12175
orfW	реверс	2574899	2575420	cob(I)сечової кислоти a,c-діамід аденозил-трансфераза	OSC52_12180
dhaG	реверс	2575805	2575434	Гліцерол дегідратаза реактіваза бета/малої субодиниці протеїнової родини	OSC52_12185
dhaF	реверс	2577631	2575811	Діолдегідратаза реактиваза субодиниці альфа	OSC52_12190
dhaE	реверс	2578088	2577648	Діолдегідратаза малої субодиниці	OSC52_12195
dhaC	реверс	2578642	2578103	Пропандіол / гліцерольної родини дегідратаза середня субодиниця	OSC52_12200
dhaB	реверс	2580337	2578673	Пропандіол / гліцерольної родини дегідратаза велика субодиниця	OSC52_12205

Наразі у GenBank доступні дев’ять збірок геномів та звіти про анотації шести штамів *C. pasteurianum*. Середні значення їх такі: загальна довжина

43521 Mb, 3912 протеїнів і вміст GC 29,9 %; плазміда спостерігалася лише у *C. pasteurianum* BC1. Характеристики деяких секвенованих геномів описані в табл. 3.7.

Таблиця 3.7

Порівняння секвенованих геномів *C. pasteurianum*

	Штам				
Характеристика	ATCC 6013 / DSM525 (Pyne et al., 2016)	ATCC 6013 (Rotta et al., 2015)	DSM 525 (Poehlein et al., 2015)	DSM 525 (Rappert et al., 2013)	UCM B-7570
Статус	1 лінейний контиг	Повністю	Повністю	37 контиги	
Розмір, bp	4373654	4351893	4352101	4352101	4470321
Вміст ГЦ, %	29,9	29,9	30,0	30,0	29,7
Плазміди	Немає	Немає	Немає	Немає	Немає
Протеїн-кодуючі генів	3803	3791	3791	3766	4057
тРНК генів	81	81	81	74	80
рРНК генів	30	30	30	3	30

Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей генів, які беруть участь у метаболізмі бутанолу між *C. pasteurianum* UCM B-7570 і типовими штамами *C. acetobutylicum* DSM 1731 і ATCC 824, а також типовими штамами *C. beijerinckii* ATCC 35702 і NCIMB 8052, виявив деякі відмінності в кількості та подібності ферментів. Вищу подібність послідовностей спостерігали для *C. acetobutylicum*, тоді як числову подібність було визначено для *C. beijerinckii* ATCC 35702. Результати BLAST виявили 80,4 % і 70 % подібність протеїна до фосфотрансбутирилази штамів типу *C. acetobutylicum* і *C. beijerinckii*, хоча

бутират кіназа мала дещо нижчу подібність 73,16 % і 68,56 %, відповідно.

Аналіз ензимів, які беруть участь у ферментації бутанолу, показав, що рівень подібності між *C. pasteurianum* UCM B-7570 і типовими штамами *C. acetobutylicum* коливався від 71 % (еноіл-КоА гідратаза) до 87 % (ацил-КоА дегідрогеназа) і від 70 % (бета-субодиниця флавопротеїну транспорту електронів) до 83,6 % (ацил-КоА-дегідрогеназа) порівняно зі штамами типу *C. beijerinckii*. Таким чином, ацил-КоА-дегідрогеназа має найвищу протеїнову ідентичність серед трьох видів.

Геномний аналіз, наведений у роботі, а також попередні дослідження метаболізму *C. pasteurianum* (Biebl, 2001; Schwarz et al., 2017) й інноваційні генетичні технології (Sandoval et al., 2015), призведуть до продуктивної метаболічної інженерії та створенню стабільних мутантних штамів на основі *C. pasteurianum*. Бутанол є найбільш перспективним кінцевим продуктом метаболізму *C. pasteurianum*, тому успішна комерційна біотехнологія бутанолу є важливою та складною метою майбутньої генної інженерії.

3.4 Виділення та ідентифікація нового лігнолітичного штаму *Streptomyces graminifolii*

Ефективність мікробного перетворення рослинної біомаси на біопаливо може бути максимізована лише за умови споживання целюлози, геміцелюлози та лігніну (Grgas et al., 2023). Застосування штучних мікробних консорціумів для біотехнологічних виробничих процесів є новою сферою досліджень (Medina et al., 2024), оскільки вона пропонує великий потенціал для вдосконалення встановлених, а також розробки нових процесів (Mittermeier et al. 2022). Чільне місце серед лігнінолітичних бактерій займають бактерії роду *Streptomyces* (Cuebas-Irizazzy et al. 2024), тому саме них було обрано для спільного культивування з клостридіями для підвищення накопичення бутанолу. Для виявлення актиноміцетів було досліджено 9 зразків ґрунтів, відібраних в п’яти областях України (табл. 2.1). 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 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 (рис. 3.8).

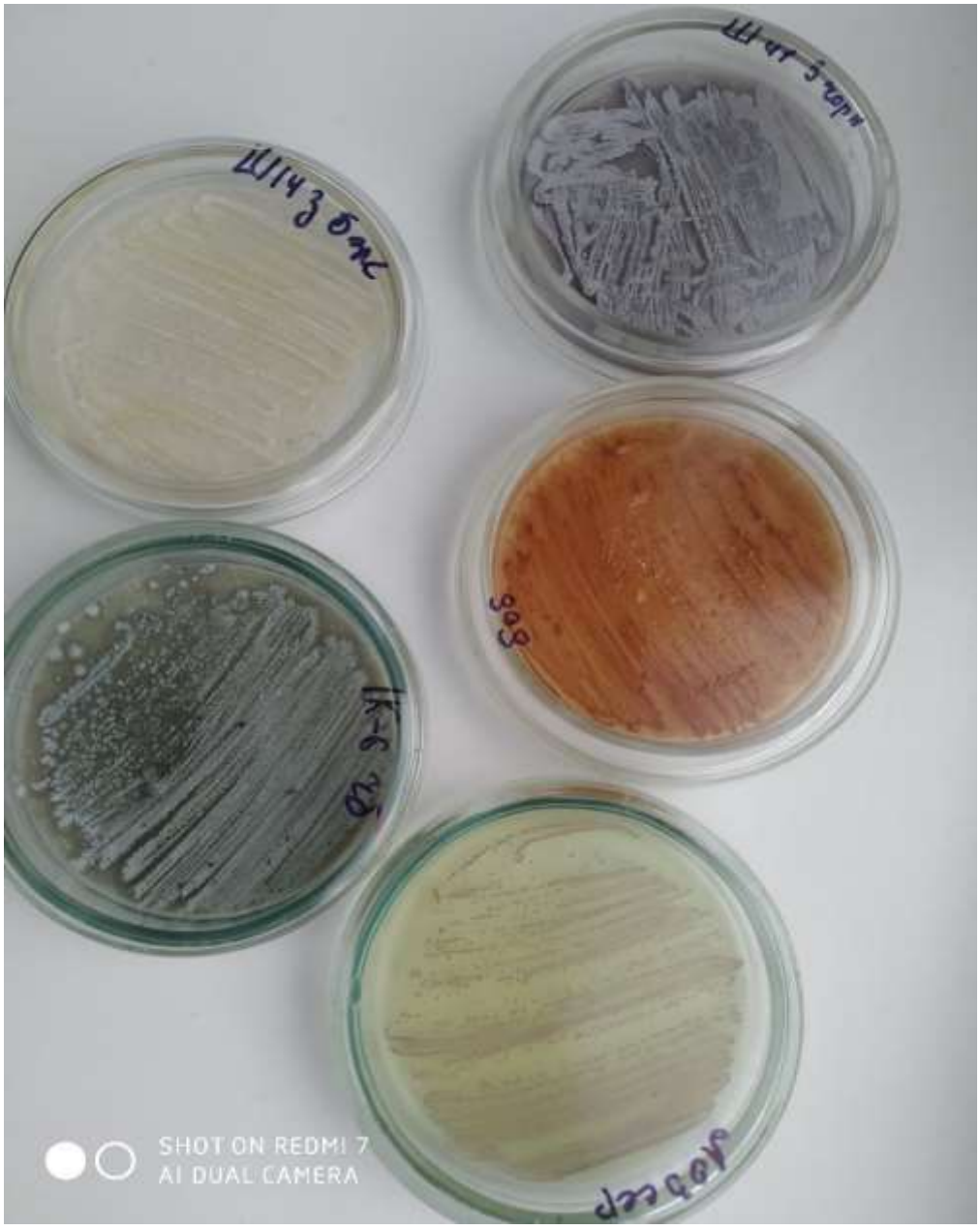


Рис. 3.8 Виділені неідентифіковані колонії актиноміцетів

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 амолітичної активності навкруги. Колонія з найбільшою зоною була вилучена, промікроскопійована (рис. 3.9) та ідентифікована з використанням молекулярного-генетичного методу (Nawan et al. 2021) за послідовністю 16S рибосомальної рибонуклеїнової кислоти (рРНК), що була видалена та секвенована (рис. 3.10)

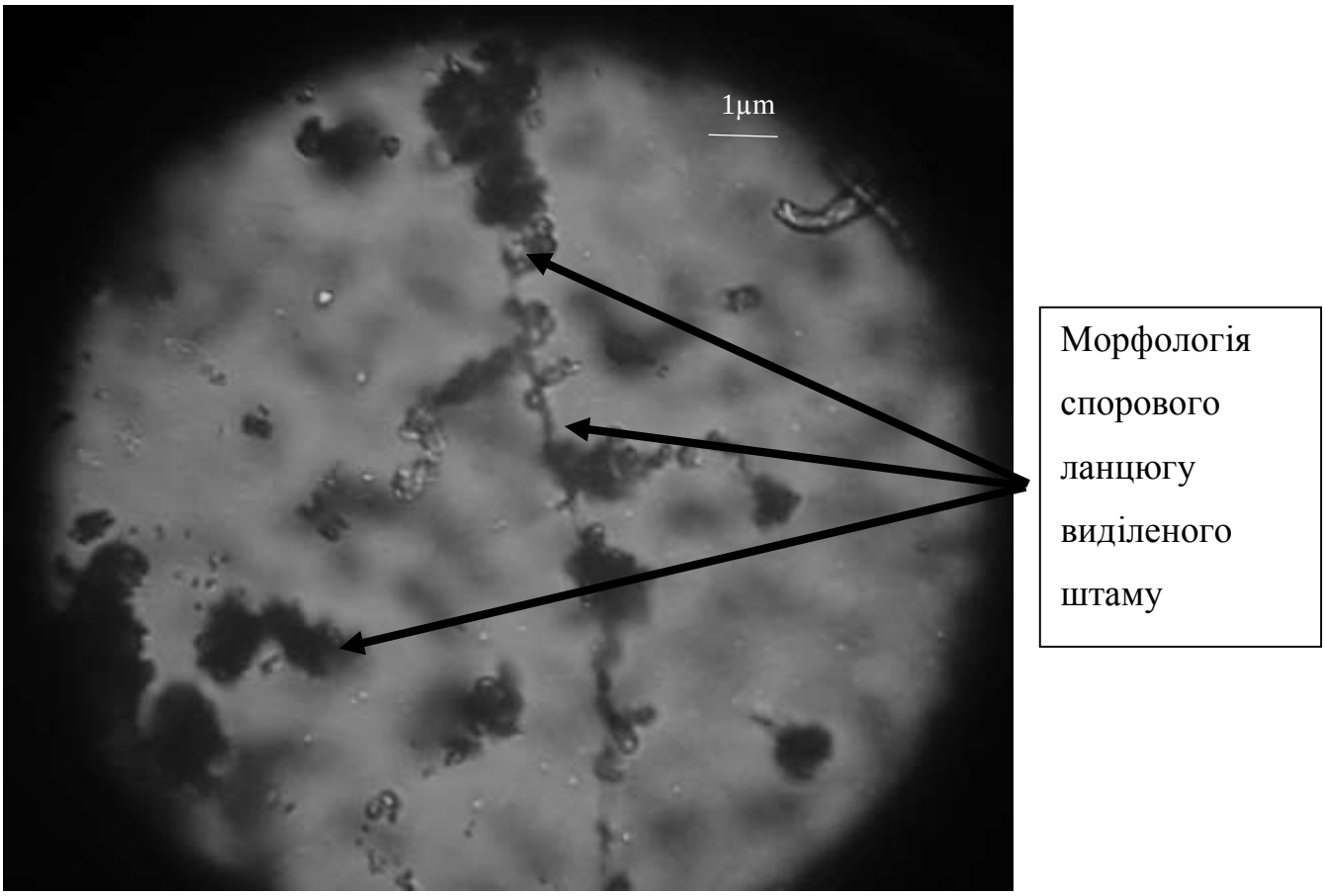


Рис. 3.9 Морфологія виділеної культури *Streptomyces* sp. з найбільшою амолітичною зоною навкруги

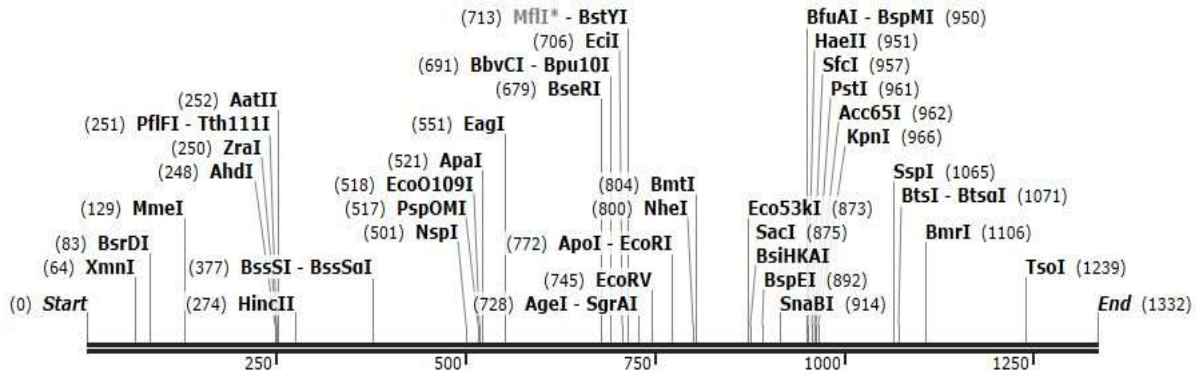


Рис. 3.10 Секвенований фрагмент 16S РНК *Streptomyces* sp.

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 (Hrab et al. 2021). У роботі було застосовано два методи побудови філогенетичного дерева на основі нуклеотидного вирівнювання – метод «Максимальної правдоподібності» (Maximum likelihood, англ) та «Приєднання сусідів» (Neighbour joining, англ) (Kusuma et al. 2020).

Для вибору оптимальної структури філогенетичного дерева в першому методі на основі знання про частоти нуклеотидних замін, вираховували критерій правдоподібності, що є максимальним за такої структури дерева і моделює походження нуклотидних замін у досліджуваних послідовностях. Філогенетичне дерево, побудоване за допомогою методу приєднання сусідів показано на рис. 3.11, сконструйована на основі послідовностей генів 16S рРНК із застосуванням методу порівняння найближчих сусідів та двопараметричної моделі Кімури. Масштабна шкала вказує на 0,01 заміни на позицію нуклеотиду.

В іншому методі – приєднання сусідів, на відміну від попереднього, структура філогенетичного дерева не моделювалась, а вираховувалась на основі подібності між нуклеотидними послідовностями. За допомогою методу Maximum likelihood отримано аналогічні результати. У результаті секвенування 16S рРНК *Streptomyces* sp. Ave 1 виявлено 99 % схожість із типовим штамом

Streptomyces graminifolii JL-22. 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 були об'єднані в одну групу, яка значно відрізнялася від інших *Streptomyces* (рис. 3.11).

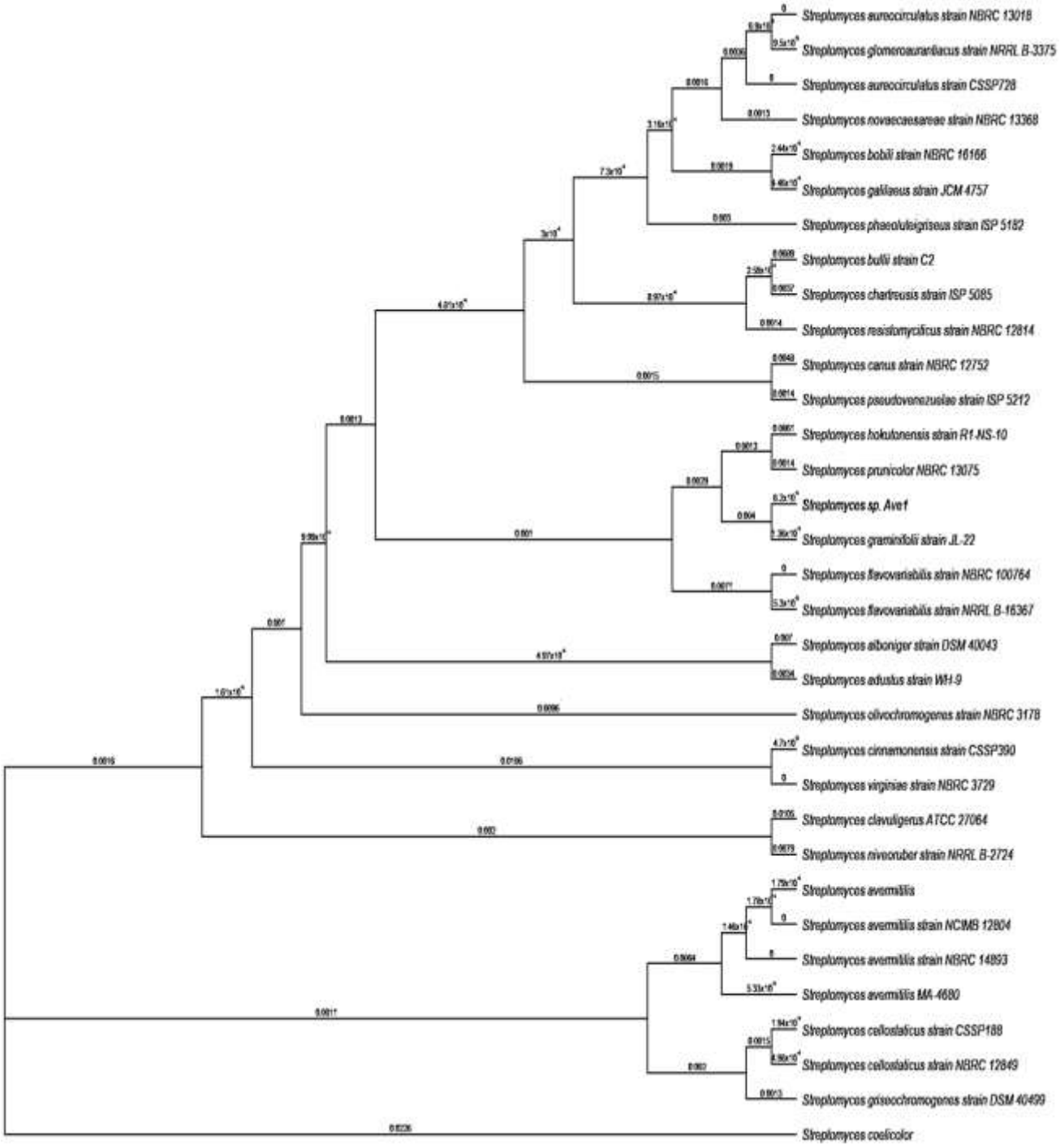


Рис. 3.11 Дендрограма генетичних зв'язків між *Streptomyces* sp. Ave 1 та різними видами роду *Streptomyces*

Тому ми пропонуємо, щоб назва *Streptomyces* sp. Ave 1 була обмежена тим штамом, який генетично тісно пов'язаний. Це підтвердило, що *Streptomyces* sp. Ave 1 належав *S. graminifolii*.

3.5. Конструювання рекомбінантного штаму-продуценту бутанолу *in silico*

Не зважаючи на певні успіхи у дослідженнях, пов'язаних з генною інженерією штамів-продуцентів, використання генетично модифікованих штамів-продуцентів бутанолу у збільшенні накопичення бутанолу все ще залишається недосконалим і складним (Garg et al., 2023). Першою ланкою реконструкції метаболічної мережі штаму є повний список потенційно протікаючих реакцій на основі інформації з геному організму (Seaver et al., 2021). Це дає можливість інгібувати частину реакцій в метаболічній мережі і співставити ефект з експериментальними даними для відомих (Re & Mazzoli, 2022). Наприклад, щоб збільшити накопичення бутанолу та спростити подальшу обробку, цікаво змінити шлях утворення пропандіолу (Yahyazadeh et al., 2023). Велика субодиниця гліцеролдегідратази, кодована геном *dhaB*, була обрана як мішень для видалення гена. Для встановлення необхідних праймерів (табл. 3.8) було використано програму Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/**primer-blast**/). У таблиці зеленим виділено місце безпосередньої дії рестриктази та позначено жовтим саме липкі кінці, що будуть з'єднуватись з плазмідою, а червоним направляючу (гайдерну) РНК для одноланцюгового розрізу. Для підбору плазміди була використана база данних Addgene (https://www.addgene.org/vector-database/query/). В якості човникового вектора для *Clostridium* sp. UCM 7570 було обрано плазміду pNICKclos1.0 (рис. 3.12). pNICKclos1.0 – човниковий інтегративний кон'югативний вектор, яка містить в собі CRISPR Cas9, який є одним з найточніших інструментуів генетичного інженерії. За допомогою CRISPR Cas9 можна вмикати та вимикати гени за бажанням (Aljabali et al., 2024). На першому етапі з вихідної плазміди

pNICKclos1.0 потрібно видалити ген *pyrE* та замінити його на фланковані послідовності гена мішені *dhaB.*

Таблиця 3.8

Праймери, що були використані для побудови моделі делеційного гену

Назва	Послідовність
H1-for	GAGGGTCTCGGGCCATAGAATTTATGGAAGCTG
H1-rev	GAGGGTCTCGGATCTACTTGAAATCGTTTTGACTT
H2-for	GAGGGTCTCGGATCTGCTGCAGAGGAAATGATAAATAG
H2-rev	GAGGGTCTCGTCGACTTTTGGTAGCTAATGGATAATC
sgRNA-for	GAGGGTCTCGCTAGTATCAGAGCGCCCTGTAAATAGTT TTAGAGCTAGAAATAGC
Int_For	GAGGGTCTCGTCGAGGTCAATCTATGAAAATGCG
Int_Rev	GAGGGTCTCGAGCTCAGATTGTACTGAGAGTGCAC

Для ампліфікації *dhaB* праймери були розроблені 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 (рис. 3.13).

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 H_1 та H_2 створено за допомогою програм BLAST та SnapGene. гРНК конструювали відповідно до вектора pNICKclos1.0 під контролем транскрипції синтетичного промотора pJ23119. Геноспецифічна 20-нуклеотидна цільова послідовність (TATTTACAGGACGCTCTGAT) була розроблена за допомогою інструменту Cas designer від Центру геномної інженерії Інституту фундаментальної науки,

Корея (http://www.rgenome.net), щоб уникнути нецільового ефекту.

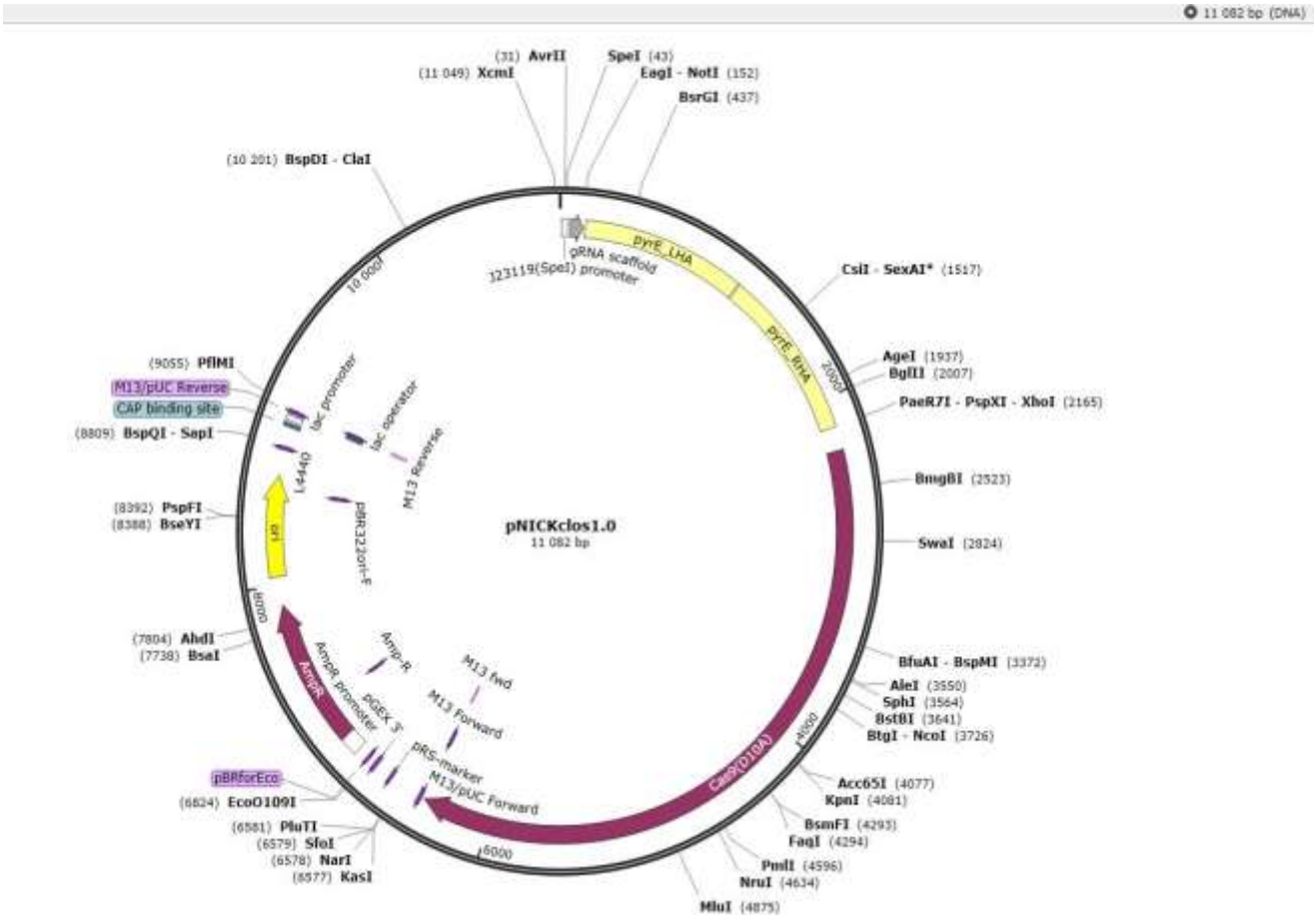


Рис. 3.12 Мапа вихідної плазміди pNICKclos1.0

Шаблон редагування, що складався з двох ділянок по 1 кб, фланкуючих ген *dhaB*, був синтезований відповідно до послідовності геномної ДНК. гРНК і шаблон для редагування були внесені до модифікованої плазміди pNICKclos1.0 (рис. 3.14).

Цільова послідовність CRISPR гРНК 20 нк була розроблена для індукції розриву в позиції 43–44 у кодуючій послідовності *dhaB*. Шаблон для редагування, що складається з двох областей гомології вище та нижче за *dhaB*, був сконструйований таким чином, щоб забезпечити видалення промотора *dhaB* та цільового сайту гРНК. Отримана конструкціє дає змогу замовчування гену *dhaB*, що було перевірено за допомогою аналізу потоків метаболізму.

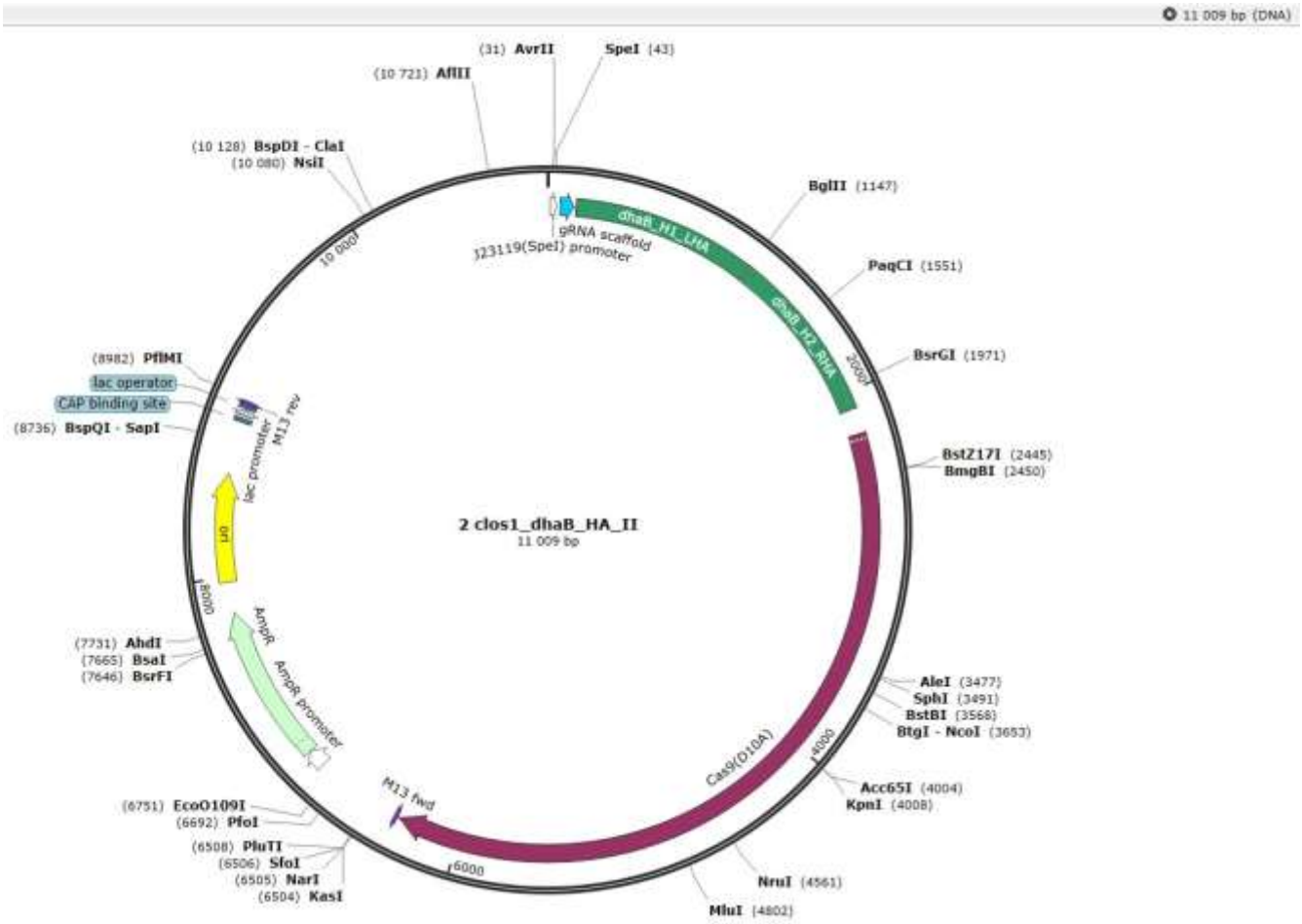


Рис. 3.13 Мапа модифікованої плазміди pNICKclos1.0

Для проведення аналізу потоків метаболізму було 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.

Для побудови моделі за основу була взята модель 20 метаболітів для *C. pasteurianum* DSM 525 та 28 основних реакцій (Schmitz et al., 2019). Метаболічний аналіз потоків було проведено за використання MATLAB toolbox CellNetAnalyzer (рис. 3.15). Гліцеролдегідратаза каталізує утворення 3-гідроксипропіональдегіду з гліцерину, що є першим кроком у шляху утворення PDO (Li, et al., 2024). У моделі враховувалися лише НАДН і ФерредоксинН, але

не їхні відповідні окислені форми.



Рис. 3.14 Мапа подвійно модифікованої плазміди pNICKclos1.0

Очікувалося, що весь АТФ, отриманий від фосфорилювання на рівні субстрату на різних стадіях реакції, буде негайно використаний для росту клітин. Таким чином, АТФ не був включений в модель. Модель не демонструє зв'язків збереження. Стехіометрична матриця має повний ранг, тобто всі невиміряні швидкості є обчислюваними. Система перевизначена зі ступенем надмірності одиниці. Усі виміряні норми, крім лактату, збалансовані. Розподіл потоку оцінювали за методом найменших квадратів із зваженим дисперсією та перевіряли на узгодженість за допомогою тестової функції h з довірчим рівнем 0,95 і ступенем свободи один (Laurencelle & Cousineau, 2023). Передбачалося, що

вимірювання містять похибку в 10 %.

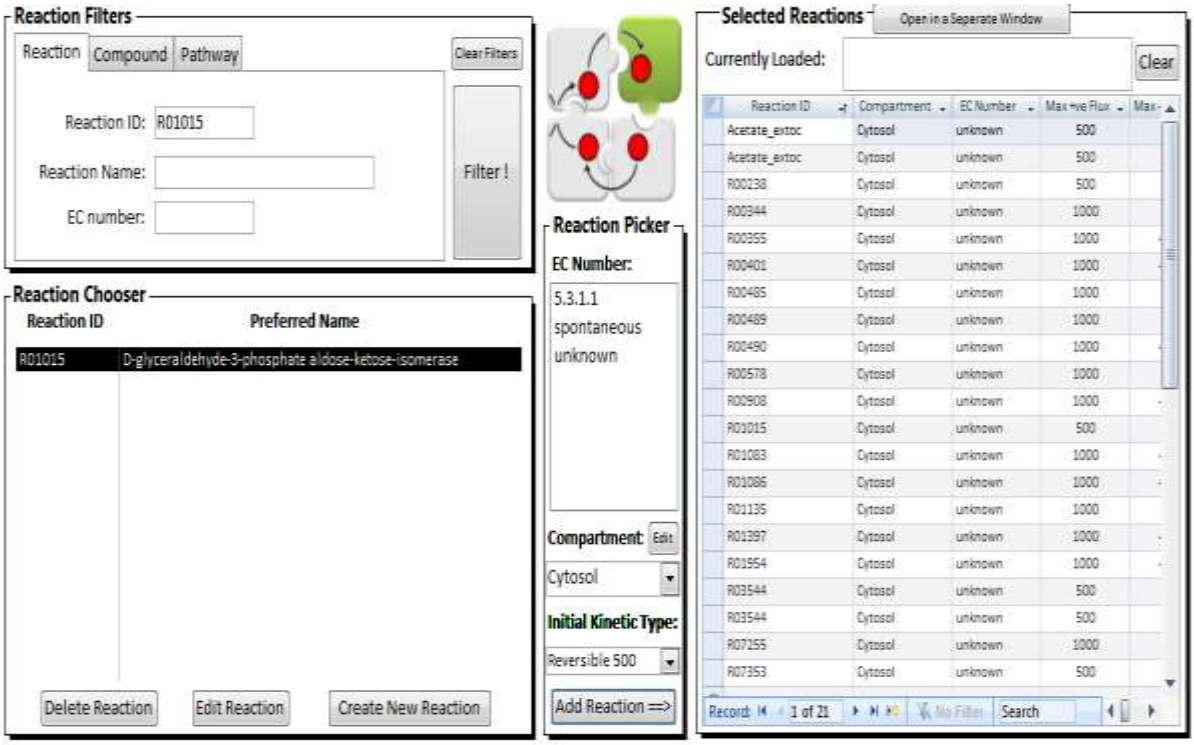


Рис. 3.15 Програма визначення потоків делеційного мутанту *dhaB*

Видалення великої субодиниці гліцеролдегідратази (*dhaB*) за допомогою адаптованої ніказної системи *S. pyogenes* типу II CRISPR/Cas9 призвело до 1,3-пропандіол-дефіцитного мутанта, що виробляв бутанол як основний продукт, незважаючи на зниження росту. У прикладній моделі розглядалися два різні шляхи з різними виходами НАДН – це, що стосується перетворення кротоніл-КоА в бутирил-КоА. Аналіз метаболічного потоку підтримує гіпотезу про те, що мутантний штам *dhaB* бореться з внутрішньоклітинним редокс-дисбалансом шляхом активації альтернативних реакцій споживання $НАДН_2$ та виявив важливу роль нещодавно ідентифікованого шляху біфуркації електронів для перетворення кротоніл-КоА в бутирил-КоА в регуляції окисно-відновного балансу. Додаткова і більш значна адаптація була виявлена у вузлі кротоніл-КоА до бутирил-КоА. Реакцію біфуркації електрона використовували 46 %, тоді як паралельний шлях використовували 54 %. Натомість штам *Clostridium pasteurianum* R525 (Schmitz et al., 2019) майже виключно використовував

реакцію, у якій споживається лише 1 моль НАДН (92 %). Для перетворення кротоніл-КоА в бутирил-КоА використовувалася реакція біфуркації електронів лише на 8 %. Порівняно з вихідним штамом, потік шляху біфуркації електронів мутанта *dhaB* збільшився з 8 до 46 % від загального потоку від кротоніл-КоА до бутирил-КоА та бутанолу, що вказує на нову, незалежну від 1,3-пропандіолу схему бродіння у *Clostridium pasteurianum.*

Подане дослідження було присвячено секвенуванню геному нового штаму *C. pasteurianum* та ідентифікації кластерів генів, залучених до АБЕ-ферментації. Порівняльний аналіз виявлених послідовностей ферментів виявив високий рівень подібності, – 91,4-100 %, до *C. pasteurianum* DSM 525. Видалення великої субодиниці гліцеролдегідратази (*dhaB*) за допомогою адаптованої ніказної системи *S. pyogenes* типу II CRISPR/Cas9 призвело до 1,3-пропандіол-дефіцитного мутанта, що виробляє бутанол як основний продукт. Незважаючи на зниження росту, вихід бутанолу значно збільшився. Аналіз метаболічного потоку виявив важливу роль нещодавно ідентифікованого шляху біфуркації електрона для перетворення кротоніл-КоА в бутирил-КоА у регуляції окисно-відновного балансу. Порівняно з вихідним штамом, потік шляху біфуркації електронів мутанта *dhaB* збільшився з 8 до 46 % від загального потоку від кротоніл-КоА до бутирил-КоА та бутанолу, що вказує на нову, незалежну від 1,3-пропандіолу схему бродіння гліцерину у *Clostridium pasteurianum*.

Отримано нові штами-продуценти лігнолітичних бактерій роду *Streptomyces*, один з яких мав найбільшу амолітичну зону. Його виділено та ідентифіковано. У результаті секвенування 16S рРНК *Streptomyces* sp. Ave 1 виявлено 99 % схожість із типовим штамом *Streptomyces graminifolii* JL-22. 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 були об’єднані в одну групу, яка значно відрізнялася від інших *Streptomyces*.

Основні результати даного розділу опубліковані в наукових роботах:

1. Шульга, С.М., **Тігунова, О.О.,** Братишко, В.В., та Блюм, Я.Б. (2024). *Біобутанол. Продуценти, субстрати, культивування та відновлення.* Київ: Наукова думка. doi: 10.15407/978-966-00-1918-8.
2. **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
3. **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 **Q3**
4. **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/biotech15.0.005
5. **Тігунова, О.О.,** Братішко, В.В., Прийомов, С.Г., та Шульга, С.М. (2022). *Моделювання плазміди 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.
6. Захарова, О.Г., Андріяш, Г.С., та **Тігунова, О.О.** (2020). *Виділення стрептоміцетів з ґрунтів різних регіонів України.* Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна, Київ. 147.
7. 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
8. **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.

РОЗДІЛ 4
ВИКОРИСТАННЯ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОЇ СИРОВИНИ ЯК СУБСТРАТУ

4.1 Характеристика незернової рослинної біомаси як субстрату

Поруч з використанням відновлювальних джерел сировини особливої уваги заслуговує сировина рослинного походження, яка не потребує використання сільськогосподарських угідь для її виробництва (Blasi, et al. 2023). Мова про лігноцелюлозну сировину комунального походження – опале листя, відходи обрізування дерев, догляду за насадженнями, обсяг утворення яких сягає десятків і сотень тисяч тонн (Abolore et al., 2024). При чому, існує широка гамма комунальних підприємств, одним з головних напрямів діяльності яких є поводження з цією сировиною, яке, переважно, обмежується її накопиченням та утилізацією – вивезенням на полігони твердих побутових відходів (Wójciket al., 2021).

В цілому, лігноцелюлозну сировину комунального походження можна розділити на такі групи:

1) зелені відходи косіння газонної трави та бур’янів;

2) обрізки гілок та кущів, відходи кронування дерев;

3) опале листя.

Визначення ботанічного (видового) складу лігноцелюлозної сировини комунального походження здійснювали на прикладі міста Києва, для чого скористалися інформацією «Єдиного державного веб-порталу відкритих даних», розміщеного за адресою https://data.gov.ua/. Серед розпорядників інформації порталу присутні комунальні підприємства по утриманню зелених насаджень районів міста Києва: Оболонського, Голосіївського, Дарницького, Деснянського, Дніпровського району, Печерського, Подільського, Святошинського, Солом’янського та Шевченківського.

Для аналізу були відібрані набори даних, які містили інформацію щодо

породного/видового складу об’єктів благоустрою. Приклад набору даних «Реєстр об’єктів благоустрою зеленого господарства КП УЗН Святошинського району станом на 01.01.2020». Для встановлення ботанічного (видового, породного) складу здійснювали аналіз наборів даних шляхом врахування частоти згадування відповідної породи/виду зелених насаджень з наступним ранжуванням за частотою згадування. Інформація про ботанічний (видовий/порідний) склад зелених насаджень на прикладі узагальненої інформації комунального підприємства по утриманню зелених насаджень Святошинського району міста Києва наведена у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Склад зелених насаджень м. Києва, 2023 р. (Святошинський район)

№ з/п	Склад зелених насаджень	Частота, %
1.	Клен	21,1
2.	Липа	20,3
3.	Тополя	14,8
4.	Каштан	12,7
5.	Дуб	7,2
6.	Береза	6,8
7.	Сосна	5,1
8.	Акація	3,0
9.	Ялина	3,0
10.	Горобина	1,7
11.	Туя	1,7
12.	Горіх	1,3
13.	Груша	0,8
14.	Верба	0,4

Середній вік насаджень, наведених у таблиці, перевищує 35 років. Як

видно з табл. 4.1, 82,7 % всіх насаджень (або 91,6 % без врахування насаджень хвойних порід) становлять лише шість видів дерев: клен, липа, тополя, каштан, дуб та береза. При цьому зведена інформація не містить інформації про видовий (порідний) склад кущових насаджень, які представлені зведеними в єдину групу «Кущі». Проте, з огляду на їх незначну кількість (наприклад, у наведених даних щодо складу зелених насаджень Святошинського району, кущі становлять лише 0,4 %), при подальших дослідженнях доцільно зосередитись на основних видах листяних насаджень, які, без урахування трав'яних видів, формують основну масу лігноцелюлозної сировини комунального походження у вигляді обрізок гілок, відходів кронування, опалого листя тощо.

Взагалі, реалізація та організація процесу інвентаризації міських зелених насаджень у населених пунктах України потребує суттєвого поліпшення. Так, в аналітичному звіті, присвяченому аналізу стану та процесів інвентаризації міських зелених насаджень у м. Києві (Халаїм та ін., 2023), автори навели аналіз нормативних документів, інформації, отриманої з офіційних сайтів органів влади і комунальних підприємств, а також у відповідь на запити, та провели інтерв'ю з працівниками районних управлінь зелених насаджень. Автори звіту встановили, що інвентаризація зелених насаджень в м. Києві ґрунтується переважно на попередніх даних.

Існує потреба у більш розширеній інформації щодо кожного об'єкту благоустрою, адже наразі є лише загальний список щодо кожної інвентаризаційної ділянки із зазначенням видового та якісного складу дерев, їхньої кількості, віку, загальної площі об'єктів благоустрою. Ідентифікація окремого дерева та співвіднесення його з наявними неможливе. Використання сучасних ГІС-систем для інвентаризації зелених насаджень відсутнє. Таким чином, система інвентаризації зелених насаджень міста Києва наразі не є партисипативною, відкритою для громадськості, а також не є інтерактивною.

Структурована інформація щодо ботанічного (видового) складу трав, які використовуються комунальними підприємствами міста Києва, не є окремим набором даних та не входить до існуючих наборів даних комунальних

підприємств. Аналіз даних електронної системи публічних закупівель Prozorro свідчить, що закупівля насіння газонної трави здійснюється комунальними підприємствами за кодом державного класифікатора ДК 021:2015 «Єдиний закупівельний словник» 03110000-5 «Сільськогосподарські культури, продукція товарного садівництва та рослинництва» та не містить вимог або інформації щодо видового складу насіння трав. Інформацію щодо видового складу газонних трав наведена у Галузевих комунальних нормах України ГКН 02.08.-2005 «Норми висіву насіння газонних трав для створення та ремонту газонів у населених пунктах України», затверджених та введених в дію наказом Міністерства будівництва, архітектури та житлово-комунального господарства України від 01.02.2006 № 31.

Згадані норми містять такий перелік найменувань видів газонних трав: гребінник звичайний (*Cynosurus cristatus L.*), житняк ширококолосий (*Agropyron cristatum L.*), житняк вузькоколосий (*Agropyron* sp), костриця червона (*Festuca rubra L.*), костриця (*Festuca* sp), костриця овеча (*Festuca ovina L.*), конюшина біла (*Trifolium repens*), конюшина червона (*Trifolium pratense*), китник лучний (*Alopecurus pratensis*), лядвенець рогатий (*Lotus corniculatus*), люцерна синя (*Medicágo satíva*), люцерна жовта (*Medicago falcata*), мітлиця звичайна (*Agrostis capillaris*), мітлиця біла (*Agrostis stolonifera*), пирій безкореневищний (*Agropyrum tenerum Vascy*.), райграс пасовищний (*Lolium perenne*), райграс багатоквітковий (*Lolium multiflorum*), райграс однорічний (*Arrhenatherum elatius* M.), тонконіг лучний (*Poa pratensis*), тонконіг звичайний (*Poa trivialis L.*) та тонконіг лісовий (*Poa sylvicola Guss.).*

Існуюча практика створення та ремонту газонів не виключає застосування різних видів газонних трав на одній ділянці (Ahn et al., 2024). Навпаки, згадані галузеві комунальні норми України ГКН 02.08.-2005 передбачають формування травосумішей для створення та ремонту різних типів газонів. Структура об’єктів благоустрою зеленого господарства містить об’єкти, які відносяться як до насаджень загального користування (парки, сквери тощо), так і до насаджень

спеціального призначення (транспортні розв'язки, захисні смуги тощо) (Addas, 2023). З огляду на це для подальших досліджень доцільно виділити два узагальнені види трав'яної сировини – трава газонна та трава узбіч.

При розробленні моделі прогнозування обсягів утворення, та, відповідно, накопичення (і зберігання) лігноцелюлозної сировини комунального походження за визначеними групами сировини, приймали деякі обмеження та припущення, а саме:

- розглядали рослинну біомасу кожного виду рослин в межах визначеної господарської або територіальної одиниці (парк, сквер, район у місті тощо) без виокремлення окремої рослини (дерева);

- вважали, що вегетативне збільшення зеленої біомаси рослини кожного виду, а також скидання листя носить однаковий характер для кожного виду, відбувається за однаковим законом в однакові строки;

- обсяги утворення зеленої біомаси (обрізки гілок, відходи косіння трави) та накопичення опалого листя обмежуються наявними в окремому комунальному підприємстві кадровими ресурсами та технічними засобами;

- при оцінюванні обсягів утворення опалого листя масою зеленого листя, яке знаходилось на обрізаних кілках та відходах кронування, нехтуємо.

З огляду на це, можна передбачити, що для кожного виду лігноцелюлозної сировини комунального походження моделі утворення будуть відмінними. Також, характер моделей накопичення (і зберігання) буде відрізнятися, для випадків, коли:

1) наявні в комунальному підприємстві кадрові та технічні ресурси дозволяють забезпечити поводження з усіма утворюваними обсягами сировини визначеної групи;

2) наявних в комунальному підприємстві кадрових та технічних ресурсів недостатньо (в цілому або в окремих піковий період) для перероблляння всіх обсягів сировини визначеної групи, які утворюються.

Причому, для групи сировини «обрізки гілок та кущів, відходи кронування дерев» моделі утворення та накопичення сировини будуть

тотожними. З огляду на прогнозований S-подібний характер утворення біосировини для опису цього характеру використаємо **сигмоїду** (Han et al., 1995) – неперервно диференційовану монотонну нелінійну S-подібну функцію, яка застосовується, зокрема, для моделювання моделей біологічного зростання (Ling al., 1993).

Отже, з огляду на наведені припущення, запишемо модель утворення маси опалого листя (Шульга та ін., 2024) для *i-го* виду дерев M_i:

$$M_i = \frac{m_i\, n_i}{1+e^{k_i\left(\frac{\mathrm{tb}_i+\mathrm{te}_i}{2}-t\right)}}, \tag{4.1}$$

де m_i – середнє значення максимальної маси опалого листя, яке утворюється на одному дереві *i-го* виду, кг;

n_i – кількість дерев *i-го* виду, шт.;

k_i – безрозмірний емпіричний коефіцієнт інтенсивності листопаду для і-го виду дерев;

tb_i – день початку листопаду для і-го виду дерев, день року;

te_i – день завершення листопаду для і-го виду дерев, день року;

t – день року.

В залежності (4.1) множник $m_i\ n_i$ може бути представлений як сума множників середніх значень максимальних мас опалого листя, яке утворюється на одному дереві *i-го* виду визначеного віку та кількості дерев *i-го* виду цього віку, або ж як сума максимальних мас опалого листя всіх дерев *i-го* виду. Графічно залежність (4.1) зображена на рисунку 4.1.

У загальному випадку, коли на територіальній або господарській одиниці знаходиться декілька видів дерев (*i, j, …, k*), модель (4.1) запишеться у вигляді:

$$M = M_i + M_j + \cdots + M_k = \\ = \frac{m_i\, n_i}{1+e^{k_i\left(\frac{\mathrm{tb}_i+\mathrm{te}_i}{2}-t\right)}} + \frac{m_j\, n_j}{1+e^{k_j\left(\frac{\mathrm{tb}_j+\mathrm{te}_j}{2}-t\right)}} + \cdots + \frac{m_k\, n_k}{1+e^{k_k\left(\frac{\mathrm{tb}_k+\mathrm{te}_k}{2}-t\right)}}. \tag{4.2}$$

Графічно залежність (4.2) представлена на рисунку 4.2.

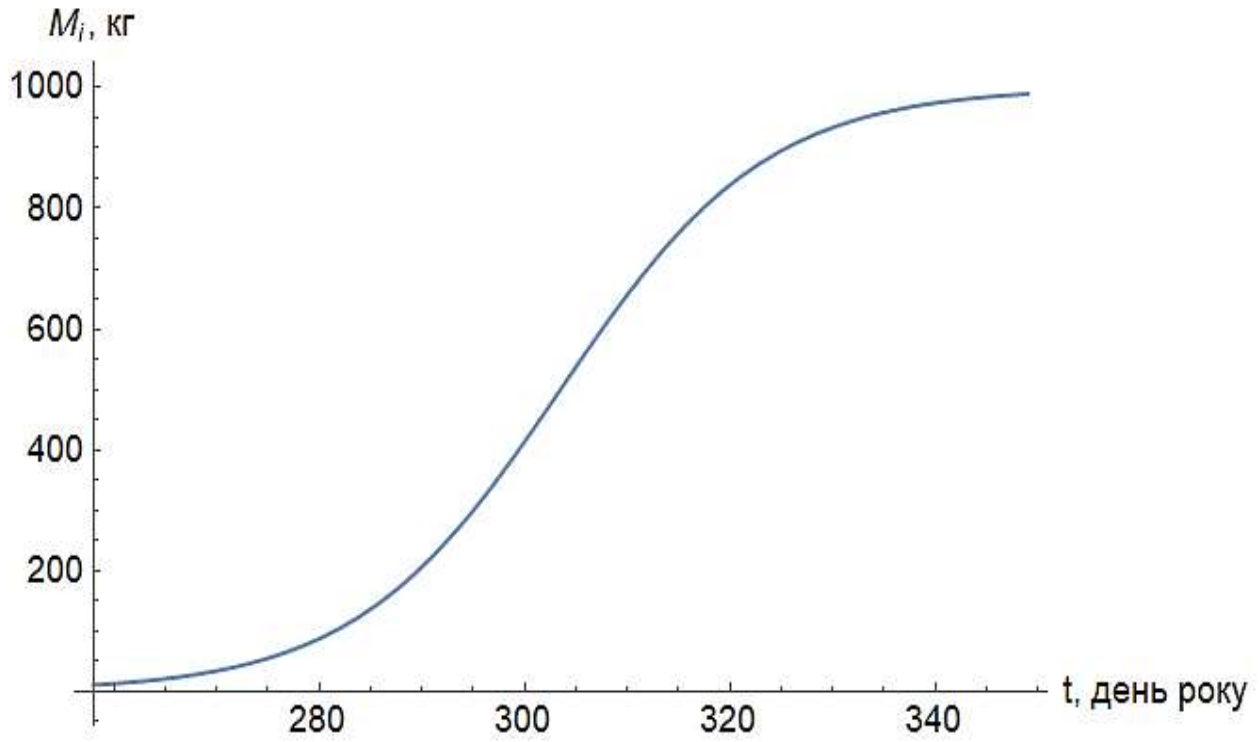


Рис. 4.1 Залежність накопичення маси опалого листя для *і-го* виду дерев в залежності від дня року

Для врахування вікових особливостей дерев окремих видів чисельник правої частини залежностей (4.1) та (4.2) може бути представлений у вигляді:

$$m_i\, n_i = m_i^1 n_i^1 \; + m_i^2 n_i^2 + \cdots + m_i^a n_i^a, \qquad (4.3)$$

де $m_i^1, m_i^2, \ldots m_i^a$ – відповідно, середнє значення максимальної маси опалого листя, яке утворюється на одному дереві *і-го* виду визначеної вікової групи, кг

$n_i^1, n_i^2, \ldots, n_i^a$ – відповідно, кількість дерев *і-го* виду визначеної вікової групи, шт.;

1, 2, ..., а – вікова група.

Скориставшись залежністю (4.1) можемо записати вираз для визначення маси опалого листя, яке утворюється *і-м* видом дерев в межах визначеної господарської або територіальної одиниці у визначений день *t*:

$$m_i^t = M_i(t_i) - M_i(t_i - 1),$$
$$t_i \in [tb_i, te_i]. \quad (4.4)$$

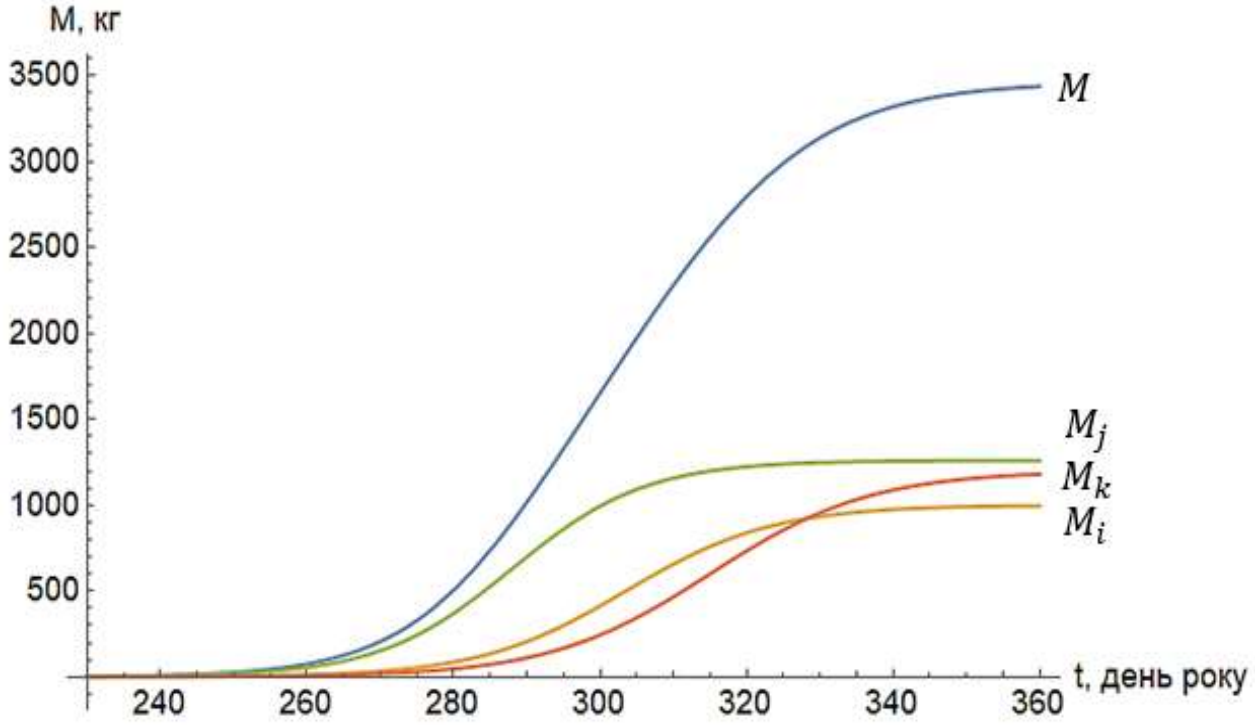


Рис. 4.2 Залежність накопичення маси опалого листя для *i-го*, *j-го* та *k-го* видів дерев в залежності від дня року

Підставивши значення та зробивши відповідні перетворення:

$$m_i^t = \frac{m_i n_i}{1+e^{k_i\left(\frac{\mathrm{tb}_i+\mathrm{te}_i}{2}-t\right)}} - \frac{m_i n_i}{1+e^{k_i\left(\frac{\mathrm{tb}_i+\mathrm{te}_i}{2}-t+1\right)}}. \quad (4.5)$$

Після спрощення математичний вираз для прогнозування маси опалого листя, яке утворюється *i-м* видом дерев в межах визначеної господарської або територіальної одиниці у визначений день *t* запишеться як:

$$m_i^t = \frac{m_i n_i}{2}\left(\mathrm{th}\left[\frac{k_i}{2}\left(\frac{\mathrm{tb}_i+\mathrm{te}_i}{2} - t + 1\right)\right] - \mathrm{th}\left[\frac{k_i}{2}\left(\frac{\mathrm{tb}_i+\mathrm{te}_i}{2} - t\right)\right]\right). \quad (4.6)$$

Графічно залежність (4.6) представлена на рисунку 4.3.

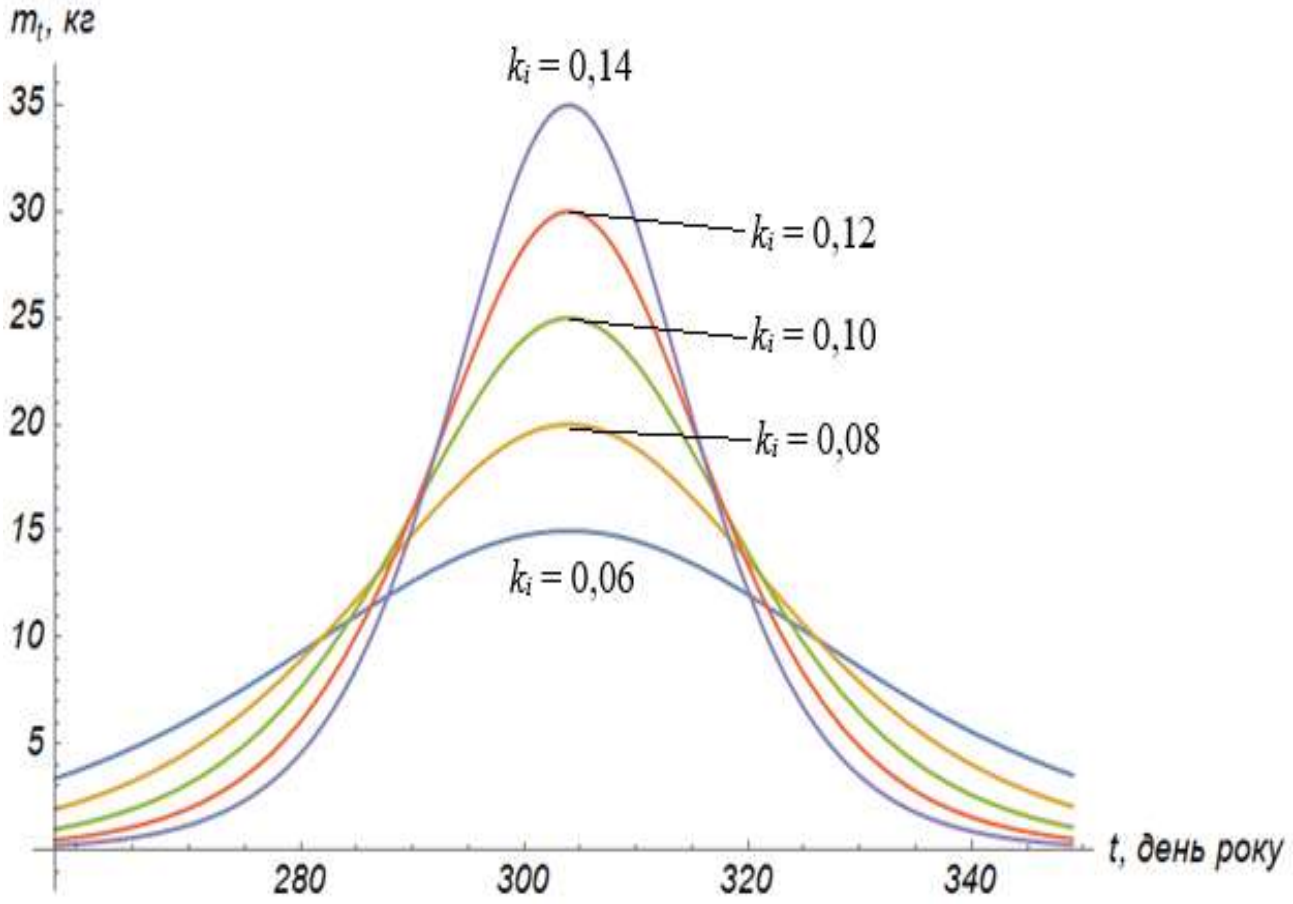


Рис. 4.3 Маса опалого листя, яке утворюється *і-м* видом дерев у день *t* в залежності від значення безрозмірного емпіричного коефіцієнту інтенсивності листопаду k_i = [0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14]

Для прогнозування загальних обсягів утворення опалого листя залишається необхідним отримання інформації щодо кількісних показників та стану зелених насаджень визначеного об’єкту. Практичне застосування отриманих моделей прогнозування обсягів утворення лігноцелюлозної сировини вимагає наявності даних щодо кількісних показників та параметрів стану зелених насаджень (Mudryk et al., 2021). За інвентаризаційними даними Комунального об’єднання «Київзеленбуд» середній вид дерев на території міста Києва у 2023 році становить 40-60 років (в середньому – 50 років). Проаналізовані дані реєстрів об’єктів благоустрою зелених господарств комунальних підприємств міста Києва підтверджують цю цифру.

Для визначення сирої маси листя m_i' (кг) для листяних дерев *і-го* виду

можна скористатися відомою залежністю:

$$m_i' = -1{,}307 \; + \; 0{,}93 \, D_i \; - \; 0{,}114 \, D_i^2 \; + \; 0{,}01\mathrm{D}_i^3, \qquad (4.7)$$

де D_i – діаметр стовбура дерева на висоті 1,3 м від поверхні ґрунту, см.

Також відомо (Гриник та ін., 2010), що вік дерева L_i знаходиться у пропорційній залежності від довжини окружності його стовбура C_i на висоті 1,3 м, а саме:

$$L_i = K_i C_i, \qquad (4.8)$$

де K_i – коефіцієнт пропорційності, який залежить від виду дерева. Прийнявши, що середній вік дерев у місті Києві становить 50 років, маса опалого листа становить близько 15 % від маси зеленого листя, з урахуванням даних таблиці 4.1 щодо наявної кількості дерев у місті Києві, даних таблиці щодо їх видового складу з використанням отриманих залежностей можемо здійснити прогнозну оцінку загального обсягу опалого листя дерев листяних порід, який щорічно утворюється в місті Києві (табл. 4.2).

Отже, за даними розрахунків орієнтовні обсяги річного утворення опалого листя в м. Києві становлять понад 56,5 тис. тонн, основну частку з яких становить листя тополі. Усі біотехнологічні процеси суттєво залежать від продуктивності штаму та умов культивування (Kumar et al. 2024). Обсяги виходу бутанолу при використанні різних джерел вуглецю можна збільшити за рахунок оптимізації метаболичних шляхів синтезу (Nabila et al. 2024). Переважаючий ботанічний (видовий) склад лігноцелюлозної сировини комунального походження визначено на прикладі м. Києва, для чого використано інформацію Єдиного державного веб-порталу відкритих даних, зокрема дані комунальними підприємствами з утримання зелених насаджень у районах м. Києва.

Таблиця 4.2

Обсяги утворення опалого листя в м. Києві, 2023 р.

№ з/п	Склад зелених насаджень	Річні обсяги опалого листя, тонн
1	Тополя	30506,2
2	Клен	13726,9
3	Каштан	8262,2
4	Береза	1177,9
5	Липа	1042,4
6	Дуб	496,3
7	Інші листяні, разом	1293,2
Усього по м. Києву		56505,2

Для аналізу були відібрані набори даних, які містили інформацію про видовий склад об’єктів озеленення. Аналіз даних показав, що 82,7 % усіх насаджень (або 91,6 % без урахування хвойних) становлять лише шість порід дерев: клен, липа, тополя, каштан, дуб та береза. Сучасна практика створення та ремонту газонів не виключає використання на одній ділянці різних видів газонних трав. Навпаки, галузеві комунальні стандарти України передбачають формування травосумішей для створення та ремонту різних типів газонів. До складу об’єктів зеленої інфраструктури входять об’єкти, які належать як до насаджень загального користування (парки, сквери тощо), так і до насаджень спеціального призначення (транспортні розв’язки, захисні смуги тощо). З огляду на це для подальших досліджень було виділено два узагальнених види трав’яної сировини: газонна та придорожня. Проведено хімічний аналіз відходів 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) за вище наведеними методиками. Результати досліджень представлено у рис. 4.4.

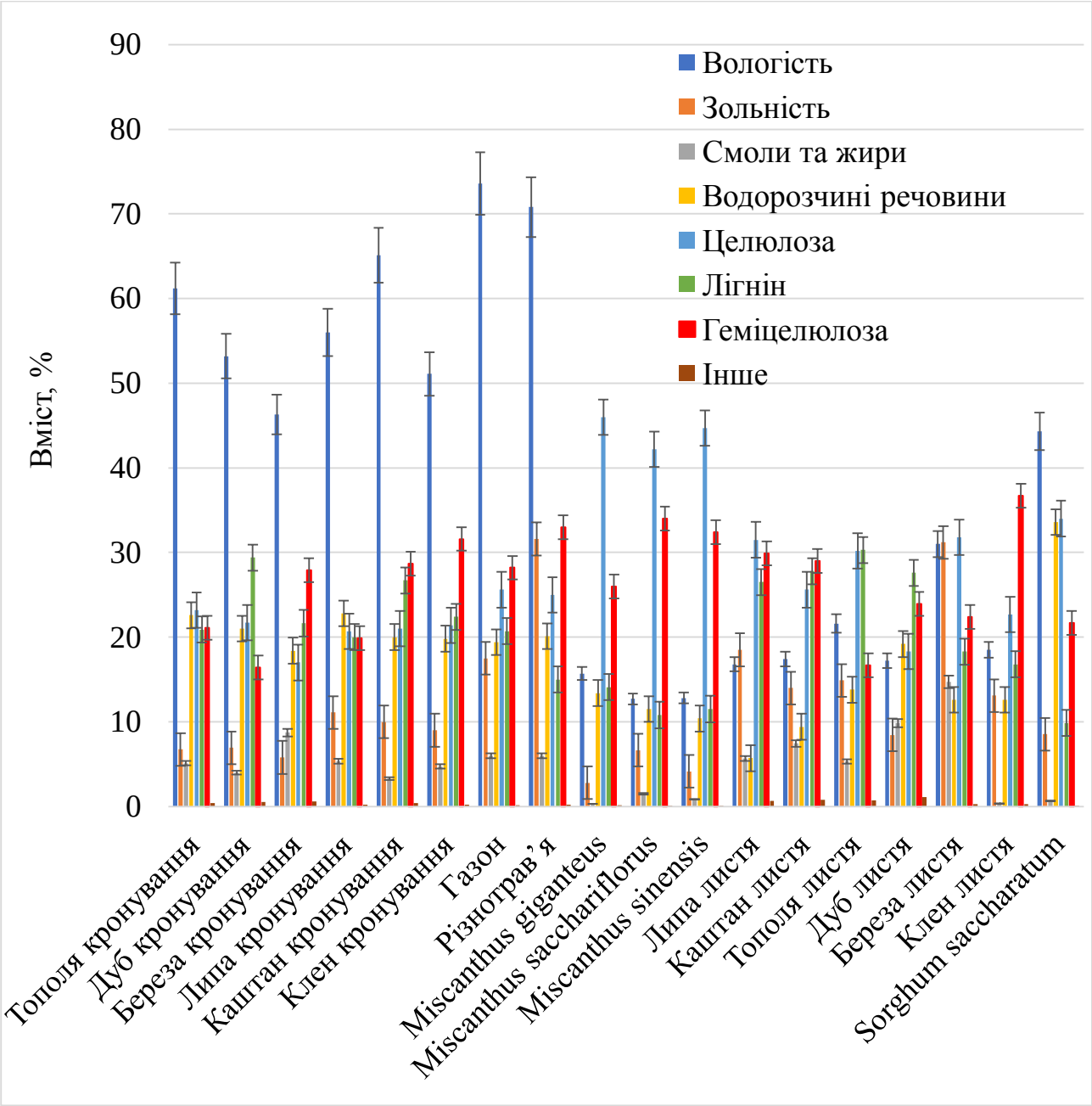


Рис. 4.4 Компонентний склад лігноцелюлозної біомаси

Точність отриманих результатів вимірювання параметрів хімічного складу сировини була зумовлена методами їх визначення. Хімічний склад сировини аналізували за такими групами: обрізки зелених гілок, опале листя, трав'яна сировина. Гігантський міскантус і цукрове сорго аналізували окремо. Як видно з даних, зразки міскантусу гігантського (44,71 %), листя тополі (25,71 %), гілок тополі (23,24 %), газонної трави (21,12 %) мають найвищий вміст целюлози (рис 4.5.).

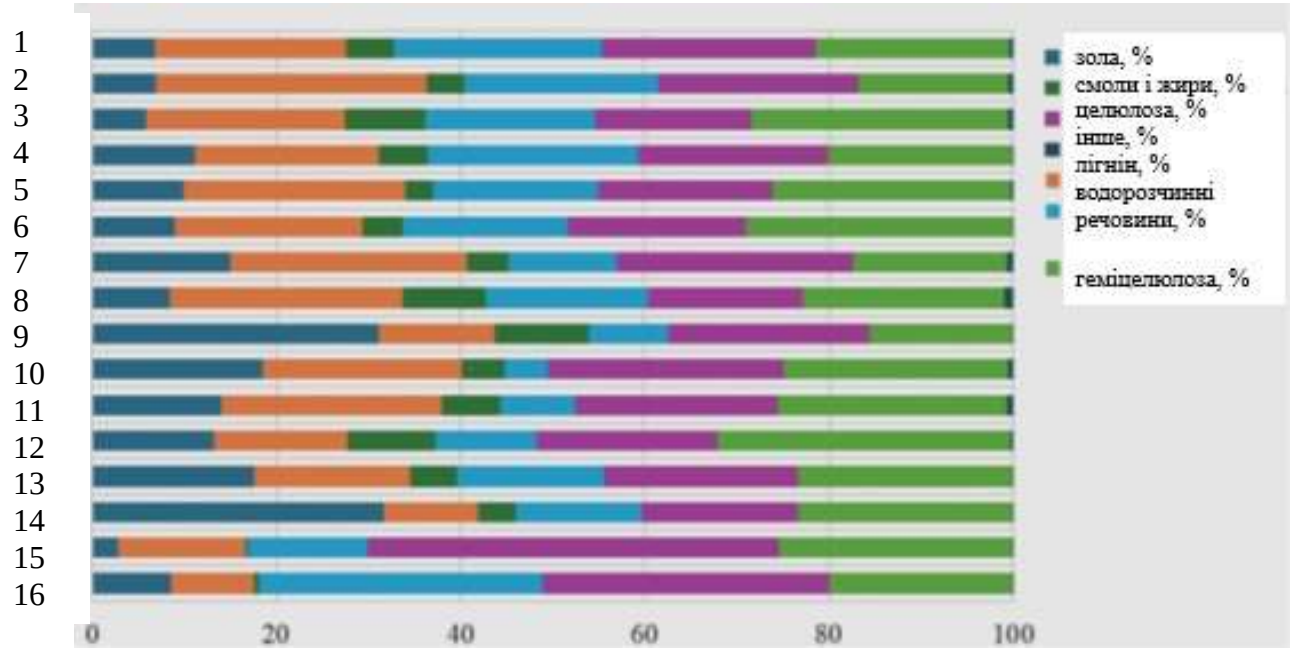


Рис. 4.5 Склад лігноцелюлозної біомаси муніципального походження (1 – гілки тополі, 2 – гілки дубу, 3 – гілки берези, 4 – гілки липи, 5 – гілки каштана, 6 – гілки клену, 7 – листя тополі, 8 – листя дубу, 9 – листя берези, 10 – листя липи, 11 – листя каштану, 12 – листя клену, 13 – газонна трава, 14 – трава з узбіччя, 15 – міскантус, 16 – сорго)

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 виявлео в листі клена (31,84 %), гілках клена (28,73 %), міскантусі гігантському (25,31 %) та придорожній траві (23,23 %); смоли та жири – у березовому листі (10,12 %), гілках берези (8,73 %) та газонній траві (4,94 %); водорозчинні речовини – у сорго цукровому (30,75 %), гілках липи (22,81 %) та листі дуба (17,61 %); лігнін – у гілках дуба (29,41 %), листі тополі (25,76 %) та газонній траві (17,06 %); зола – у придорожній траві (31,63 %), листі берези (31,17 %) та гілках липи (11,14 %).

Хімічний склад золи, є важливим показником в якості мінералів та їх співвідношення. Було проведено аналіз золи рослинної біомаси та представлено на рис. 4.6.

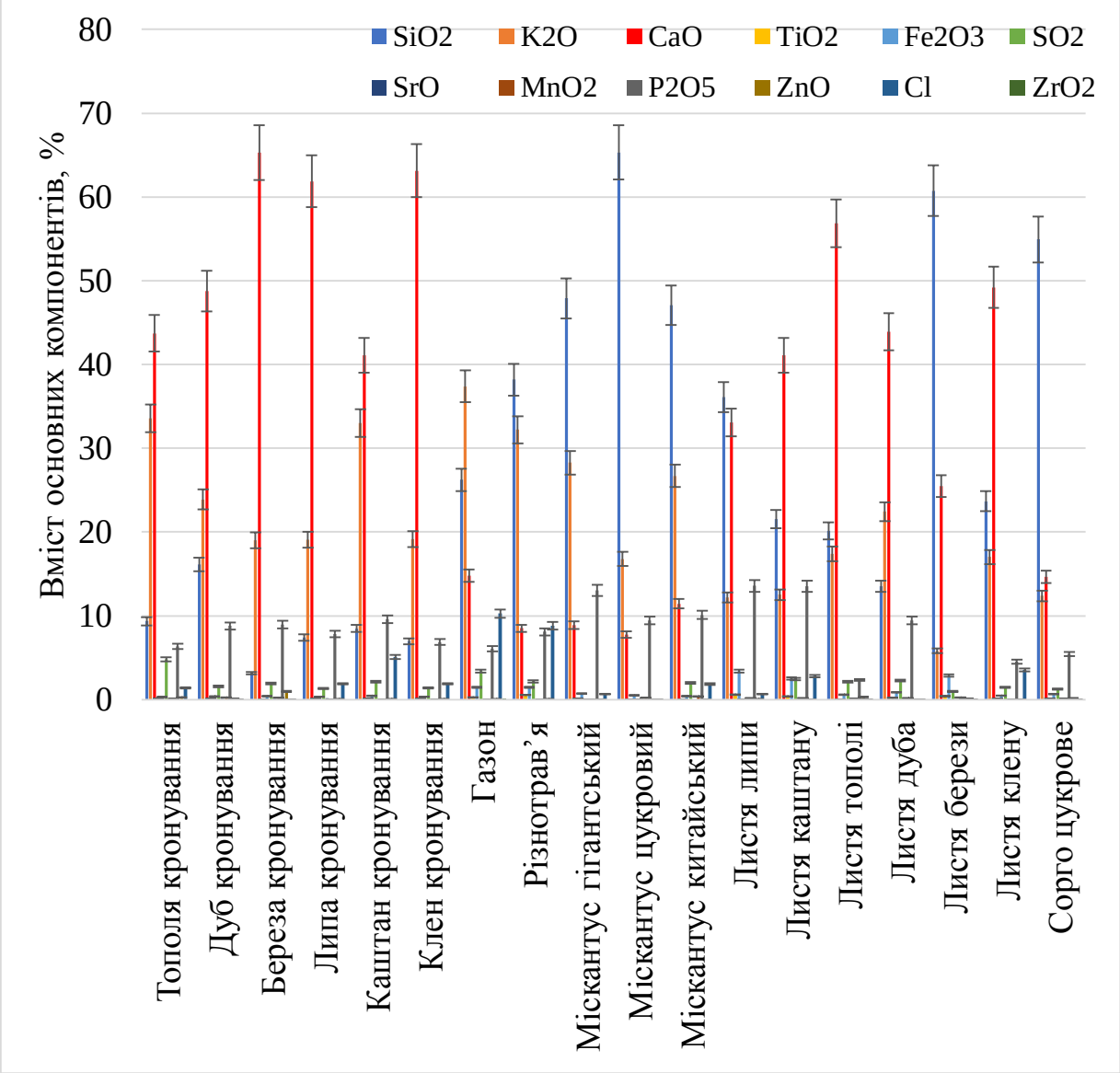


Рис. 4.6 Склад золи лігноцелюлозної біомаси

Аналіз зольності свідчить про наявність забруднювачів ґрунту (SiO_2), вміст яких значно вищий в опалому листі порівняно з обрізками дерев, у складі золи яких переважає оксид кальцію (CaO). Наявність ZrO_2 у досліджуваних пробах визначено лише в газонній траві в кількості 105 ppm. В інших зразках лігноцелюлозної сировини вміст ZrO_2 не фіксувався. Основні мікроелементи

містилися в зольному складі, а саме кальцій не замінний елемент для нормального росту та функціонування клітин. Один з основних компонентів, який бере участь в обміні білків та вуглеводів. Калій необхідний для нормального перебігу вуглеводному обміну, підвищує активність ферментів. Фосфор, що є незамінним джерелом енергії, відіграє важливу роль в обміні речовин, входить до складу АТФ.

Порівняльний аналіз показує, що порівняно із зеленими обрізками гілок загальний вміст целюлози та геміцелюлози в опалому листі підвищується у берези (7,56 %) та тополі (1,85 %) та зменшується в інших аналізованих порід: липи (- 9,50 %), клена (- 3,42 %), каштан (- 2,10 %), дуб (- 0,59 %). Загалом найбільший загальний вміст целюлози та геміцелюлози в міскантусі гігантському (70,02 %) та сорго цукровому (51,00 %), серед опалого листя – у листі клена (51,58 %) та липи (50,02 %), серед обрізків зелених гілок – у гілках клена (48,16 %), а також у гілках берези, каштана, тополі із вмістом загальної целюлози та геміцелюлози в межах 44,30–44,82 %, що дозволяє зробити висновок про наявність у цих видів сировини вищий потенціал для подальшого використання в технологіях виробництва біопалива шляхом ферментації.

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 хімічний склад цих видів було проаналізовано. На основі аналізу відкритих даних комунальних підприємств Києва встановлено, що 82,7 % усіх деревних насаджень (або 91,6 % без урахування хвойних) становлять шість порід дерев: клен, липа, тополя, каштан, дуб і береза. За результатами аналізу хімічного складу сировини, який проводили у таких групах, як обрізки зелених гілок, опале листя та трав’яна сировина, встановлено, що зразки міскантусу велетенського (44,71 %), листя тополі. (25,71 %), найбільший вміст целюлози мають гілки тополі (23,24 %) та газонна трава (21,12 %). Найбільший вміст геміцелюлози виявлено в листі клена (31,84 %), гілках клена (28,73 %), міскантусі гігантському (25,31 %) та придорожній траві (23,23 %).

Для встановлення макрокомпонентного складу незернової рослинної біомаси, а саме відсоткового вмісту целюлози, геміцелюлози та лігніну та основного джерела вуглецю у найбільш поширених видах лігноцелюлозних відходів було вивчено та проаналізовано склад їх незернової частини (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Компонентний склад незернової рослинної біомаси

Біомаса сільсько-господарських рослин	Вміст, %					
	Зольність	Смоли та жири	Водорозчинні речовини	Целюлоза	Лігнін	Геміцелюлоза
Triticum sp.	6,5±0,3	1,2± 0,1	11,5±0,5	43,5±1,7	12,9±0,5	24,4±1,1
Hordeum sp.	6,2±0,3	1,8± 0,1	7,7±0,3	43,1±1,7	15,5±0,6	25,7±1,0
Brassica napus	8,0±0,3	0,9±0,1	3,0±0,1	41,1±1,6	16,4± 0,7	30,6±1,2
Zey mays	7,4±0,3	3,9±0,5	10,0±0,4	36,8±1,5	16,9± 0,7	25,1±1,2
Glycine max	5,0±0,2	1,9±0,1	3,7±0,2	35,2±1,4	16,5± 0,7	37,7±1,4
Helianthu L.	1,5±0,1	1,5±0,1	10,7± 0,4	48,0±1,9	29,0±1,4	9,3±0,4
Panicum virgatum	5,4±0,2	2,0±0,1	8,7±0,4	46,7±1,9	13,8±0,6	23,4±0,9
Miscanthus giganteus	6,6±0,3	1,5±0,1	10,4±0,4	40,2±1,5	10,7± 0,4	30,6±1,2

В результаті проведених досліджень показано, що незернова рослинна біомаса містить компоненти, які можуть зброджуватись, а саме целюлолозу, геміцелюлозу, водорозчинні речовини та лігнін, що не конвертується мікроорганізмами, який складається з фенілпропанових ланок, пов'язаних різними типами міжодиничних зв'язків, які грають цементуючу роль для з'єднання клітин і збільшення властивостей механічної міцності, що робить лігноцелюлозу стійкою до біорозкладання мікроорганізмами. Тому видалення

лігніну з лігноцелюлозної біомаси перед гідролізом целюлози та геміцелюлози дуже бажано для успішної ферментації лігноцелюлози АБЕ. 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 бактерій, 15,5 % складав лігнін, який не використовується бактеріями. У біомасі ріпаку привалюючими компонентами були целюлоза 41,1 % та геміцелюлоза 30,6 %, склад не ферментуємого компоненту – лігніну 16,4 %. Відсотковий склад целюлози біомаси сої склав 35,2 %, основним компонентом виявилась геміцелюлоза 37,7 %, лігнін містився у 16,5 %. Біомаса соняшника містила найбільше целюлози 48,0 %, але і лігнін мав привалююче значення 29,0 %. Незернова частина проса характеризувалася домінуючим складом целюлози 46,7 % та геніцелюлози, 23,4 %. Компонентна частка лігнину 13,8 %. Слід відмітити, що біомаса міскантусу містила привалююче значення целюлолози 40,2 % та геміцелюлози 30,6 % і найнижчий показник лігніну 10,7 % порівняно з іншими культурами. Отримані данні, показують можливий потенціал біомаси як сировини для конвертування до бутанолу. Найбільша кількість лігніна містилася в незерновій біомасі соняшника, що свідчить про її низький потенціал, як сировини для біопалива.

Рослинні відходи посідають значне місце серед загальної кількості відходів переробної та харчової промисловості (Zhu et al., 2023). В асортименті фруктових відходів близько 70,0 % припадає на яблука, вичавки яких складають 35,0–40,0 % і які можна частково використовувати у виробництві оцту, спирту, пектинових препаратів (Can et al., 2024). Яблучні вичавки – це твердий, комплексний субстрат, який може варіювати за своїм складом. Яблучні вичавки в основному складаються зі шкірки та м’якоті (95 %), насіння (2–4 %) і стебла (1 %) (Ginni et al., 2020). Було визначено макрокомпонентний склад вичавок після

отримання соку з сорту Голден Делішес (рис. 4.7).

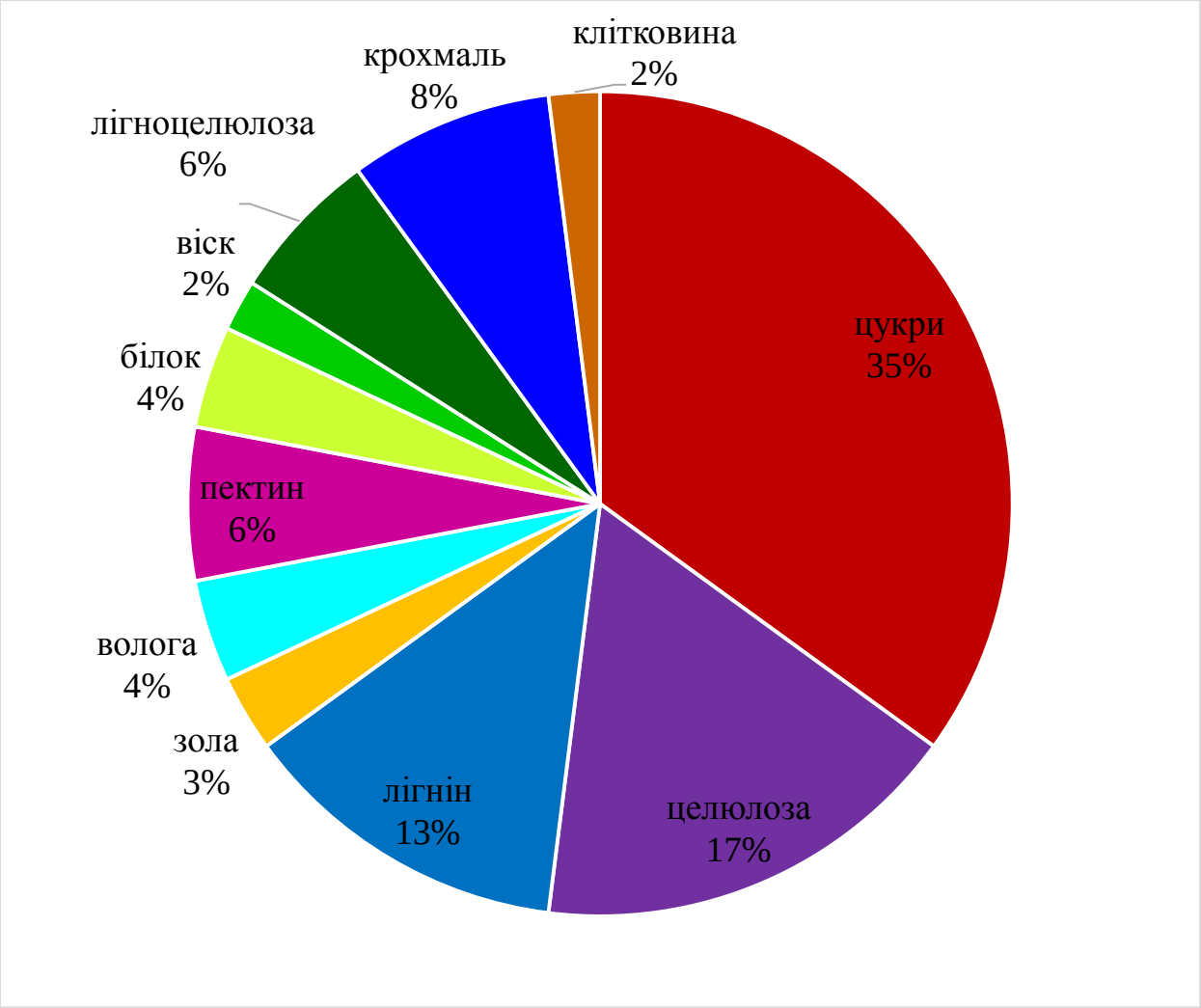


Рис. 4.7 Макрокомпонентний склад яблучних вичавок Голден Делішес,%

Показано, що найбільшу частину яблучних вичавок складали 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 Папіровка (рис. 4.8).

Було проаналізовано макрокомпонентний склад яблучних вичавок Папіровка та визначено їх кількісний та якісний склад (%): цукри 39; целюлоза 17; лігнін 12; зола 2; волога 4; пектин 12; білок 4; віск 2; лігноцелюлоза 8.

Отримані результати показали, що більша частина компонентів може бути використана у біоконверсії до бутанолу штамами-продуцентами роду *Clostridium*. Виняток становили пектин, клітковина та геміцелюлози, що ферментувалися лише частково та лігнін та віск, які не підлягали біоконверсії.

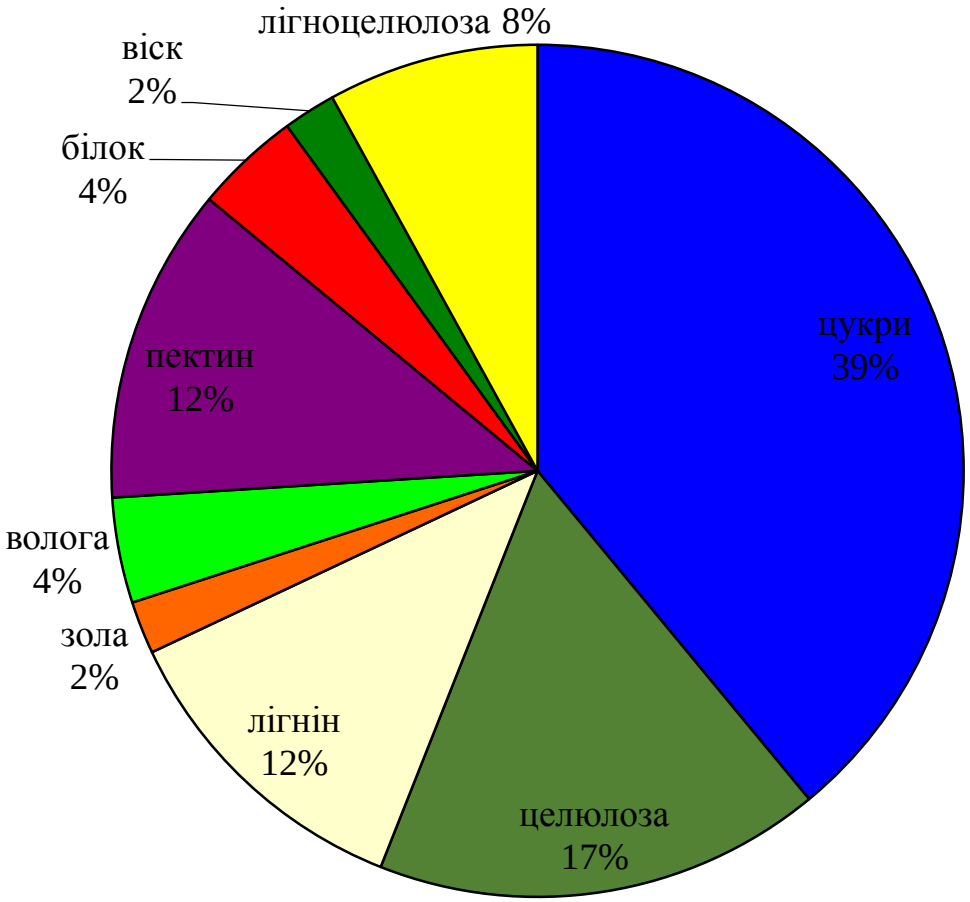


Рис. 4.8 Макрокомпонентний склад яблучних вичавок сорту Папіровка, %

Аналіз рослинної біомаси дозволяє врахувати та визначити з достатньою точність компоненти, які входять до її складу. Це перший етап для подальшого використання біомаси як субстрату, тому спочатку ми визначили макрокомпонентний склад біомаси сорго цукрового (рис. 4.9).

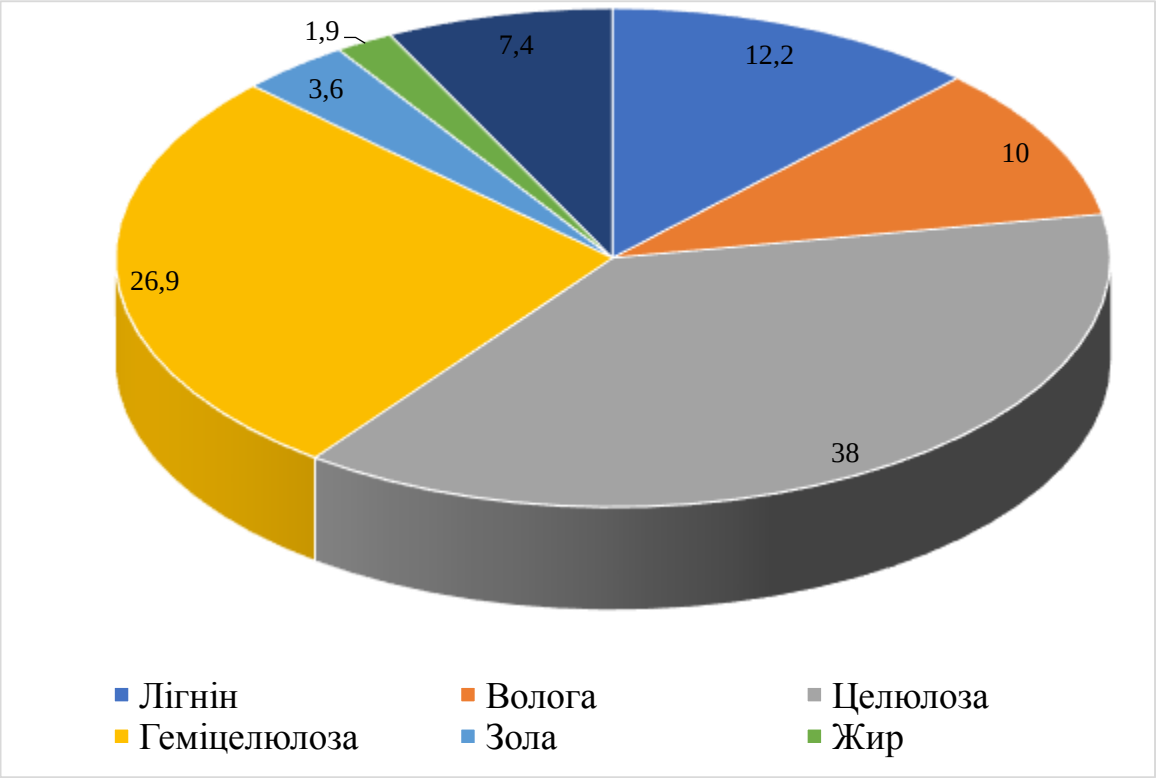


Рис. 4.9. Усереднений макрокомпонентний склад біомаси сортозразків сорго цукрового, %

Визначено, що найбільшу частину біомаси сорго складали целюлоза (38 %) та геміцелюлози (26,9 %), котрі у подальшому можна використати як субстрат, і лігнін (12,2 %), який не розкладається мікроорганізмами. Задля комплексного вивчення перспектив використання сорго цукрового як сировини для отримання бутанолу готували сік (використовується як субстрат в мікробіологічній промисловості) та як відходи – багасу. Сік зі стебел сорго цукрового отримують переважно за допомогою вальцевого пресу тому нами було використано соковитискач з подібним механізмом. Було визначено також і макрокомпонентний склад багаси сорго цукрового (рис. 4.10).

З наведених даних видно, що на відміну від біомаси багаса містить більше геміцелюлози (28 %) та лігніну (15 %), але менше целюлози (35 %). Визначено хімічний склад соку сорго цукрового, отриманого шляхом віджиму зеленої маси (табл. 4.4). Інтегральним показником, який характеризує ефективність вирощування сорго цукрового на енергетичні цілі, є вихід біопалива (біоетанолу, біогазу, твердого біопалива) та вихід енергії.

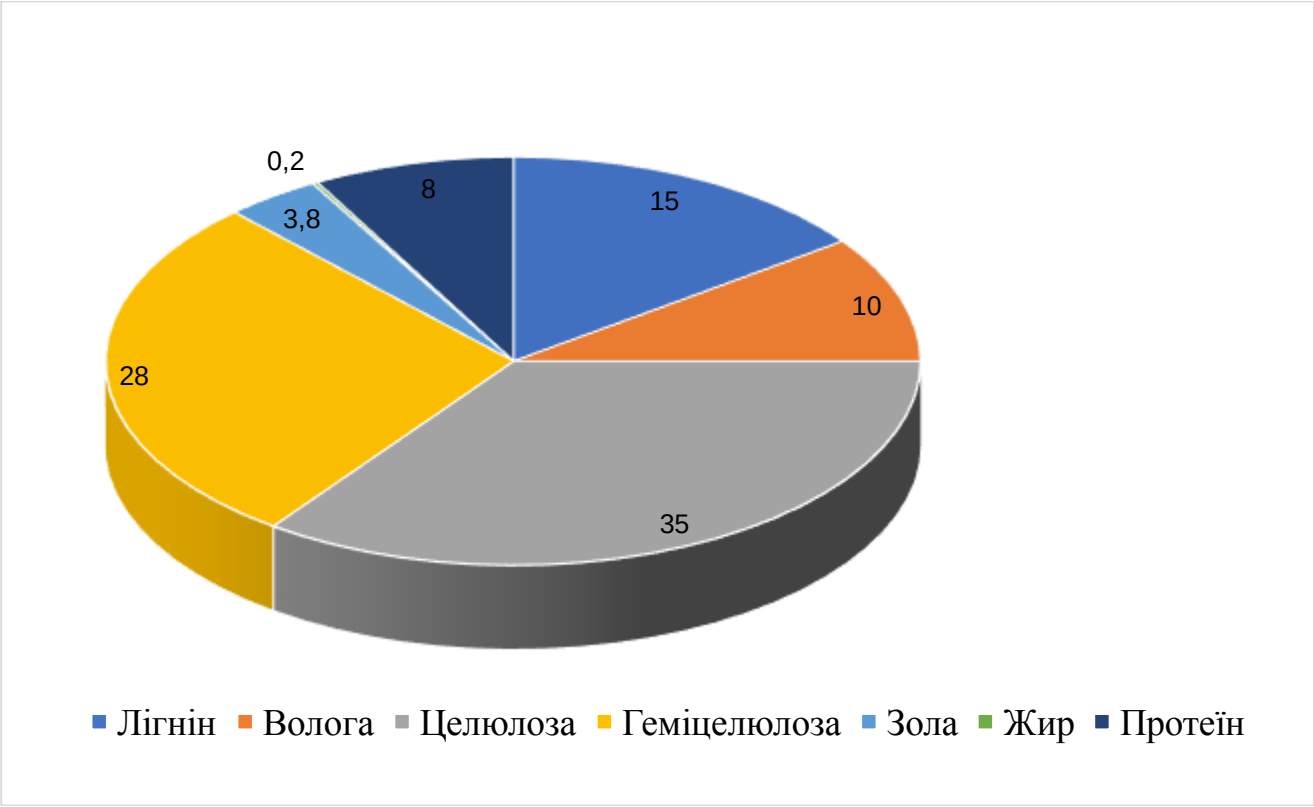


Рис. 4.10 Усереднений макрокомпонентний склад сортозразків багаси цукрового сорго, %

Таблиця 4.4

Усереднений хімічний склад соку сортозразків цукрового сорго

Показник	Значення
Концентрація сухих речовин, %	17,6 ±0,7
Вміст цукрів, що зброджуються:	
всього	15,3±0,6
в тому числі: сахароза	9,4±0,4
фруктоза	1,2±0,1
глюкоза	2,5±0,3
інші моноцукри	1,9±0,1
pH соку	5,0±0,01
Вміст загального азоту, %	сліди

Отримані результати свідчать про те, що сік сорго містив достатню кількість

мікроелементів і амінокислот (табл. 4.5), необхідних для життєдіяльності мікроорганізмів (Gripp et al., 2020), і має певну кількість цукрів, придатних для біоконверсії. Отже, за своїми технологічними характеристиками сік сорго цукрового є придатною сировиною для біоконверсії.

Таблиця 4.5

Амінокислотний склад соку цукрового сорго

Назва амінокислоти	Вміст, мкг/100 г соку	Назва амінокислоти	Вміст, мкг/100 г соку
аланін	1030,0±41,2	лізін	760,0±30,4
аргінін	485,0±19,4	метионін	850,0±10,0
аспарагінова кислота	1225,0±49,0	пролін	480,0±19,2
валін	1464,0±58,8	серин	1745,±69,8
гістидин	940,0±37,6	тирозин	1035,0±41,4
гліцин	415,0±16,6	треонин	930,0±37,2
глутамінова кислота	220,0±8,8	фенілаланін	580,0±23,2
ізолейцин	1030,0±41,2	цистін	50,0±2,0
лейцин	1300,0±52,0		

4.2 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 накопичення бутанолу. Результати представлено на рис. 4.11.

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 найбільше бутанолу було за використання незернової біомаси сої (0,8 г/л), а найменше – соняшника (0,4 г/л). Визначено, що накопичення за культивування на ріпаку та кукурудзі було однаковим (0,7 г/л), ймовірно пояснюється схожим відсотком лігніну у сировині. Бутанол накопичувався на біомасі ячменю 0,6 г/л, а на пшениці – 0,5 г/л.

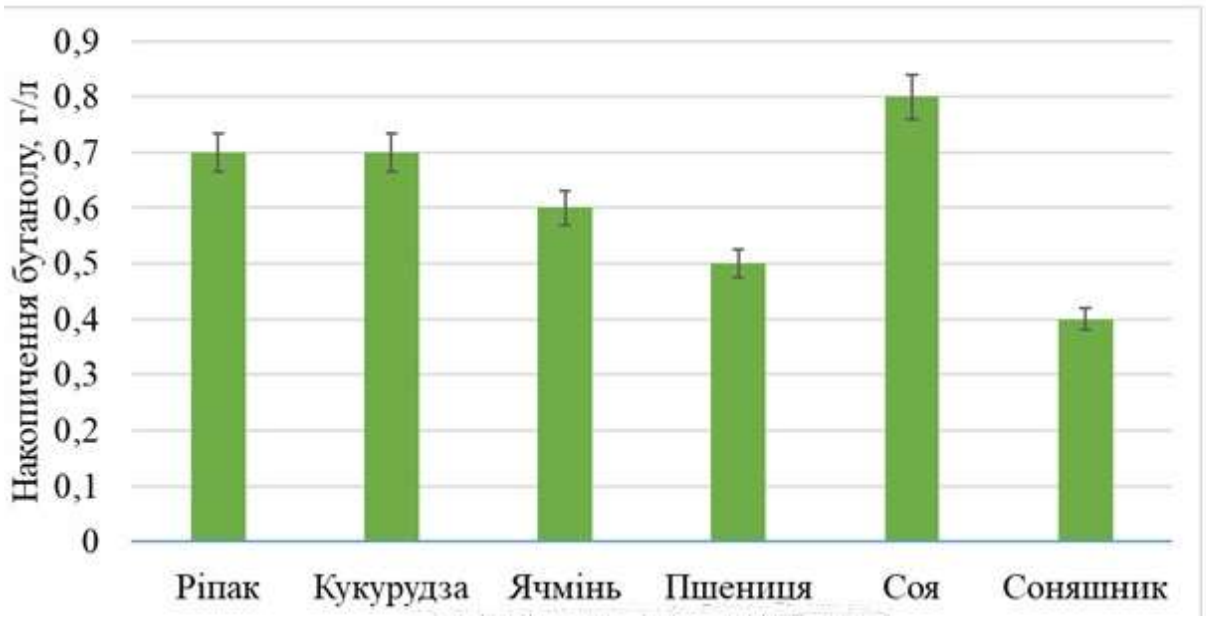


Рис. 4.11 Накопичення бутанолу за культивування на різних видах незернової рослинної біомаси *Clostridium* sp. UCM B-7570

Перспективним субстратом для використання у біопаливній промисловості є подрібнена біомаса бульб та сік топінамбура, які є альтернативним джерелом сахаридів для ферментативного виробництва бутанолу в процесі АБЕ; вони можуть вирощуватися на маргінальних землях і стійкі до типових хвороб рослин, тому немає прямої конкуренції із зерновими культурами за орні землі. Бульби топінамбура (як і всі представники родини складноцвітих) є багатим джерелом інуліну, полімеру для накопичення вуглеводів, що складається з лінійних ланцюгів β (2 → 1)-зв'язаних одиниць d-фруктози з α (1 → 2) пов'язана зв'язком фруктозна кришка. Інулін є основним запасним вуглеводом у бульбі (15–20 %); однак мономерні цукри, такі як сахароза, глюкоза та фруктоза, також можуть бути присутніми. Величезна кількість мікроорганізмів не здатна безпосередньо

ферментувати інулін; тому необхідний попередній гідроліз до фруктози та глюкози (ферментативним шляхом або за допомогою кислотного каталізатора). Для порівняння, гідроліз за допомогою кислотного каталізатора може досягати конверсії до 98,5 % за 35 хвилин з концентраціями побічних продуктів нижче інгібуючого порогу, тоді як ферментативна конверсія того ж екстракту топінамбура вимагає 24 годин. Час гідролізу та вартість каталізатора, ймовірно, зроблять кислотний гідроліз сприятливим варіантом. Було проведено дослідження з використанням соку топінамбура як субстрату для культивування штамів *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *Clostridium* sp. UCM B-7570. Отримані результати наведено на рис. 4.12.

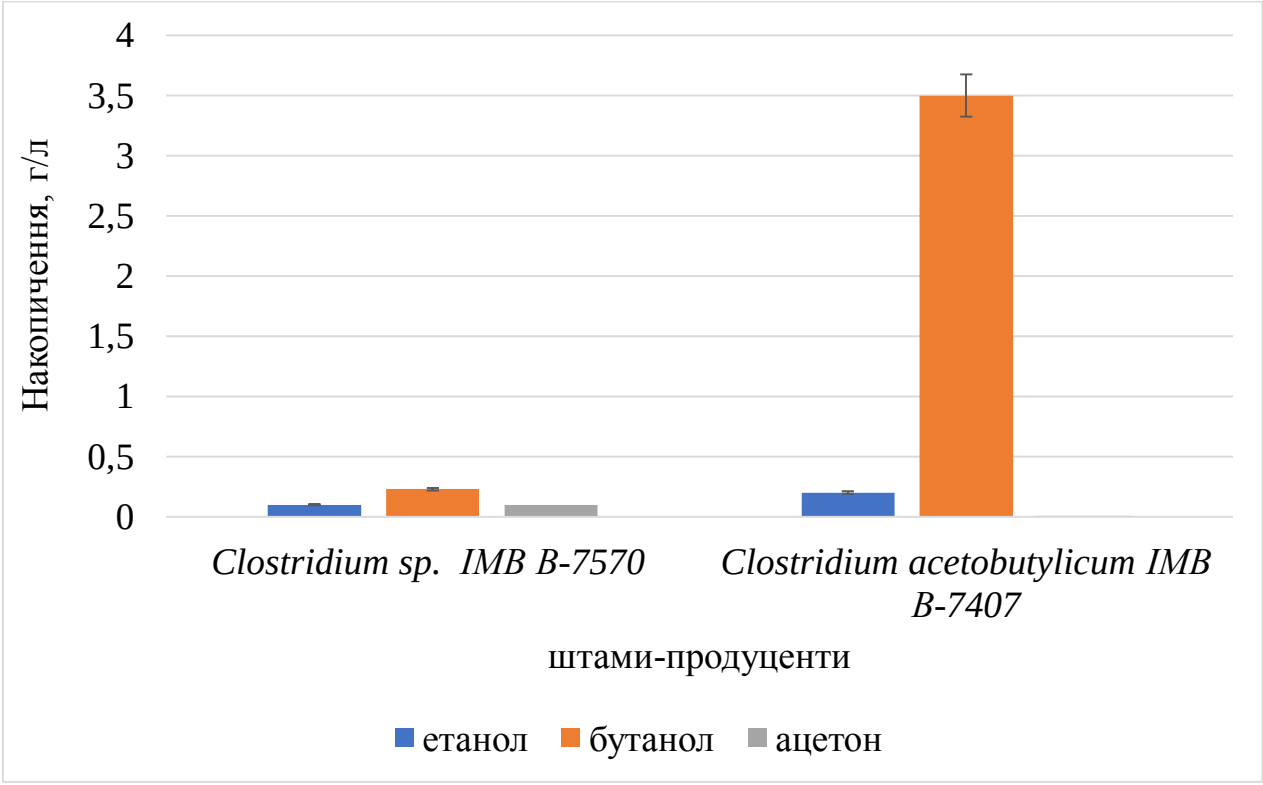


Рис. 4.12 Накопичення продуктів АБЕ ферментації з використанням соку топінамбура як субстрату

З рис. 3.12 видно, що накопичення бутанолу у культуральній рідині штамом *C. acetobutylicum* UCM B-7407 становило 3,5 г/л, етанолу – 0,2 г/л, ацетон не продукувався. Натомість, штам *Clostridium* sp. UCM B-7570 майже не конвертував сік топінамбура до продуктів АБЕ ферментації. Отримані дані

свідчать, що клубні топінамбура містять інгібітори розвитку та росту мікроорганізмів.

4.2.1 Використання біомаси ріпаку

Для визначення можливих джерел вуглецю, які входять до складу біомаси ріпаку, було досліджено та визначено основні макрокомпоненти незернової частини рослин, яка залишилась від збору врожаю 2017 р., виключаючи корені (рис. 4.13).

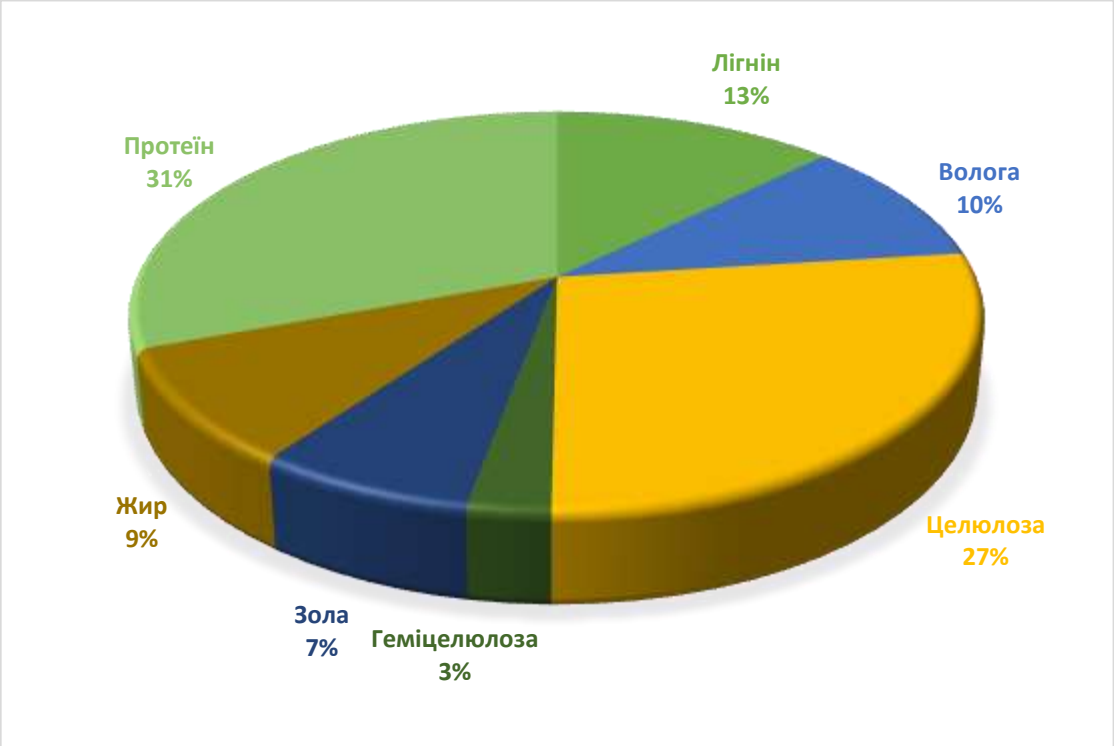


Рис. 4.13 Макрокомпонентний склад незернової біомаси ріпаку

Макрокомпонентний склад біомаси ріпаку: 31 % – протеїну, 27 % – целюлози та 3 % – геміцелюлози. Крім того, до складу біомаси ще входило 13 % лігніну, який не асимілювався мікроорганізмами. З отриманих даних видно, яку частину рослинної біомаси ріпаку можуть використовувати бактерії роду *Clostridium* для асимілювання.

Було проведено дослідження накопичення бутанолу штамами-

продуцентами *Clostridium* sp. UCM B-7570, *C. tyrobutylicum* IFBG C4B та C. *acetobutylicum* UCM B-7407 в процесі культивування за використання біомаси ріпаку як субстрату (рис. 4.14). Після ферментації штамів-продуцентів у культуральній рідині було виявлено три основні продукти АБЕ процесу (ацетон, бутанол і етанол).

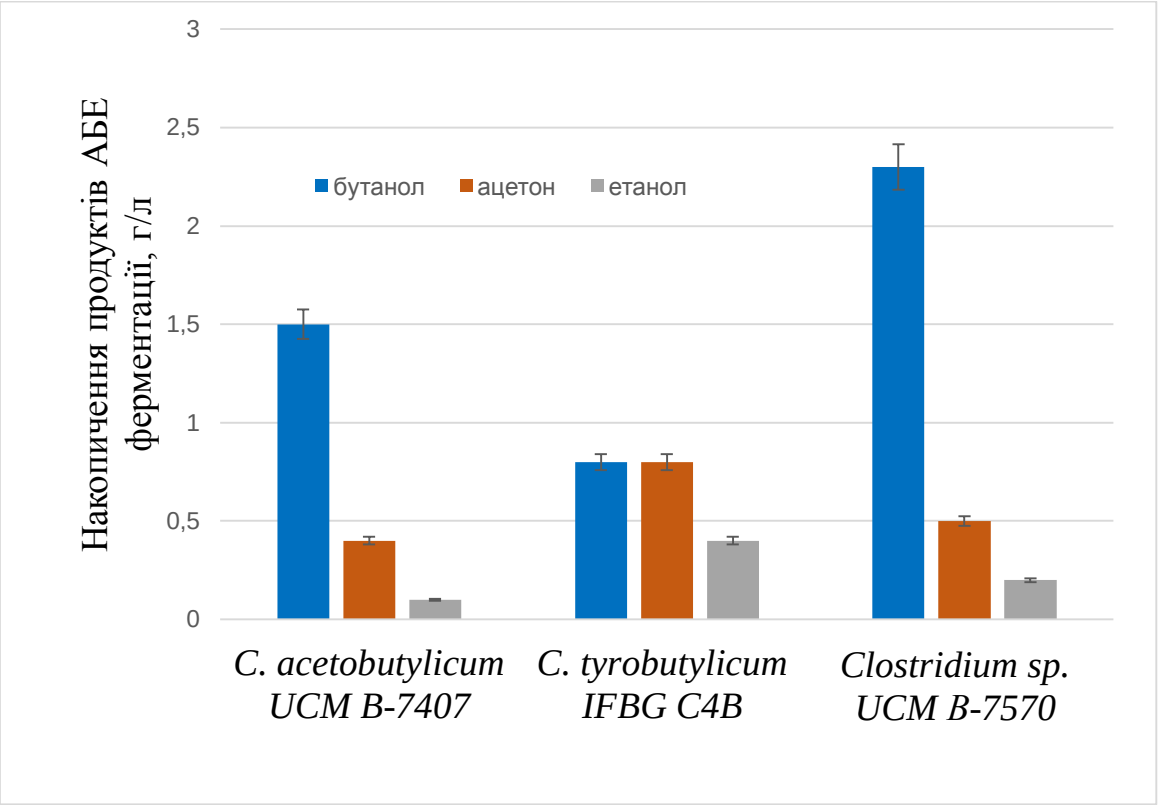


Рис. 4.14 Накопичення продуктів АБЕ ферментації за використання ріпаку як субстрату

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. Для подальших досліджень було відібрано штам *Clostridium* sp. UCM B-7570, який продукував найбільше бутанолу з біомаси ріпку.

Було проведено дослідження впливу різного ступеня подрібнення субстрату на накопичення бутанолу за використання біомаси ріпаку як субстрату та штаму

продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 (рис. 4.15).

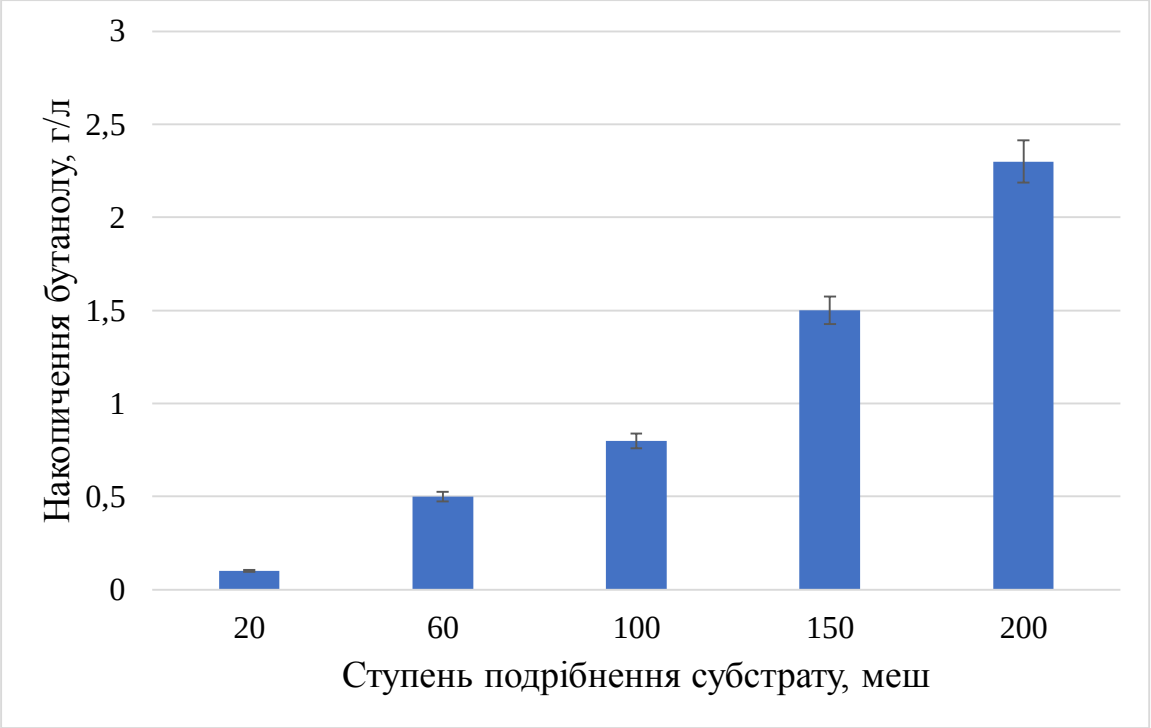


Рис. 4.15 Вплив різного ступеня подрібнення незернової рослинної біомаси ріпаку на накопичення бутанолу

З рис. 4.15 видно, що бутанол накопичувався у концентрації до 0,1 г/л за використання найменш подрібненої 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 про те, що під час подрібнення субстрату підвищувалась біодоступність сировини. Таке підвищення біодоступності субстрату можливо за рахунок того, що під час подрібнення зменьшувалась кількість кристалічних зон целюлози і збільшувалась кількість аморфних зон, які легко розщеплюються ензимами. У бактерій роду *Clostridium* такі ензими, які розщеплюють целюлозу, входять до складу екстрацелюлярного мультибілкового комплексу – целюлосоми (Minor et al., 2024). Кількість целюлосом пропорційно пов’язана з чисельністю бактерій у ферментаційному середовищі. Чисельність бактерій на початку ферментації залежить від якості та кількості інокуляту. Саме

тому, для стантдартизації кількості внесених бактерій в інокулят використовують рідкі поживні середовища з водорозчинними джерелами вуглецю.

Було проведено дослідження впливу концентрації посівного матеріалу штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 на накопичення бутанолу з використанням біомаси ріпаку як субстрату (рис. 4.16).

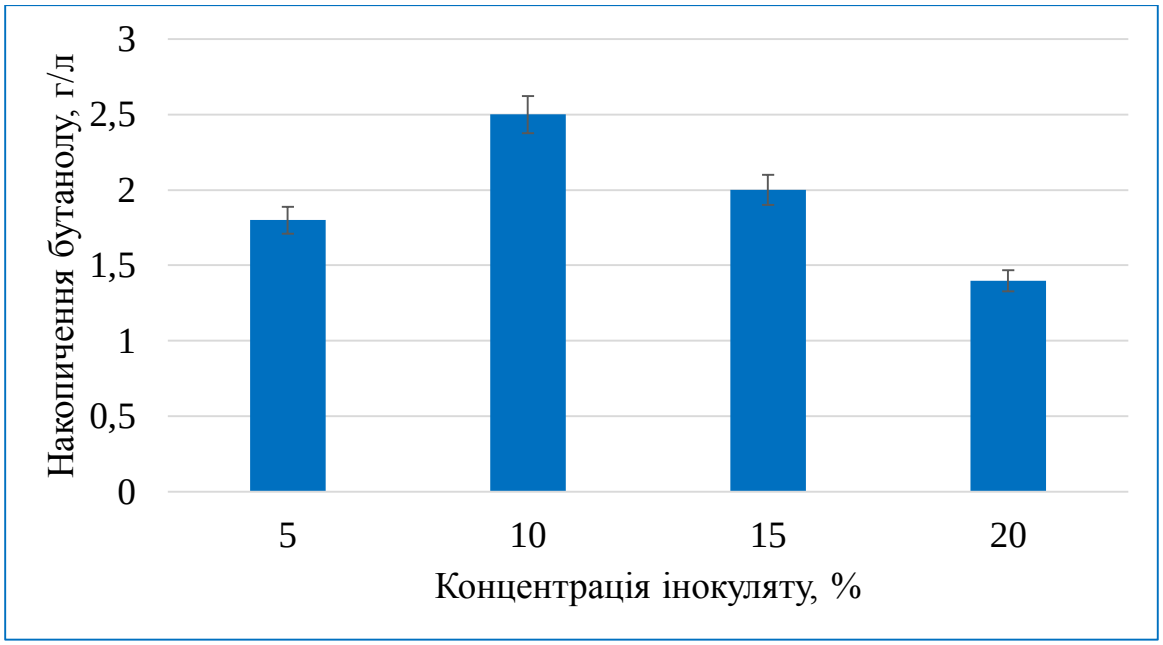


Рис 4.16 Вплив різної концентрації інокуляту *Clostridium* sp. UCM B-7570 на накопичення бутанолу

В 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 культивації 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 первиних метаболітів АБЕ

бродіння (масляної, молочної та оцтової кислот). Оптимальна концентрація посівного матеріалу, який додавали до ферментаційної суміші складала 10 %, при цьому 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. Було проведено дослідження впливу різної концентрації біомаси ріпаку у ферментаційному середовищі на накопичення бутанолу (рис. 4.17).

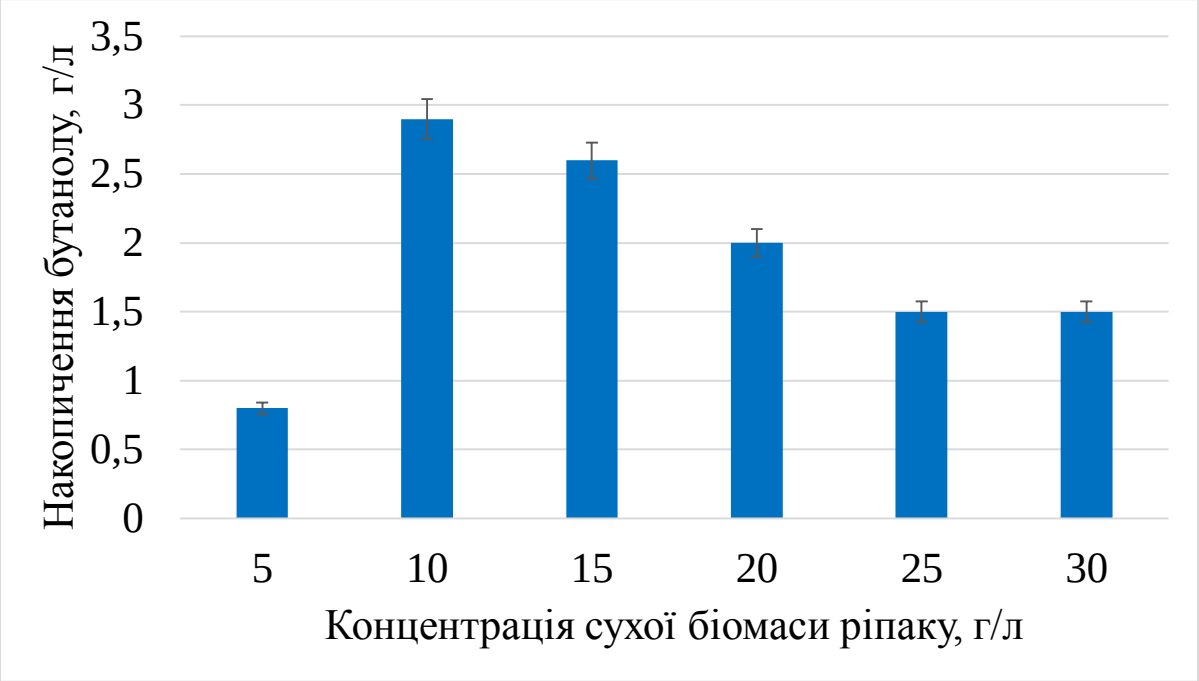


Рис. 4.17 Вплив концентрації біомаси ріпаку на накопичення бутанолу

Отримані дані свідчать, що накопичення бутанолу в ферментаційній суміші зростало пропорційно збільшенню концентрації біомаси ріпаку (субстрату) від 5 до 10 г/л. При підвіщенні кількості внесеної сухої подрібненої біомаси ріпаку від 15,0 до 30,0 г/л, накопичення бутанолу падало. 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 штамами *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.

4.2.2 Використання відходів від виробництва яблучного соку як субстрату

Промислові відходи виробництва яблучного соку (вичавки) містять цінні сполуки, такі як розчинні цукри, структурні вуглеводи (целюлоза та геміцелюлоза), мінерали та вітаміни (рис. 4.7, рис. 4.8.). Було проведено ферментацію з використанням 100 г/л вичавок та штамів продуцентів *Clostridium* sp. UCM B-7570 та *C. acetobutylicum* UCM B-7407 (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Кінцеві показники ефективності бродіння вичавок штамами-продуцентами

Штам	Бутанол, г/л	Етанол, г/л	Виділено газів, г/л	Конверсія цукру, %	Сухий залишок, г
UCM B-7570	8,0±0,3	1,3±0,1	3,8±0,2	85,0±3,4	34,2±1,4
UCM B-7407	6,0±0,2	0,9±0,1	3,5±0,1	80,0±3,2	38,6±1,5

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 для обох штамів. Кількість виділених газів (суміші CO_2 та H_2) була майже однакової для обох ферментацій (3,8 та 3,5 г/л, відповідно). Конверсія цукрів склала 85 і 80 %, відповідно, а сухий залишок 34,15 та 38,6. У подальших дослідах використовували штам *Clostridium* sp. UCM B-7570, який накопичував найбільшу кількість цільового продукту, мав найбільшу конвертацію цукру та найменший сухий залишок. У табл. 4.6 наведено показники ферментації вичавок.

Таблиця 4.6

Характеристики ферментації штамами-продуцентами

Штами	CO_2 г/100 мл	pH середо-вища	Сухі речовини, %	Біомаса, г/л	Вміст бутанолу, г/л
UCM B-7570	0,4±0,1	3,8±0,2	7,2±0,3	0,8±0,1	2,0±0,1
UCM B-7407	0,3±0,1	3,6±0,1	5,9±0,3	0,9±0,1	5,0±0,3

У процесі культивування відбулось закислення середовища. Визначено, що основними кислотами були масляна та оцтова, що корелює з результатами робіт (Amprese et al., 2023; Bravo-Venegas et al., 2023). Важливим параметром, який впливає на накопичення в культуральній рідині бутанолу є якість та кількість інокуляту Було проведено дослідження впливу внесеного інокуляту на глицериновому середовищі на накопичення бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 (рис. 4.18).

Для рівномірного розподілення концентрації бактерій в інокуляційному середовищі використовують водорозчинні джерела вуглецю, як гліцерин. У результаті проведених досліджень показано, що концентрація внесеного інокуляту у посівне середовище суттєво впливає на накопичення бутанолу в

ензиматичному середовищі. Виявлено, що зі збільшенням концентрації посівного матеріалу від 5 до 10 % від ферментаційної суміші кількість бутанолу після процессу збільшується прямопропорційно.

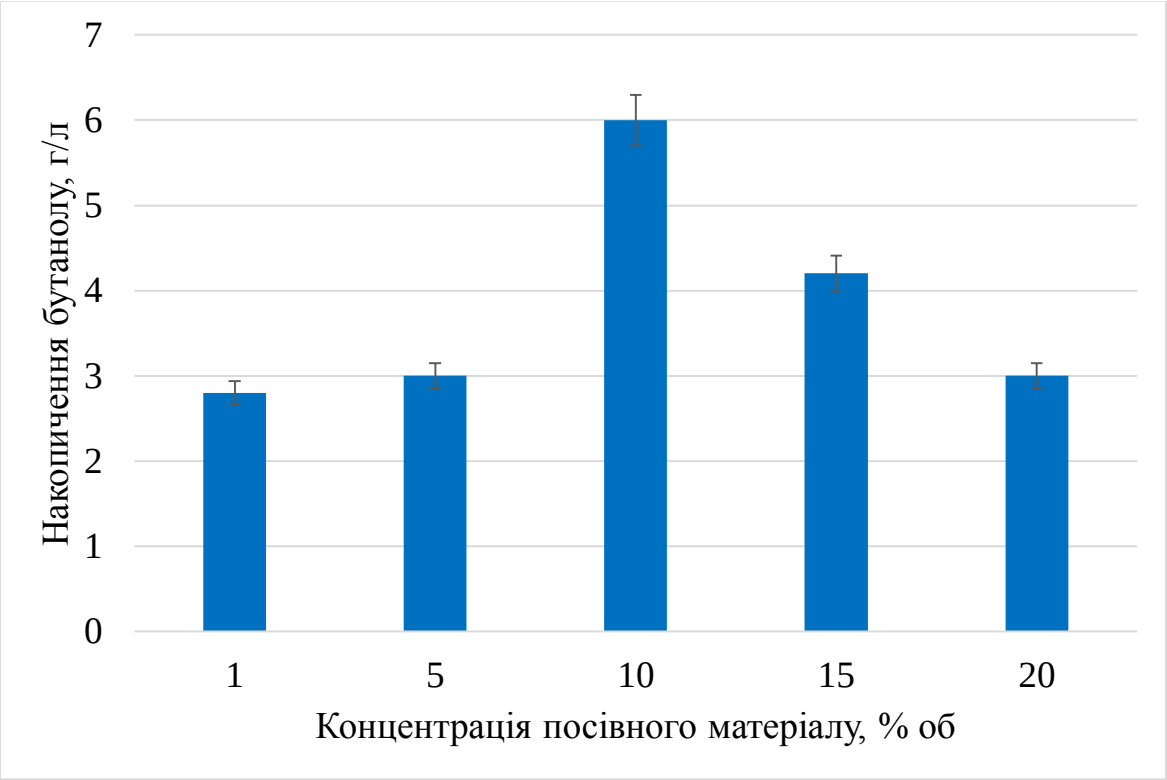


Рис. 4.18 Вплив внесеного інокуляту (% об) на накопичення бутанолу у культуральному середовищі

З підвищенням концентрації інокуляту до 15-20 % накопичення бутанолу зменшується порівняно з попередніми данними. Слід відмітити, що подальше підвищення кількості посівного матеріалу, доданого до ферментаційної суміші, загалом пригнічувало синтез бутанолу в середовищі. Оптимальною концентрацією посівного матеріалу, який додавався до ферментаційної суміші, було 10 %. При цьому накопичувалось найбільше бутанолу – 8 г/л. Подальші дослідження проводились саме за такої концентрації інокуляту.Однак, не лише концентрація посівного відіграє ключову роль у накопиченні бутанолу після ферментації. Основним фактором, який впливає на ріст, розвиток та АБЕ процес бактерій є концентрація доступного джерела вуглецю. Було проведено

дослідження впливу різної концентрації біомаси яблучних вичавок у ензиматичному середовищі на накопичення бутанолу (рис. 4.19).

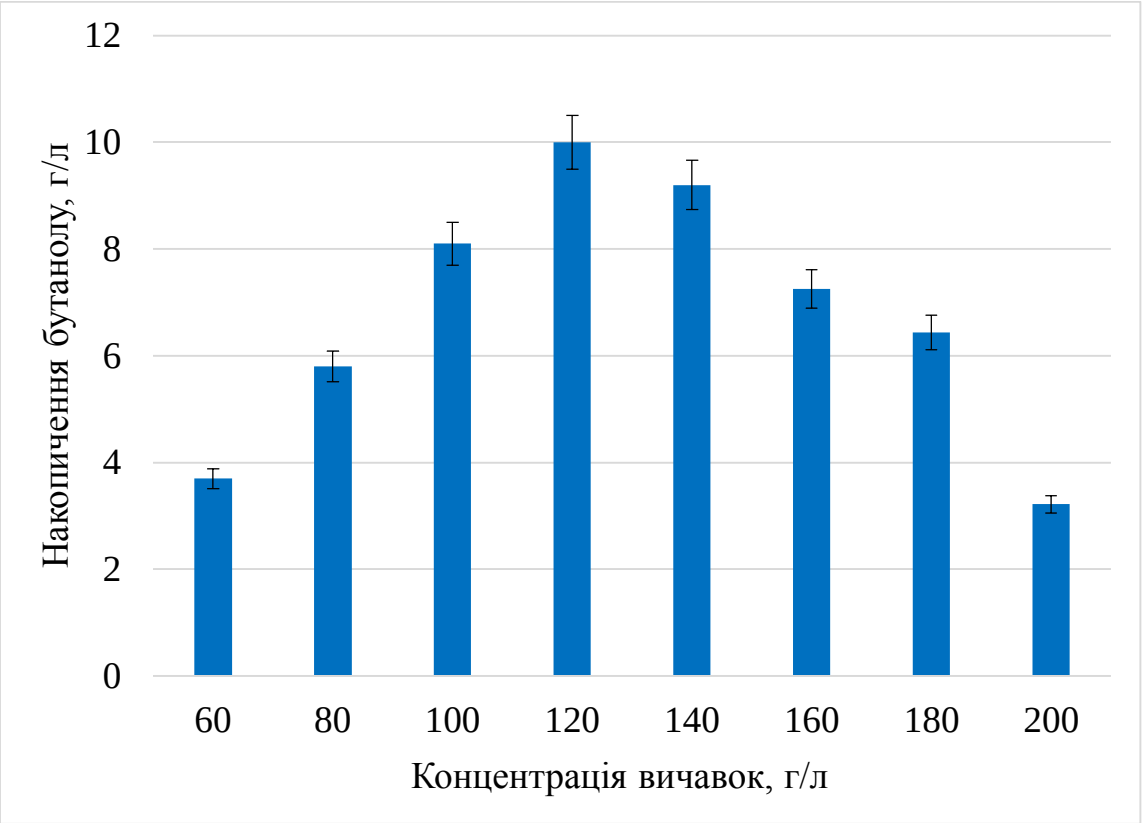


Рис.4.19 Вплив різної концентрації вичавок на накопичення бутанолу

Отримані данні свідчать, що накопичення бутанолу в ферментаційній суміші росте прямопропорційно зі збільшенням концентрації яблучних вичавок від 60 до 120 г/л, при подальшому підвіщенні від 140 до 200 г/л накопичення бутанолу падало. Результати дослідження свідчать про те, 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, наше дослідження альтернативного субстрату – яблучних вичавок показало можливість його конвертування штамами *Clostridium* sp. UCM B-7570 та *C. acetobutylicum* UCM B-7407 до бутанолу без гідролізу.

Макрокомпонентний склад субстрату свідчив, що більша його частина може бути використана бактеріями для росту, розвитку та накопичення

цільового продукту. Показано, що один штам (*Clostridium* sp. UCM B-7570) в процесі культивування конвертував більший відсоток яблучних вичавок до бутанолу. Проведені дослідження з наголошеним штамом і кількістю субстрату та інокуляту показали, що за оптимізації цих параметрів культивування накопичення бутанолу збільшилось. Виявлено, що оптимальним параметром внесеного посівного матеріалу було 10 %, за якого накопичувалось бутанолу 8 г/л. Визначено, що найбільше бутанолу накопичувалось за концентрації яблучних вичавок 120 г/л і становило 10 г/л. Отримані дані показують можливість використання яблучних вичавок як субстрату в технології біобутанолу.

4.2.3 Використання сорго цукрового

Отримання бутанолу з використанням сорго цукрового як сировини в основному находиться на стадії розробки, що говорить про актуальність саме нашого дослідження. Проведено культивування штамів *Clostridium* sp. UCM B-7570, *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *C. tyrobutylicum* IFBG C4B з використанням як субстрату соку, багаси і незернової біомаси сорго цукрового (рис. 4.20).

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 C4B. Найбільше накопичення (8,2 г/л) бутанолу було за використання нативного соку сорго цукрового та штаму *C. acetobutylicum* UCM B-7407, а для рослинної біомаси – *Clostridium* sp. UCM B-7570 (5,5 г/л). Підготовка субстрату впливає на накопичення кінцевого продукту, тому на першому етапі підготовки біомаси сорго цукрового (сорт Energodar, hybrid AMBR-1, hybrid-720, hybrid ST-207) висушували до сталої вологи (7 %) та подрібнювали. Для вивчення можливості культури *Clostridium* sp. UCM B-7570 використовувати як субстрат біомасу сорго цукрового (сорт Energodar, hybrid AMBR-1, hybrid-720, hybrid ST-207) проводили культивування

глибинним способом (Nabila et al., 2024) у чашках Петрі з агаризованим середовищем (Рис 4.21).

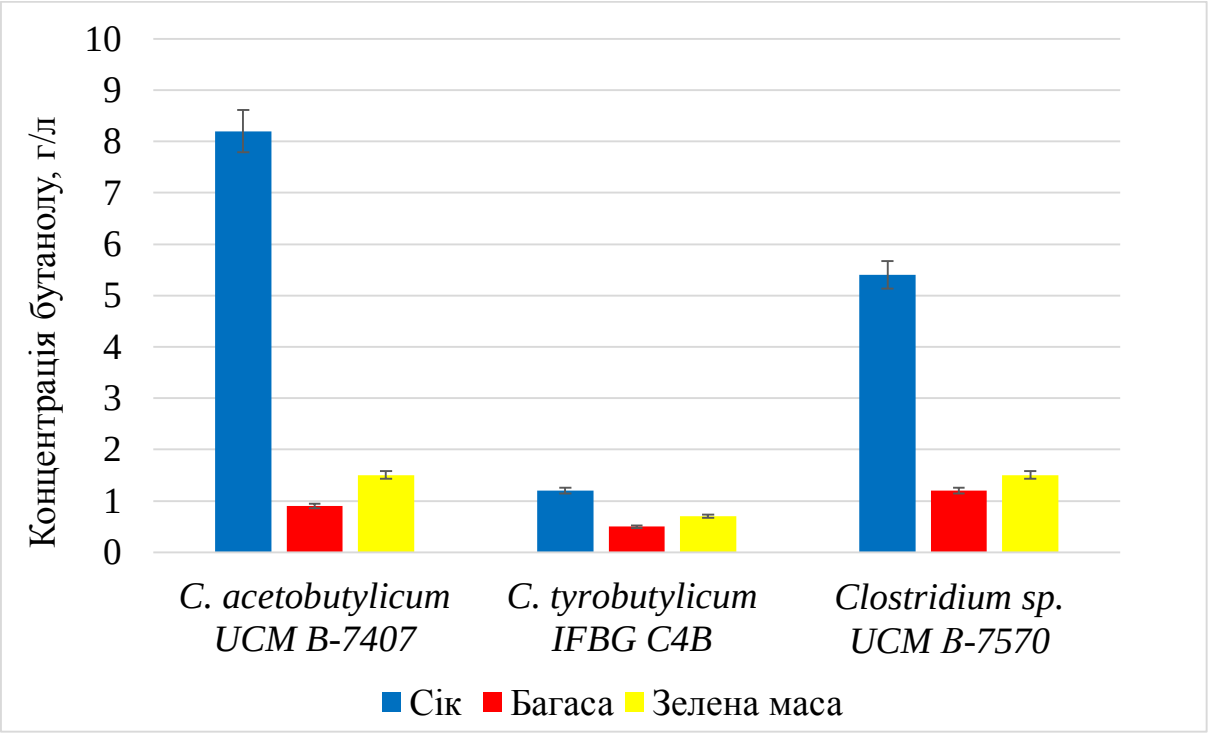


Рис. 4.20. Накопичення бутанолу за використання різних штамів-продуцентів

Отримані дані показують, що культура *Clostridium* sp. UCM B-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 B-7570 може ферментувати біомасу усіх 4 сортів сорго. Колонії культури було досліджено за за допомогою мікроскопу Carl Zeiss 2000-c (Німеччина) (рис. 4.22).

Отримані результати свідчать про те, що штам *Clostridium* sp. UCM B-7570 утворює колонії у всіх агаризованих середовищах. 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 змінили свою форму з двояковипуклої лінзи (Тігунова та Шульга, 2013) на амебоподібну, за

вирощування у товщі агару, що можливо зв’язано зі складністю в доступності субстрату (рис. 4.22 а).

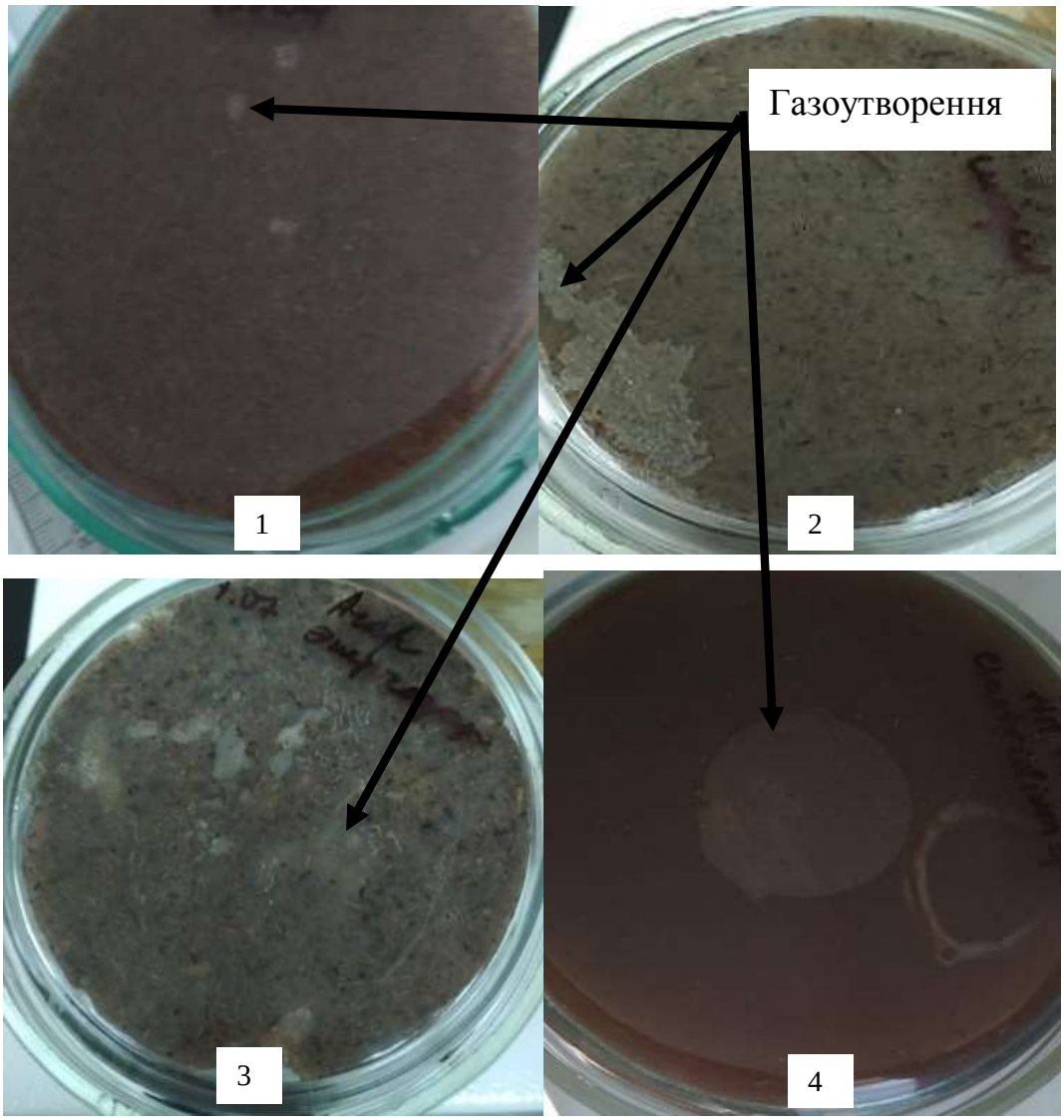
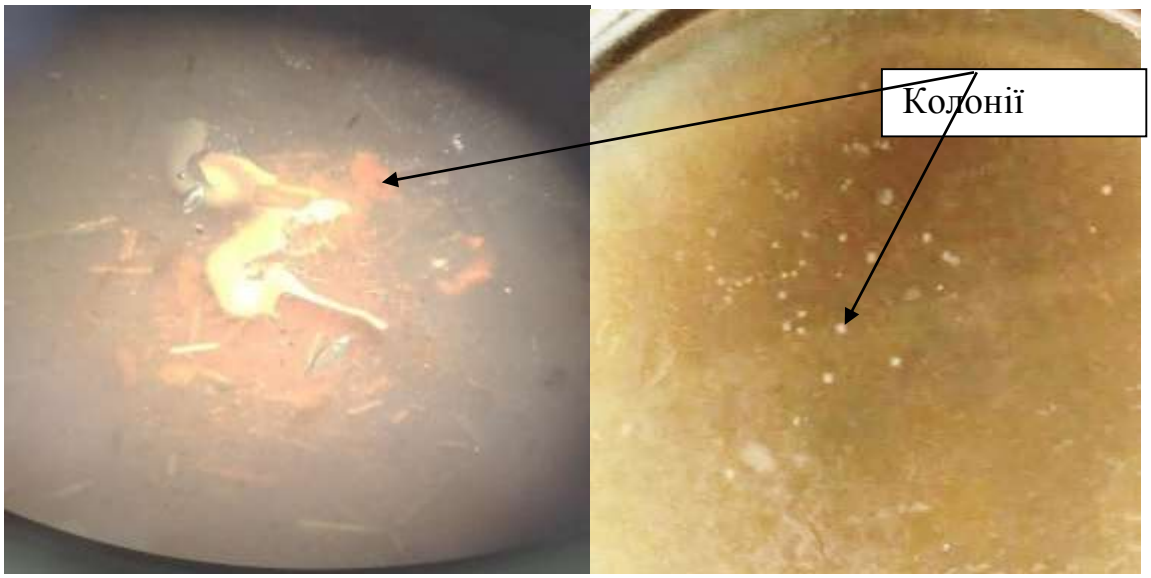


Рис. 4.21 Газоутворення культурою *Clostridium* sp. UCM B-7570 на агаризованій біомасі сорго цукрового (1 – hybrid 720, 2 – hybrid AMBR, 3 – Energodar, 4 – hybrid ST-207) як субстратів

Однак колонії залишались незмінними (рис. 4.22 б) за умов культивування на поверхні агару в анаеробних умовах. Клітини бактерій було промікроскопійовано використовуючи метиленовий синій (рис. 4.23.). Було показано, що клітини культури *Clostridium* sp. UCM B-7570 з агаризованих середовищ 4-х сортів сорго не змінили своєї морфології порівняно з вихідною

культурою. Для вивчення здатності до накопичення бутанолу на рідкому середовищі було пересаджено колонії з середовища з сорго (рис. 4.24).



а **б**

Рис. 4.22 Колонії культури *Clostridium* sp. UCM B-7570 у товщі агару (а) збільшення 23×10 та на поверхні (б)

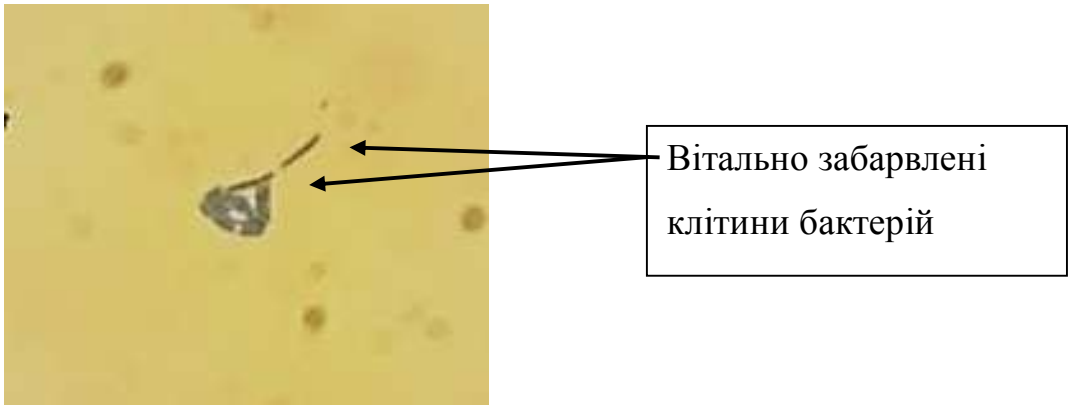


Рис. 4.23 Клітини бактерій *Clostridium* sp. UCM B-7570 зафарбовані метиленовим синім (збільшення 400)

Було показано, що при перенесенні культури *Clostridium* sp. UCM B-7570 на рідке середовище її бродильна активність не змінюється. Отже, культура не деградує та здатна до накопичення продуктів АБЕ ферментації у культуральній

рідині. Було проведено дослідження з вивчення потенціалу до накопичення продуктів АБЕ ферментації на біомасі 4-х сортозразків сорго.

Для вивчення можливості накопичення бутанолу в рідкому середовищі, колонії пересаджували з агаризованого середовища на створене ензиматичне середовище, яке містило 60 г/л кожного генотипу сорго цукрового (сорт Energodar, hybrid AMBR, hybrid-720, hybrid ST-207) та висаджено культуру *Clostridium* sp. UCM B-7570 (рис. 4.25).



Рис. 4.24 Бродильна активність колонії *Clostridium* sp. UCM B-7570 з агаризованих середовищ



Рис. 4.25 Бродильна активність культури *Clostridium* sp. UCM B-7570

За культивування за різних сортів сорго цукрового було показано активне

бродіння з наступним накопиченням продуктів АБЕ ферментації у культуральній рідині, яке було визначено за використання газової хроматографії (рис. 4.26). Найбільший рівень накопичення бутанолу у культуральній рідині відбулося 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).

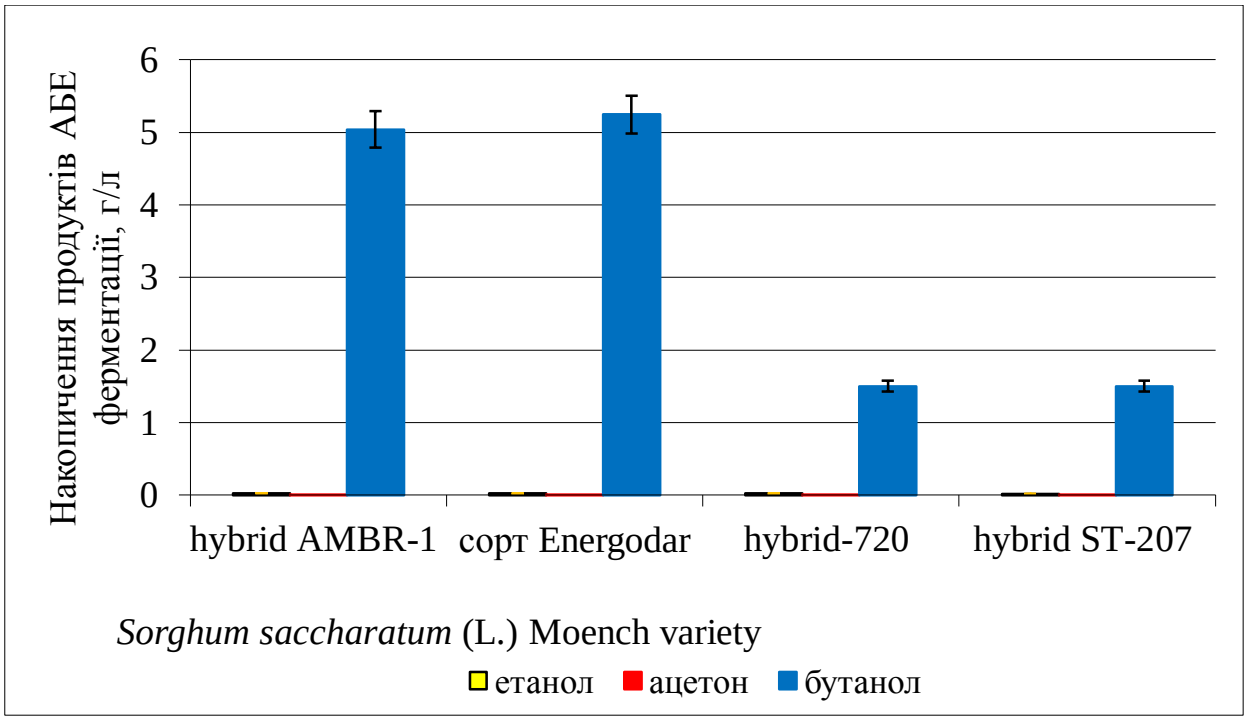


Рис. 4.26 Накопичення продуктів АБЕ ферментації за культивування *Clostridium* sp. UCM B-7570 в рідкому середовищі за використання сортозразків

4.2.4 Вивчення гліцерину як субстрату

В процесі виробництва біодизелю з відновлювальної біомаси в значній кількості утворюється гліцерин, як побічний продукт переетерифікації рослинних олій (Bansod et al., 2024). Основною проблемою застосування сирого гліцерину для промислового бродіння є інгібуючий ефект, викликаний домішками (Attarbachi et al., 2024). Після переетерифікації гліцерин зазвичай містить різні концентрації метанолу (залишки процесу метилювання біодизеля),

сульфатні або хлоридні солі, залишки вільних жирних кислот, метилових ефірів жирних кислот і мила, як побічний продукт каталізатор переетерифікації гідроксиду (Armylisas et al., 2024). Першим варіантом подолання цього інгібуючого ефекту є очищення сирого гліцерину, що негативно впливає на ціну субстрату (Boas et al., 2022). Очищення гліцерину досить кошторисний та енерговитратний процес, хоча очищений гліцерин широко використовується в фармакології, косметиці, харчовій та іншій галузях промисловості (Tomatis et al., 2024). Для зниження собівартості мікробного синтезу та підвищення рентабельності технології біобутанолу використовували як субстрат гліцерин сирець – неочищений відход виробництва біодизелю (Karayannis, et al. 2024). Було детально вивчено склад різних фракцій гліцерину-сирцю за допомогою хроматографічного аналізу. Вихідний гліцериновий шар містив досить мало власне гліцерину (табл. 4.7.)

Таблиця 4.7

Склад вихідного гліцеринового шару

Компонент	Вміст, %
Гліцерин	21,9±0,9
Метанол	17,1±0,7
Метилові естери жирних кислот	12,6±0,5

В сумі ідентифіковані компоненти складали більше половини маси гліцеринового шару (51,6 %). Решта 48,4 % можуть являти собою продукти неповного перетворення триглицеридів – моно- та дигліцеридів, лужнометалічні солі жирних кислот (мила), лужний каталізатор переетерефікації, що перейшов до гліцеринового шару, воду чи нежирові компоненти вихідної олії. Якщо вихідна олія містила значну кількість фосфатидів, то до гліцеринового складу могли перейти також продукти їх неповної переестерифікації метанолом – диацильовані фосфатиди (естери фосфорної кислоти з гліцерином та холіном/етаноламіном/інозитолом тощо). Визначено, що гліцериновий шар

метанольної переестерифікації містив значну кількість лужного каталізатору. Невідомо, який саме лужний каталізатор використовувався. Найчастіше використовують гідроксиди натрію чи калію, а також метилати натрію чи калію. В 100 г гліцеринового шару (за даними титрування хлоридною кислотою) містилося 0,072 моль одновалентного лужного металу. Лужний метал може бути у незмінній формі у вигляді вихідного каталізатора, та частково – у вигляді мил, або ж зв'язанний у гліцерат лужного металу. Вказана кількість відповідає 2,81 г К/4,04 г КОН/5,19 г CH_3OK/ 7,07 C_3H_7OK або 1,66 г Na/ 2,88г NaOH/ 4,04 г CH_3ONa/ 5,92 г C_3H_7ONa. Якщо перерахувати лужний каталізатор на мило, його кількість в гліцериновому шарі еквівалента 23,1 % олеату калію чи 21,9 % олеату натрію. Крім того, під час відгонки метанолу відганяється деяка кількість неідентифікованих легких домішок, ймовірно, вуглеводневої природи, що дають велику кількість дрібних піків на хроматограмах одержаної метанольно-водної суміші. Загалом у відгін перейшло 1,2-1,5 % від маси гліцеринового шару неідентифікованих домішок.

Відгонка метанолу з гліцериного шару метанольної переестерифікації ускладнювалась тим, що до його складу входив лужний каталізатор та всі компоненти необхідні для перебігу окремих стадій тристадійного рівноважного процесу переестерифікації тригліцеридів. Крім того, наявність лугу та води в системі забезпечував перебіг омилення як гліцеридів, так і естерів, а нагрів значно прискорював процес. Хімічну рівновагу кожної з окремих стадій процесу переестерифікації тригліцеридів (Гуменюк, 2022) можна представити наведеними реакційними схемами:

Стадія I:

$$\mathrm{TG + MeOH} \xrightarrow{kat} \mathrm{DG + FAME;} \qquad (4.9)$$

Стадія II:

$$\mathrm{DG + MeOH} \xrightarrow{kat} \mathrm{MG + FAME;} \qquad (4.10)$$

Стадія III:

$$MG + MeOH \xrightarrow{kat} G + FAME \quad (4.11)$$

В наведеній схемі TG, DG та G – тригліцерид, дигліцерид та моногліцерид відповідно; G – гліцерин, MeOH – метанол, FAME – метиловий естер жирної кислоти.

Під час зберігання гліцеринового шару рівновага реакцій встановлювалась на певному рівні, якому відповідала стала конценцентрація окремих компонентів. Видалення метанолу з системи сприяло зміщенню рівноваги в напрямку утворення вихідних речовин – метанолу та гліцеридів за рахунок зворотньої переестерифікації метилових естерів з вільним гліцерином. Остані при цьому зв'язувалися у гліцириди, а також виникав додатковий метанол. Оскільки реакція переестерифікації має слабкий екзотермічний ефект за кожною із стадій, нагрівання суміші під час відгонки метанолу також сприяло зсуву хімічної рівноваги у бік утворення гліцеридів та метанолу. На зворотню переестерифікацію 100 г метилолеату витратили 31,1 г гліцерину, а врезультаті утворилося 120,3 г моноолеїну (моногліцериду) та 10,8 метанолу. В цей час, в результаті омилення утворювався додатковий вільний гліцерин (із 100 г моноолеату – 90 г олеату калію та 25,8 гліцерину). Омилювались також і метилові естери – в результаті вивільнувався додатковий метанол (зі 100 г моноолеату – 108,1 г олеату калію та 10,8 г метанолу).

Початково було проведено спробу вилучити метанол з гліцеринового шару шляхом відгонки під атмосферним тиском без нейтралізації каталізатора. Однак, при цьому повному вилученню метилового спирту стало на заваді інтенсивне спінювання суміші, зумовлене одночасною наявністю у ній значної кількості гліцеридів та мил. Процес відгонки було припинено після того, як інтенсивне утворення піни унеможливлювало подальше проведення. У підсумку було відібрано фракцію з температурними межами відгону 70-78 ^{O}C, що перевищує температуру кипіння чистого метанолу (65 ^{O}C). При конденсації «метанольний» відгін проявляв тенденцію до розділення на два окремих шари – прозорий

верхній та мутно-білий нижній. Після відстоювання відгін став рівномірно прозорим та гомогенним. Загальний матеріальний баланс відгонки наведено в таблиці 4.8. Повний детальний матеріальній баланс по окремим компонентам надати не можливо через нестачу інформації про повний кількісний склад сумішей, описані вище можливі складні перетворення, що мають місце під час відгонки та напівкількісний характер визначення вмісту гліцерину. Вміст ідентифікованих компонентів у вихідному гліцериновому шарів було наведено вище.

Таблиця 4.8

Матеріальний баланс відгонки метанолу з гліцеринового шару без нейтралізації

Завантажено, %		Одержано, %	
Вихідний гліцериновий шар	100	Відгін (70-78 ^{O}C)	20,2±0,8
		Кубовий залишок	79,8±3,2

Відгін містив метанолу 63,4 %, неідентифікованої органіки, яка на хроматограмах проявлялася великою кількістю піків неідентифікованих компонентів, можливо, вуглеводної природи 5,9 %, решта 30 %, скоріш за все, вода. Кубовий залишок містив гліцерину 15,9 %, метанолу 3,6 %, метилові естерів жирних кислот 4 %, а решта гліцириди та мила.

У ході відгонки концентрація метанолу в кубовому залишку суттєво знизилась, однак повного вилучення не досягло. Дещо зменшилась і концентрація вільного гліцерину (абсолютна його кількість зменшилася ще відчутніше) та значно суттєвіше – концентрація естерів жирних кислот. Це вказує на перебіг зворотної переестерифікаї естерів з гліцерином. Омилення естерів і гліцеридів теж, певно, мали місце, однак при цьому мав би утворюватися додатковий метанол та гліцерин. Сумарна маса метанолу в кубі та у відгоні виявилася навіть дещо меншою ніж у вихідному гліцериновому шарі –

можливо, величина концентрації метилового спирту у відгоні дещо занижена.

Для уникнення піноутворення при перегонці продуктів переестерифікації, які містять значну кількість гліцеридів та мил, останні слід руйнувати дією сильної кислоти. Тож перед наступною відгонкою віхідний гліцериновий шар було нейтралізовано фосфатною кислотою (у вигляді водного розчину $w(H_3PO_4)$=85 % мас.). Кислоту було взято у кількості, необхідній для зв'язування нативного в гліцериновому шарі лужного металу (чи то внаслідок нейтралізації лугу/алкоголяту, чи руйнування мил) у дигідрофосфат. Дигідрофосфати калію/натрію не розчиняються в продуктах переестерифікації. Консистенція гліцеринового шару після додавання кислоти стала неоднорідною, з'явилась тверда фаза. У ході відгонки спінювання не спостерігалося, метанол вдалося вилучити кількісно. Температурні межі відгону леткої фракції склали 72,5-100,3 ^{O}C. Кубовий залишок після відстоювання було розділено на дві окремі частини – нижній «сольовий» шар, куди перейшла основна маса фосфатів, та верхній «безсольовий» (насправді, незначна кількість солей лишилась і в верхньому шарі). Загальний матеріальний баланс відгонки наведено з нейтралізацією в табл. 4.9.

Відгін містив 52,8 % метанолу, неідентифікованої органіки (на хроматограмах велика кількість піків неідентифікованих компонентів, можливо, вуглеводневої природи 4,6 %, решта 40 %, скоріш за все вода. Верхній «безсольовий» шар кубового залишку містив метилові естери жирний кислот – 28,7 %, гліцерин в слідових кількостях (не більше 0,2 %), метанол відсутній (не більше сотих часток %). На хроматограмах прослідковувались додаткові піки неідентифікованих компонентів, концентрація яких, однак, не перевищує 2-3 %. Решта – гліцериди, естери фосфатної кислоти, менша частина кислих фосфатів калію/натрію. Нижній «сольовий» шар кубового залишку містив гліцерин 44,7 %, метилові естери жирних кислот 1,9 %, метанол відсутний (не більше сотових часток %). Решти гліцериди, естери фосфатної кислоти, основна маса кислих солей калію/натрію.

Таблиця 4.9

Матеріальний баланс відгонки метанолу з гліцеринового шару з нейтралізацією

Завантажено, %		Одержано, %	
Вихідний гліцериновий шар	92,1	Відгін (72,5-78 ºС)	29,0±1,16
Фосфатна кислота (85 %)	7,9	Кубовий залишок - Верхній шар - Нижній шар	70,8±2,8 41,8±1,7 28,3±101

У ході відгонки метанол було вилучено повністю. Сумарна маса метанолу в кубі та у відгоні виявилася близькою до маси у вихідному гліцериновому шарі (незначно нижчою, – можливо, величина концентрації метилового спирту у відгоні дещо занижена). Маса гліцерину після відгонки помітно зменшилася – ймовірно, за рахунок зворотної переестерифікації за кислотним механізмом за участі кислих фосфатів.

Увесь вільний гліцерин перейшов до нижнього «сольового» шару, а метилові естери залишилися у верхньому «безсольовому» шарі. Слід вважати, що основна маса зв’язаного гліцерину (у вигляді моно- ди чи навіть тригліцеридів) зосереджена в верхньому «безсольовому» шарі. У результаті дослідження показано, що гліцериновий шар містив досить незначну кількість гліцирину до 20 % та близько 17 % метанолу. Відгонка без нейтралізації гліцеринового шару фосфорною кислотою дозволила вилучити метанол повністю. Однак при цьому утворилися кислі фосфати калію чи натрію. Виходячи з отриманих результатів було проведено дослідження накопичення бутанолу штамом *C. acetobutylicum* UCM B-7407 проводили за різних концентрацій гліцерину сирцю (рис. 4.27).

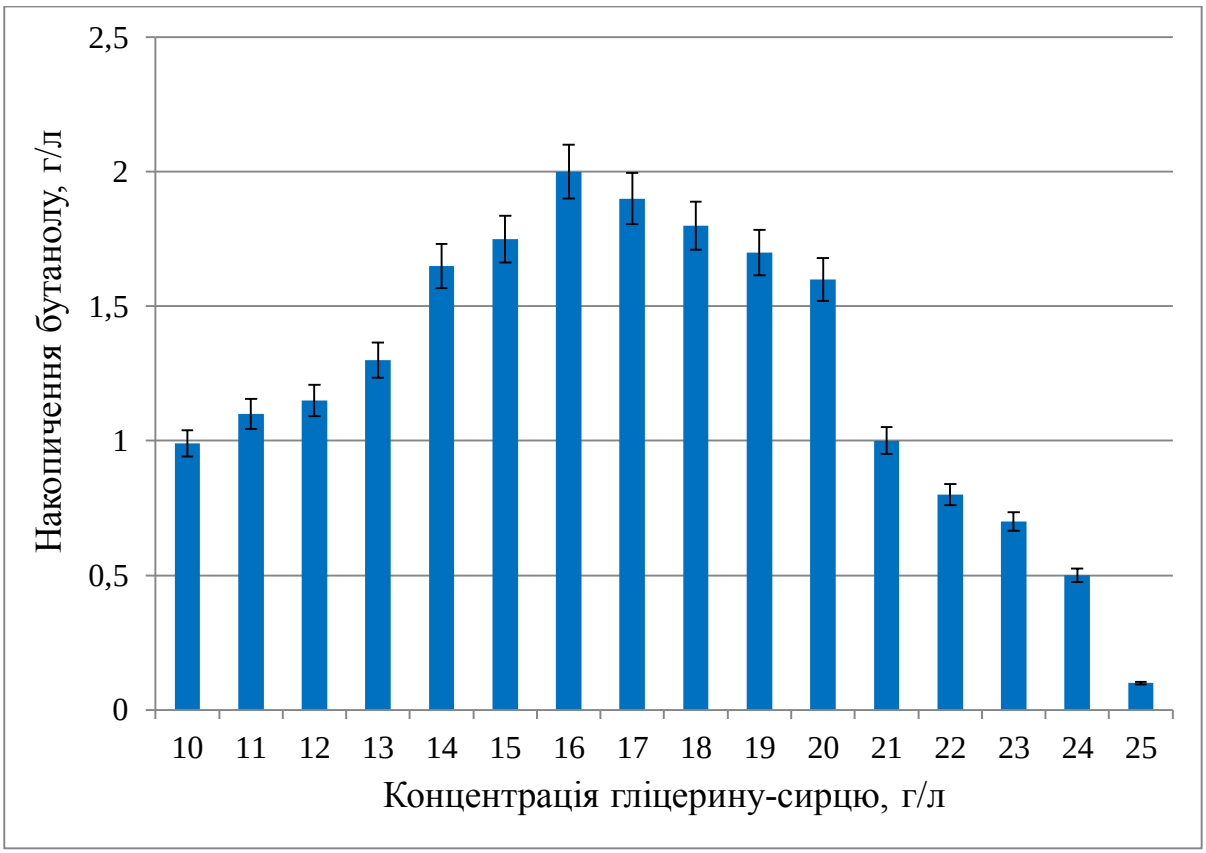


Рис 4.27 Накопичення бутанолу за різної концентрації гліцерину-сирцю

З результатів, наведених на рис. 4.27, видно, що 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. Результати показано на рис. 4.28. У процесі культивування накопичення бутанолу штамом *C. acetobutylicum* UCM B-7407 у культуральній рідині не змінювалось протягом першого періоду вилучення-доливання середовища, а починаючи з другого по четвертий період накопичення бутанолу зменшилось в два рази. За подальшого використання від'ємно - доливного методу накопичення бутанолу знижувалось у 8 разів та остаточно припинялось у шостому періоді.

Першим варіантом подолання цього інгібуючого ефекту є очищення сирого гліцерину, що негативно впливає на ціну субстрату. Більш цікавим вибором є мутація або адаптація штамів дикого типу до сирого гліцерину, про цей підхід повідомлялося для *Clostridium pasteurianum*. З іншого боку, штам адаптований лише до одного конкретного типу сирого гліцерину, а інші партії субстрату також можуть бути токсичними для адаптованих штамів. Тому інші, більш загальні варіанти, такі як іммобілізація мікроорганізмів та їх захист гелевими матрицями, можуть подолати токсичну дію неочищеного гліцерину.

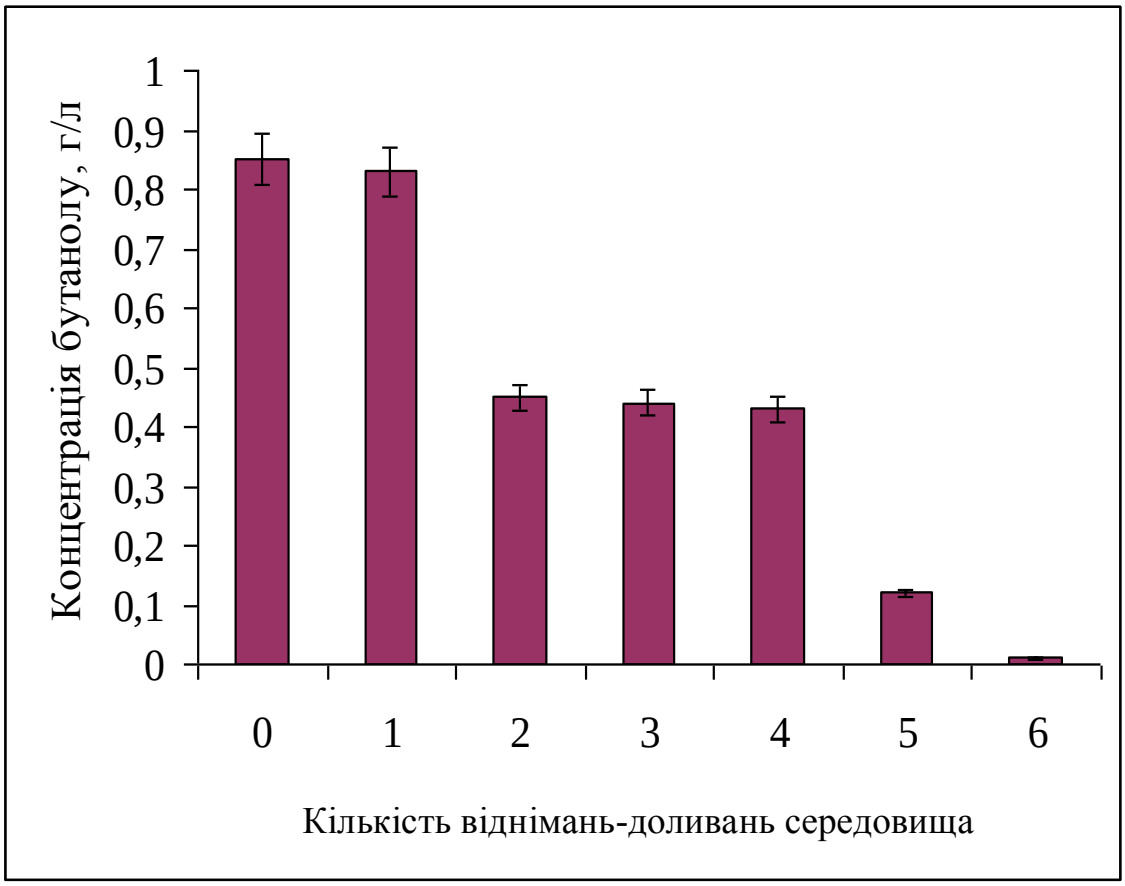


Рис. 4.28 Накопичення бутанолу штамом *C. acetobutylicum* UCM B-7407 за культивування від'ємно-доливним методом

Було використано різні концентрації гліцерину-сирцю (неочищеного відходу виробництва) для вивчення накопичення бутанолу. Було показано, що за використання низьких концентрацій гліцерину-сирцю можлива його конверсія до бутанолу. При збільшені концентрації гліцерину-сирцю відбувалося

інгібування росту та розвитку культури, що можливо пов’язано з вмістом метилових ефірів у середовищі.

4.3 Види попередньої підготовки лігноцелюлозної сировини

Лігноцелюлозна біомаса становить скелет усіх живих рослин на Землі від їх коренів, листків і стебел до плодів і квітів (Borrero-Lopez et al., 2022). Зазвичай деревину поділяють на дві основні групи: тверду та хвойну деревину (Bozzolan et al., 2024). Обидва вони, в основному, складаються з об’єднаної комбінації трьох природних полімерів, тобто целюлози, геміцелюлози та лігніну, і в даний час широко націлені, оскільки вони містять перспективні відновлювані матеріали для продуктивності біопродуктів і біопалива (Li et al., 2024). Діапазон їх вмісту коливається між 40 і 50 % целюлози, 15-30 % лігніну і 25-30 % геміцелюлози; незважаючи на це, ці концентрації суттєво залежать від типу обраної біомаси, частини та віку рослини, умов зростання та частини целюлозної стінки (Abolore et al., 2024). Щоб полегшити належне розділення різних лігноцелюлозних біополімерів, доступний широкий спектр попередніх обробок (Pasad et al., 2024), крім того, в залежності від конкретних цілей або властивостей стає необхідним застосування попередньої обробки іншого характеру. Ці попередні обробки були класифіковані на чотири категорії: фізичні, термічні, хімічні та біологічні попередні обробки (Chen et al., 2024).

4.3.1 Використання вибухового автогідролізу для попередньої обробки 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 (Karimi et al., 2014). Надалі компоненти лігноцелюлозної біомаси можуть слугувати як субстрат для мікробіологічної конверсії та отримання біопалива (Kumar et al.,

2009). Досліджено вплив вибухового автогідролізу на лігноцелюлозну сировину скоп та біомасу дротовидного проса з подальшим використанням її як субстрату для отримання бутанолу. Для підвищення накопичення бутанолу штамами *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *Clostridium* sp. UCM B-7570 було проведено попереднє оброблення біомаси дротовидного проса вибуховим автогідролізом. Компонентний склад біомаси дротовидного проса до та після автогідроліза представлено в таблиці 4.10.

Таблиця 4.10

Склад біомаси дротовидного проса в процесі автогідроліза

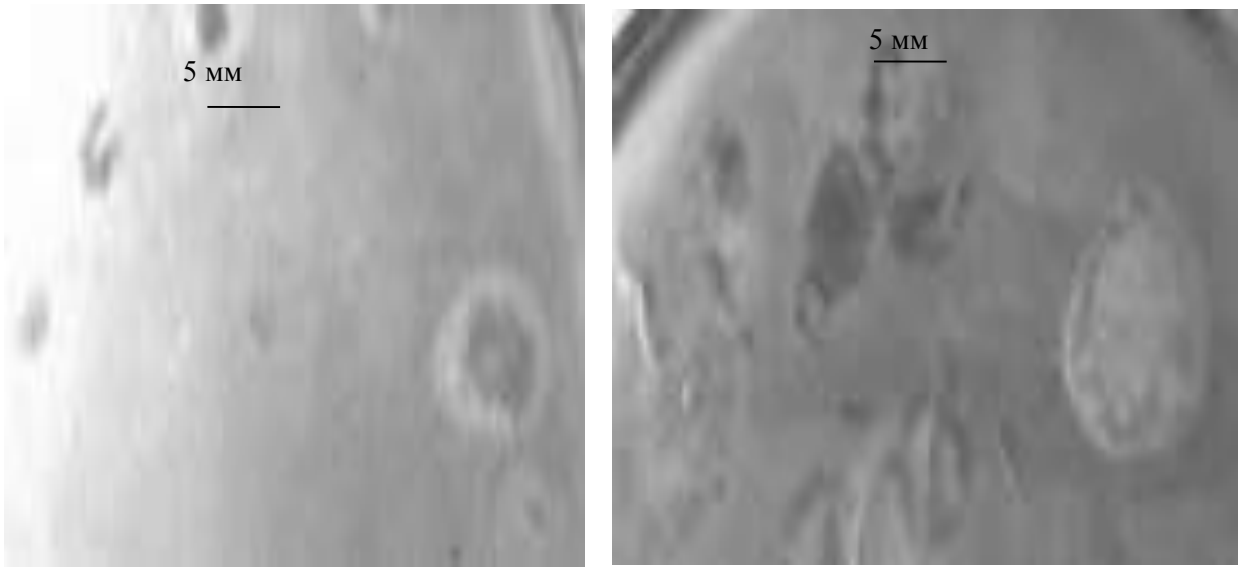
Компоненти	Вихідна біомаса, %	Біомаса після автогідроліза, %
Целюлоза	46,7±1,9	53,9±2,2*
Геміцелюлоза	23,0±1,0	10,6±1,0*
Розчинні речовини	7,7±0,5	11,5±0,5*
Лігнін	13,8±0,6	14,7±0,6
Смоли і жири	2,0±0,1	2,0±0,1
Зола	5,4±0,5	5,4±0,5
Інше	1,4±0,2	1,9±0,2
Всього	100,0	100,0

* – $P<0,05$

Як видно з даних таблиці 4.10, після вибухового автогідролізу спостерігалась зміна вмісту основних компонентів, що згідно з літературними даними зумовлено структурними перебудовами компонентів біомаси (Li & Cheng, 2024). Зростання кількості водорозчинних речовин в першу чергу пов’язували з деструкцією геміцелюлоз (Ma et al., 2022). Незначне зростання кількості лігніну згідно з (Tigunova et al., 2016) пов’язували зі зменшенням pH реакційного середовища.

У той же час, в процесі фракціонування після автогідролізу (делігніфікації

целюлози) відбувалась хімічна дія на лігнін, що призводила до його деполімеризації і кількість кислото нерозчинного лігніну зменшувалась.Тому для збродження субстрату після автогідролізу необхідно застосовувати активні продуценти целюлаз. Такими мікроорганізмами – продуцентами можуть слугувати бактерії роду *Clostridium* (Zamani et al., 2023). Для підтвердження властивостей штамів-продуцентів роду *Clostridium* до ферментації целюлози штами *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *Clostridium* sp. UCM B-7570 висаджували на фільтрувальний папір (рис 4.29.).



1 2

Рис. 4.29 Руйнування поверхні фільтрувального паперу культурами (1) *Clostridium* sp. UCM B-7407, (2) *C. acetobutylicum* UCM B-7570 за культивування

Через 72 години культивування на фільтрувальному папері з’явилися зони прояснення, а через 120 годин спостерігалося руйнування паперу навколо колоній. Результати дослідження продемонстрували наявність у обох культур целюлаз та можливість штамів використовувати целюлозу як джерело вуглецю. Одним із підходів до використання лігноцелюлози як субстрату, є культивування мікроорганізмів на окремих компонентах дротовидного проса після вибухового автолізу (рис. 4.30).

У результаті проведених досліджень показано, що в рослинній біомасі

після автогідроліза накопичувався фурфурол, який інгібував розвиток бактерій. Для уникнення інгібуючого впливу фурфурол видаляли, а біомасу розділяли на компоненти. Як видно з результатів дослідження (рис. 4.30), штами-продуценти в процесі культивування з використанням отриманих компонентів біомаси продукували бутанол з різним рівнем накопичення.

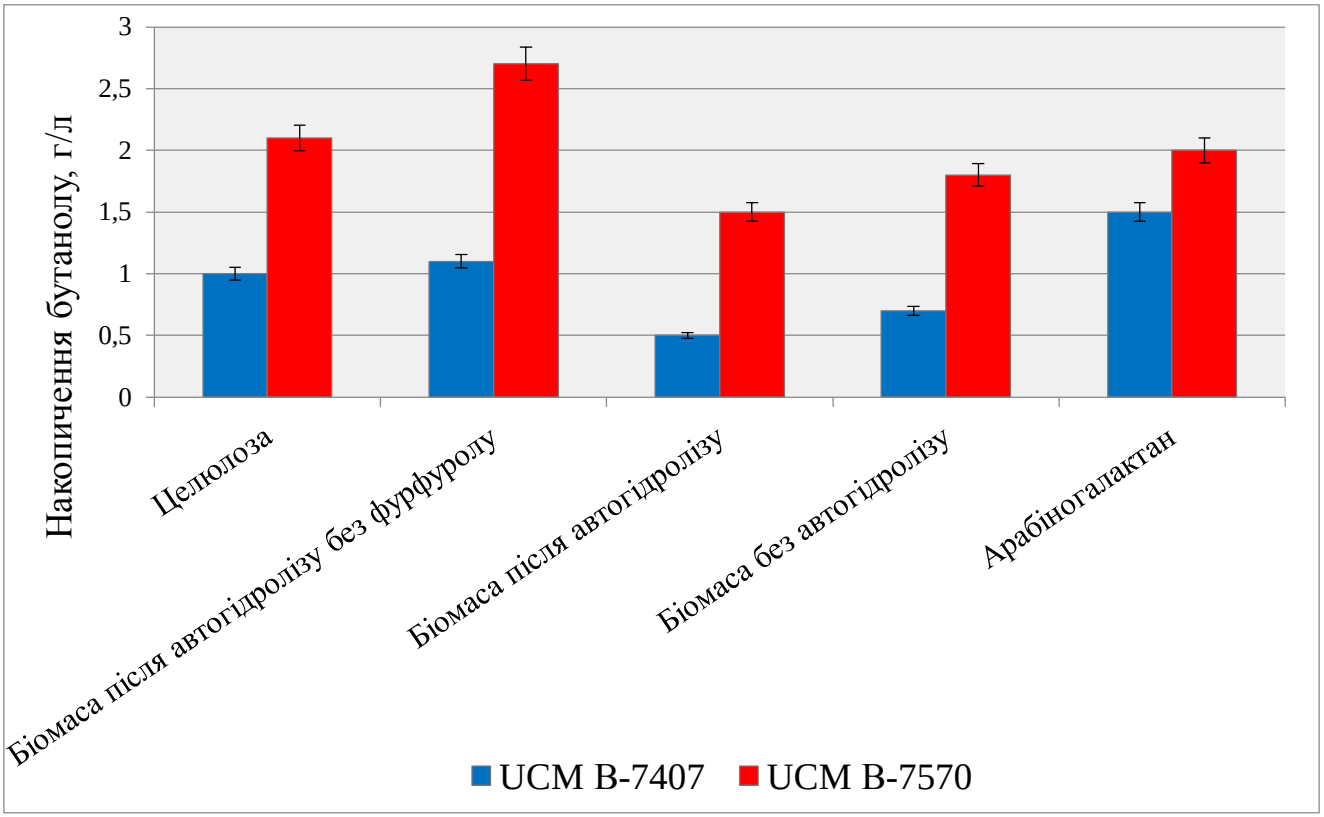


Рис. 4.30 Накопичення бутанолу штами-продуцентами на різних компонентах біомаси проса після оброблення субстрату вибуховим автогідролізом

Найбільша концентрація бутанолу (2,8 г/л) отримана за використання штаму IFBG C6H 5M на біомасі дротовидного проса після автогідролізу та «відгонки» фурфуролу. З отриманих результатів видно, що штами *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *Clostridium* sp. UCM B-7570 конвертували целюлозу в бутанол, а вибуховий автогідроліз може слугувати одним із способів підготовки лігноцелюлозної сировини.

Потенційним джерелом целюлози є також і скоп – відходи целюлозно-

паперової промисловості (Farmanbordar et al., 2024; Jahangeer, et al., 2024). Для встановлення впливу автогідролізу на скоп було вивчено його компонентний склад до та після оброблення (табл. 4.11). Отримані дані свідчать, що скоп майже на половину складається з неорганічних компонентів, які не можуть слугувати поживним середовищем для мікроорганізмів.

Таблиця 4.11

Склад скопу в процесі автогідролізу

Компоненти	Вихідний склад, %	Склад після автогідролізу, %
Целюлоза	34,0±1,36	37,0±1,48
Геміцелюлоза	3,7±1,0	1,5±0,1
Розчинні речовини	3,2±0,5	6,9±0,5
Лігнін	8,5±0,2	3,5±0,2
Смоли і жири	2,3±0,1	2,3±0,1
Зола	47,8±1,9	48,0±2,0
Інше	0,5±0,1	0,8±0,1
Всього	100,0	100,0

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 целюлозомісної сировини.

Було проведено культивування штамів *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *Clostridium* sp. UCM B-7570 на середовищі з різною підготовкою субстрата – скопу (рис. 4.31.). 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 метод попередньої підготовки сировини був автогідроліз.

При використанні 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. Отримані результати показали можливість використання лігноцелюлозної сировини як субстрату для біопалива.

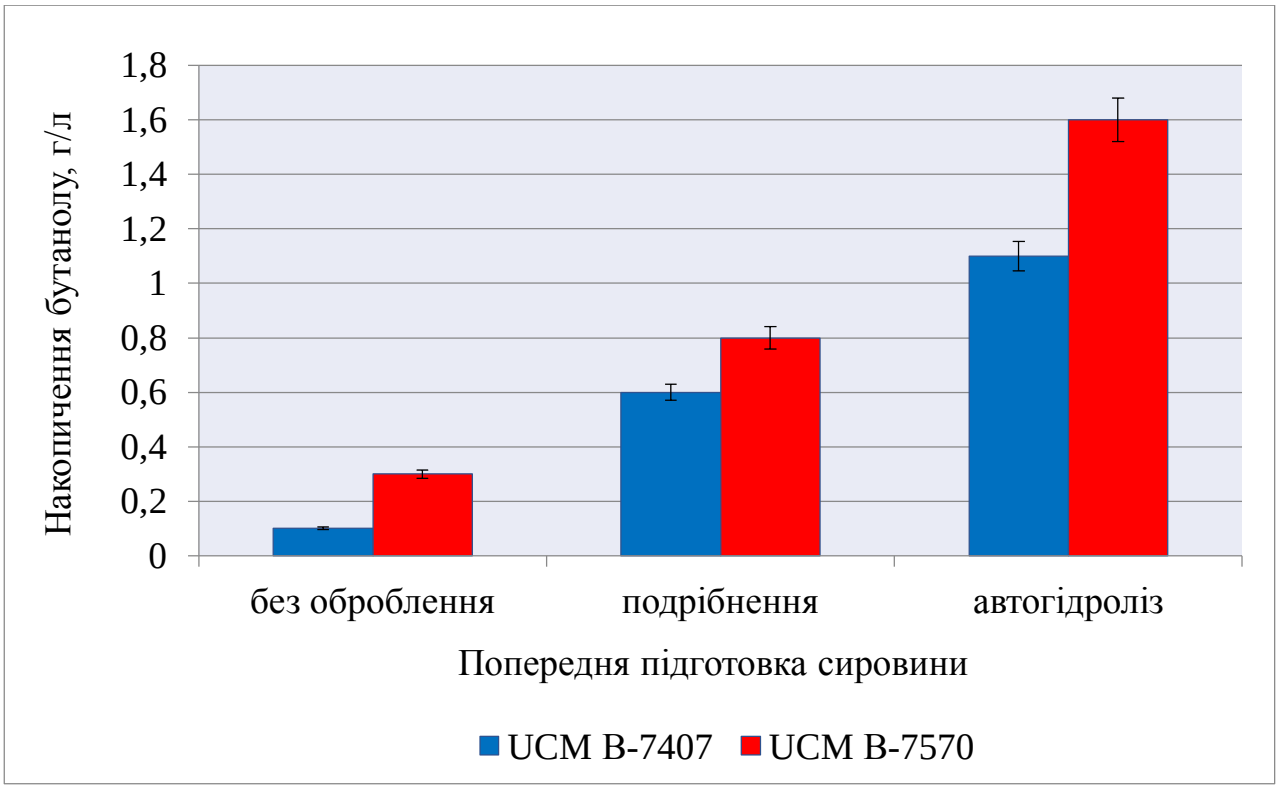


Рис. 4.31 Накопичення бутанолу культурами *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *Clostridium* sp. UCM B-7570 на середовищі за різної підготовки скопу

Ключовим методом для обробки сировини є вибуховий автогідроліз, за використання якого показано зростання кількості цільового продукту в два рази. Встановлено, що в умовах автогідролізу частковому руйнуванню піддається лише геміцелюлоза з утворенням значної кількості водорозчинних речовин –

цукрів, тоді як целюлоза і лігнін, як окремі складові, після розділення можна співставити за кількістю із вмістом їх у вихідній сировині. Виявлено пряму залежність кількості геміцелюлози у вихідній біомасі на утворення фурфуролу у продуктах вибухового автогідролізу, оскільки в результаті впливу гідролізуючого агенту при підвищених температурах цукри можуть гідролізуватися з утворенням фурфуролу та оксиметилфурфуролу. Попереднє вилучення останніх з продуктів вибухового автогідролізу дротовидного проса дозволяє досягнути максимальної ефективності для ферментативного одержання біобутанолу.

4.3.2 Використання ультразвукової дезінтеграції для оброблення сировини

Ультразвукова дезінтеграція (УЗД) стінок клітин відбувається за відносно низької температури порівняно з мікрохвильовою обробкою та автоклавуванням. Вона не потребує попереднього використання хімічних деструкторів, що зменшує вартість процесу підготовки. УЗД зазвичай використовують для лізису клітин і гомогенізації, однак, вона може бути також ефективним методом руйнування жорстких клітинних оболонок (Шульга та ін., 2013). 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 через 72 години ферментації (рис. 4.32).

Культивування штаму на попередньо обробленій (УЗД) біомасі підвищувало накопичення бутанолу у культуральній рідині. Після ферментації штаму-продуценту *Clostridium* sp. UCM B-7570 в культуральній рідині було виявлено всі три продукти ацетон-бутанол-етанольного процесу.

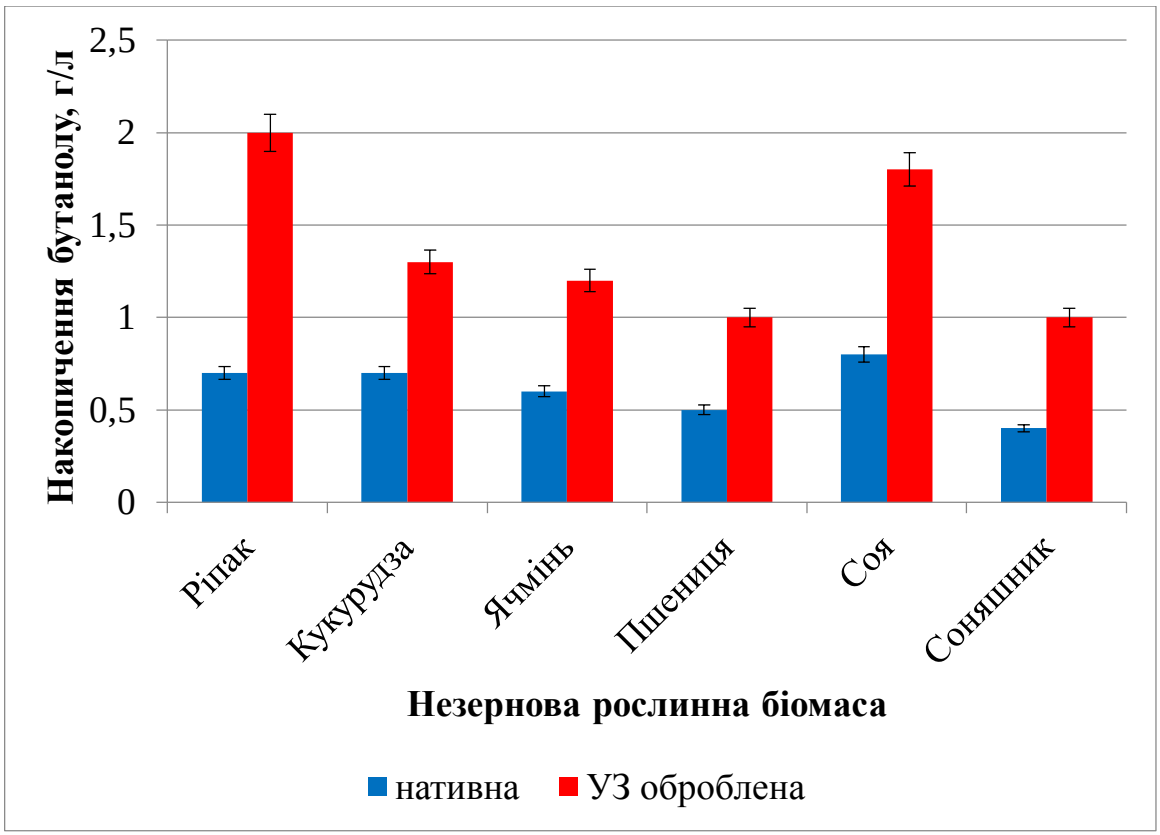


Рис. 4.32 Накопичення бутанолу штамом *Clostridium* sp. UCM B-7570

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. В 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 (табл. 4.12).

Параметри УЗД опосередковано впливали на накопичення цільового продукту. 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%, μ = 0,72 Вт/мл, що відповідає верхній межі варіювання цих параметрів. Найменший питомий вихід бутанолу (1,162 г/л та 11,62 г/кг) спостерігався у випадку s = 10% і μ = 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.

Таблиця 4.12

Вплив параметрів УЗД на накопичення бутанолу

Час обробляння, 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±1,0	42,6±1,7
-	100	-	50,0±2,0	73,0±2,9	96,1±3,8

У результаті досліджень було встановлено, що фактор «час ультразвукового обробляння 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. Отримано залежності питомого виходу біобутанолу від параметрів s і μ у вигляді ступеневих функцій для питомого виходу на одиницю об'єму суспензії Bv, г/л (4.12):

$$Bv = 7{,}84563 \cdot s^{-0{,}721369}\ \mu^{0{,}142132} \qquad (4.12)$$

де s– вміст сухої речовини суспензії, %

μ – питома потужність ультразвуку, Вт/мл

та для питомого виходу на одиницю маси сухої речовини Bm, г/кг (4.13)

$$Bm = 784{,}563\ s^{-1{,}72137}\ \mu^{0{,}142132} \qquad (4.13)$$

Для залежності (4.12), яка є адекватною на 95 % рівня довірчої вірогідності, коефіцієнт множинної детермінації D = 0,882368, коефіцієнт множинної кореляції R = 0,939344. Критерій Фішера F = 18,7527; ймовірність F критерію P = 0,996669. Всі коефіцієнти моделі є значущими на рівні довірчої вірогідності не менше 94 %. Для залежності (4.13), яка також є адекватною на 95 % рівні довірчої вірогідності, коефіцієнт множинної детермінації D = 0,974346, коефіцієнт множинної кореляції R = 0,98709. Критерій Фішера F = 94,9496; ймовірність F критерію P = 0,999808. Всі коефіцієнти моделі є значущими на рівні довірчої вірогідності не менше 94 %. Графічний вид залежності (4.12) і (4.13) наведено на рис. 4.33 і рис. 4.34, відповідно.

Як видно збільшення вмісту сухої речовини в суспензії призводить до зниження накопичення біобутанолу, що можна пояснити зростанням акустичного опору оброблюваної суспензії та відповідним зменшенням ефективної дії ультразвуку. Вплив питомої потужності ультразвуку на накопичення біобутанолу в межах досліду є меншим за інтенсивністю, але призводить до збільшення виходу бутанолу, ефективність дії цього фактору зростає у випадку зменшення вмісту сухої речовини в суспензії.

Суттєве зростання виходу біобутанолу порівняно з необробленими

дослідами (табл. 4.12) є результатом механічного руйнування лігноцелюлозної структури рослинної біомаси за рахунок кавітаційної дії ультразвуку, що підтверджується численними дослідами на різних видах сировини (Prado et al., 2024; Mohan et al., 2024).

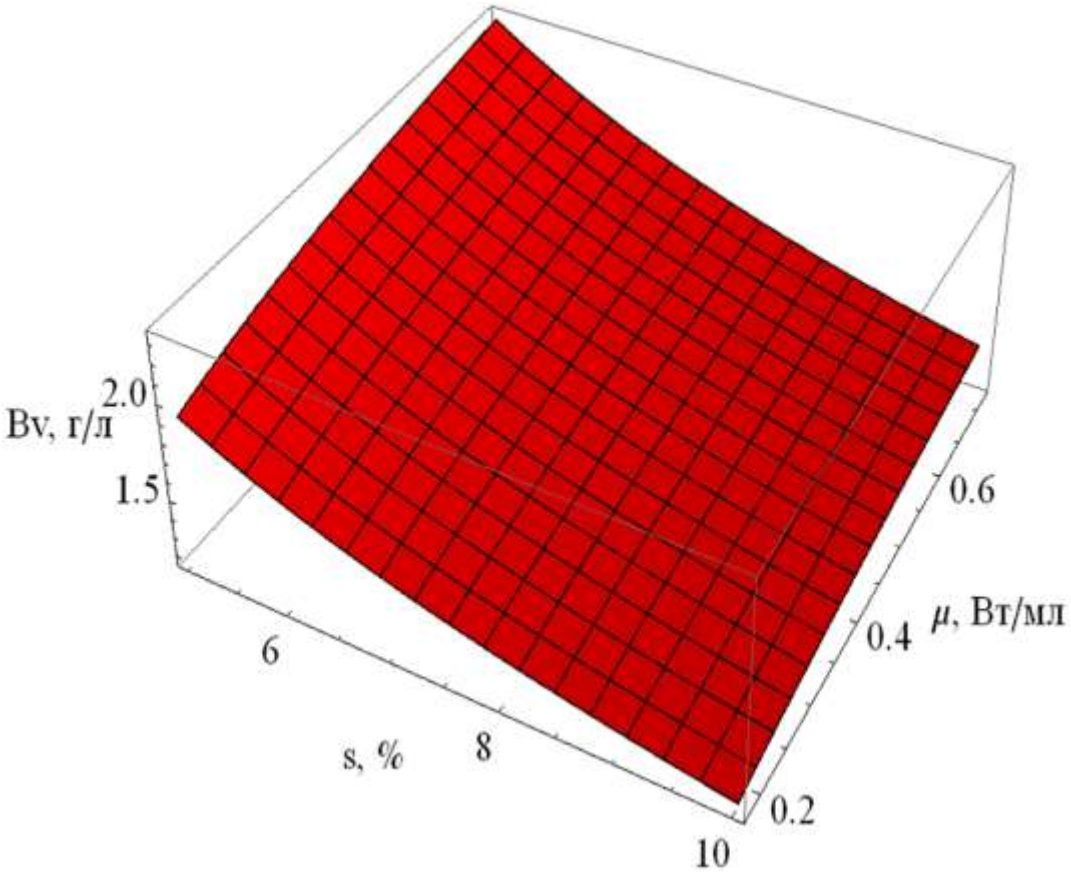


Рис. 4.33 Залежність питомого виходу біобутанолу (Bv) з одиниці об'єму суспензії від вмісту сухої речовини суспензії (s) та питомої потужності ультразвуку (μ)

Виходячи з того, що збільшення вмісту доступних вуглеводнів в оброблюваних суспензіях залежить від ступеня руйнування лігніну, який бере незначну участь в мікробній діяльності, постає питання про раціональний ступніть руйнування лігніну в технологіях рідких біопалив, які передбачають мікробну ферментацію біосировини. Так, досліди свідчать про можливість руйнування від 50 до 75 % лігніну біомаси за ультразвукового обробляння, відповідно, пшеничної соломи та стебел цукрової тростини (Bratishko et al., 2023)

ультразвуком частотою 20 та 24 кГц протягом 35 та 47 хвилин в середовищах гідроксиду калію та гідроксиду натрію, відповідно. Однак, така тривалість ультразвукового обробляння, вочевидь, знаходиться за межами економічної доцільності і його застосування в технологіях біопалив.

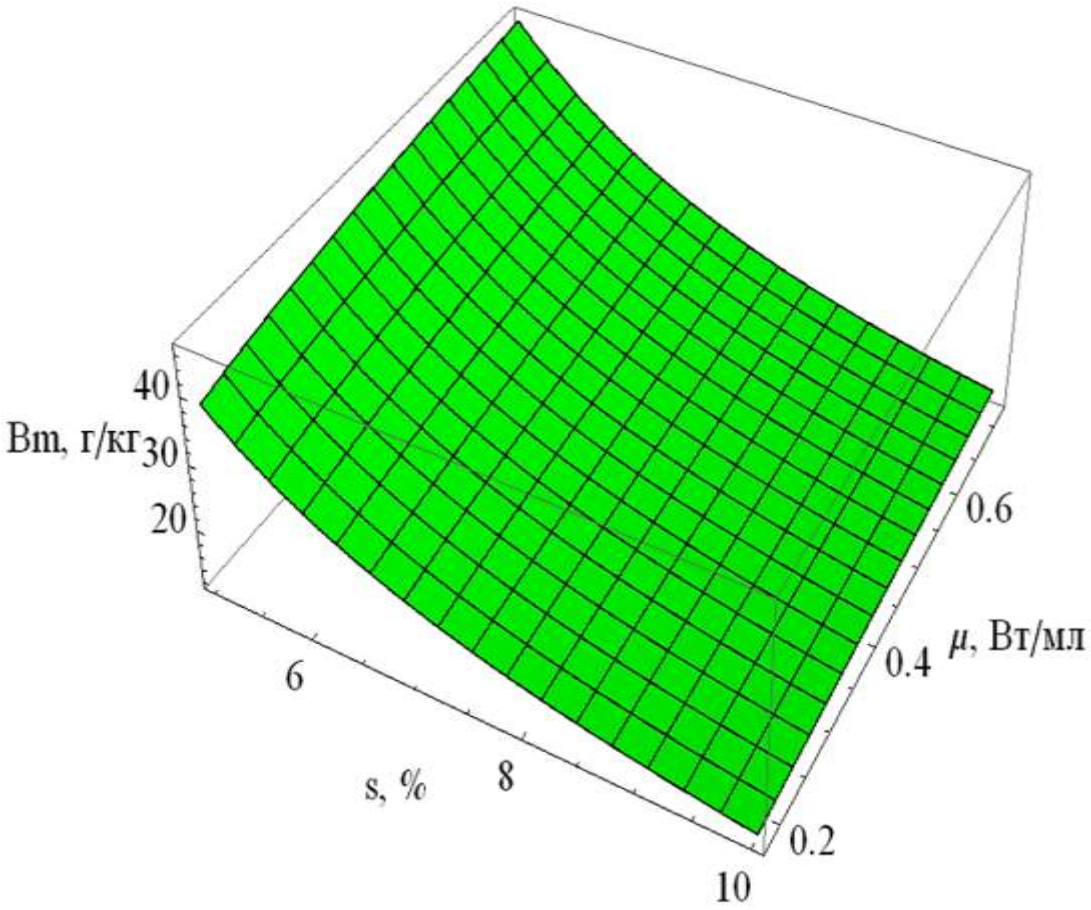


Рис. 4.34 Залежність питомого виходу біобутанолу (Bm) з одиниці маси сухої речовини від вмісту сухої речовини суспензії (s) та питомої потужності ультразвуку (μ)

Попередня обробка за допомогою ультразвукової дезінтеграції (УЗД) включає застосування високочастотних механічних акустичних хвиль, які створюють високу силу зсуву для ефективної дефібриляції та деградації лігноцелюлозної біомаси, що базується на основному принципі «ефекту кавітації», який сприяює розриву зв’язків лігніну α-O-4 і β-O-4 та призводить до фракціонування лігно-полісахаридного комплексу біомаси, що також пропонує

високі рівні енергії активації та адекватний масообмін для ефективної деконструкції (Sharma et al. 2023). Проведено дослідження впливу різних параметрів УЗД на попередньо досліджений вид сировини – солому ріпаку *Brassica napus* протягом 36 год культивування. Отримані результати представлені на рис. 4.35.

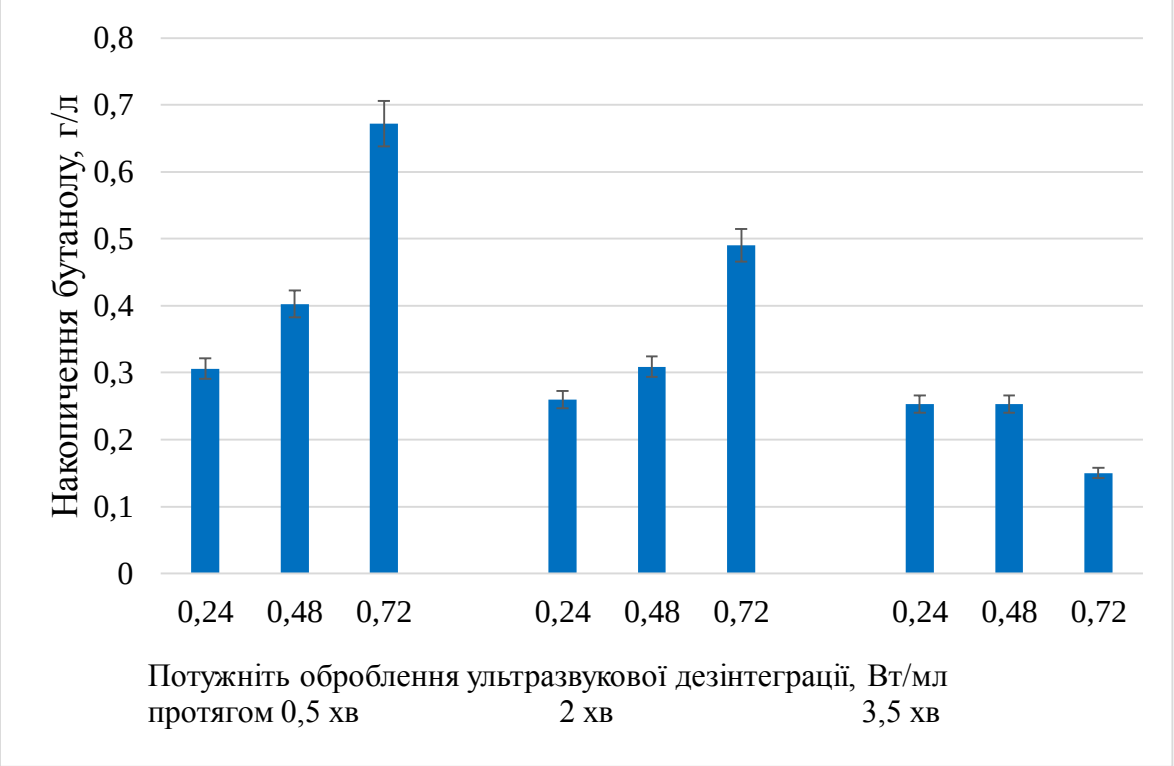


Рис. 4.35 Накопичення бутанолу в залежності від параметрів ультразвукової дезінтеграції біомаси ріпаку

Встановлено параметри попередньої підготовки рослинної сировини за допомогою УЗД, зокрема, найбільша концентрація бутанолу (0,672 г/л) накопичувалась у культуральній рідини за потужності 0,72 Вт/л та 0,5 хв оброблення. Показано, що найменший час оброблення (0,5 хв) за будь-якої потужності приводив до найбільшого накопичення цільового продукту у культуральній рідині. Отримані результати можуть свідчити за ефективність обробляння протягом невеликого проміжку часу, коли порушується кристалічність целюлози та руйнуються міцні лігноцелюлозні зв’язки, вивільнюючи цукри.

Оптимальні параметри УЗД використовували для подальших досліджень. Отримані нами експериментальні дані співвідносяться з результатами досліджень (Karki et al., 2011), які показали можливість збільшення вмісту доступних вуглеводнів (збільшення загального виходу цукрів до 50 %) після дезінтеграції суспензії на основі знежирених пластівців сої ультразвуком частотою 20 кГц, питомою потужністю 0,3-2,56 Вт/мл протягом 15-120 с. При цьому, наприклад, ультразвукове обробляння екструдованих соєвих пластівців частотою 20 кГц тривалістю 30-60 с (Karki et al., 2011) не спричинило суттєвого впливу на зміну вмісту доступних цукрів. як і ультразвукове обробляння рисових оболонок протягом 10-60 хвилин за частоти 40 кГц (Yu et al., 2009). Отже, можна припустити, що ефективна тривалість дії ультразвуку за обробляння лігноцелюлозної сировини знаходиться в межах 1- 5 хвилин, що буде враховано в плануванні подальших експериментальних досліджень процесів обробляння відібраних сільськогосподарських культур.

Аналіз рослиних тканин дає можливість врахувати і визначити з достатньою точністю речовини, які входять до складу рослин (Karakas et al., 2023). На першому етапі було вивчено можливість збродживати різні альтернативні субстрати штамом *Clostridium* sp. UCM 7570 продовж 36 годин, що є показовим для статистичного дизайну (табл. 4.13).

Було показано можливість ферментації різних субстратів штамом *Clostridium* sp. UCM 7570. Слід відмітити, що підготовка субстрату грала ключову роль в культивуванні. Гідроліз і біотрансформація лігноцелюлози, тобто біопереробка, може забезпечити людей біопаливом, біохімічними речовинами та матеріалами, а також є важливою технологією для вирішення кризи викопної енергії та сприяння глобальному сталому розвитку. Було показано, що обробляння деяких видів сировини (тополя, дуб) призводило до зниження накопичення бутанолу, що можна пояснити вивільненням інгібіторів росту бактерій під час кавітування або УЗД. Для використання заданих видів потрібно усунення дубильних речовин або висадження генетично змінених дерев з м’якою пульпою. За попередньої підготовки обрізів берези, липи, каштану,

клену та різнотрав'я виявилось перспективним до використання УЗД. Можливо, це пов'язано з руйнуванням лігноцелюлозніх зв'язків та кристалічності целюлози. Для більш цукровмісної сировини такої як газон безперечно кавітування виявилось оптимальним. Цей метод дозволив м'яко обробити субстрат з максимальним збереженням, що відобразилось у найбільшому накопиченні бутанолу.

Таблиця 4.13

Накопичення бутанолу за 36 год культивування

№	Сировина	Накопичення бутанолу, мг/л		
		Нативна	УЗД	Кавітація
1.	Тополя кронування	100,0±4,0	56,2±2,2	50,6±2,0
2.	Дуб кронування	91,5±3,8	60,7±2,4	32,3±1,3
3.	Береза кронування	44,3±1,8	66,4±2,7	61,9±2,5
4.	Липа кронування	47,9±1,9	108,7±4,4	67,1±2,7
5.	Каштан кронування	56,9±2,3	60,8±2,4	50,2±2,0
6.	Клен кронування	51,8±2,0	67,5±2,7	54,7±2,2
7.	Газон	83,5±3,3	81,3±3,4	103,6±4,1
8.	Різнотрав'я	100,8±4,0	160,2±6,4	119,2±4,8

Одним з ефективних методів інтенсифікації хіміко-технологічних процесів в рідинах є дія кавітації (гідродинамічної чи ультразвукової) на оброблюване середовище. Кавітація є засобом локальної концентрації енергії низької густини у високу густину енергії, пов'язану з пульсаціями і закриттям бульбашок кавітацій. Тому її широко застосовують для інтенсифікації хіміко-технологічних процесів. Було досліджено накопичення продуктів АБЕ ферментації після ферментації штамом *Clostridium* sp. UCM 7570 продовж 36 годин, що є показовим для статистичного дизайну, як нативної так і УЗД підробленої сировини (табл. 4.14).

Отримані дані свідчать, що ферментація пішла за етанольним шляхом,

натомість бутанольного. Така зміна потоків може відповідати високому рівню карбону в ензиматичному середовищі і низькому нітрогену.

Таблиця 4.14

Накопичення продуктів АБЕ ферментації у культуральній рідині

Сировина	Термін впливу, хв	Накопичення продуктів АБЕ ферментації, мг/л			
		Нативна		УЗД	
		Етанол	Бутанол	Етанол	Бутанол
Міскантус	1	156,8±6,3	124,4±5,0	647,6±25,9	205,8±8,2
	3			562,0±22,5	215,3±8,6
	5			279,6±11,2	64,5±2,6
Листя липи	1	232,2±9,3	11,1±0,4	457,2±18,3	1,3±0,1
	3			446,2±17,8	28,8±1,2
	5			268,9±8,1	3,0±0,1
Листя тополі	5	71,6±2,9	42,0±1,7	283,4±11,3	71,0±2,8
Листя берези	5	346,4±13,9	9,7±0,4	473,7±19,0	48,0±1,9
Листя клену	5	180,1±7,2	11,4±0,5	340,0±13,6	154,7±6,2

Показано, що найвище накопичення продуктів АБЕ ферментації було за використання міскантусу гігантського за однієї хвилини оброблення. Продукція продуктів АБЕ ферментації збільшилась майже в 8 разів порівняно з нативнивною незерновою біомасою, як субстрату. Загалом, не довготривале використання УЗД виявилось найбільш ефективним, можливо за рахунок розриву лігноцелюлозних зв’язків, але збереження цукрів. Слід відмітити, що як субстрат доволі перспективна є листя липи, як у нативному так і обробленому вигляді. УЗД оброблення листя клену підвищило накопичення етанолу майже в три рази та бутанолу в десять. Однак основний продукт, все ж таки синтезувався у незначній кількості.

4.3.3 Комбіновані види гідролізу

Складність процесу, метаболітичного шляху утворення бутанолу та деградації лігноцелюлози може, суттєво обтяжувати ферментацію лігноцелюлозної сировини, що призводить до низького рівня виробництва бутанолу за використання монокультур (Guo et al., 2022). У природі лігноцелюлозна біомаса цілком розкладається та засвоюється мікробними консорціумами, які поєднують гриби та бактерії (de Gonzalo et al., 2016). У зв'язку з цим було імітовано природні мікробні угруповання для створення синтетичного «Y-подібного» консорціуму, який складався з двох штамів з однаковими шляхами біосинтезу бутанолу та ортогональною здатністю до метаболізму глюкози і ксилози. Утворений консорціум міг не тільки пристосовуватися до змін навколишнього середовища, й одночасно використовувати цукри С5/С6 у різних співвідношеннях з найбільш ефективним виробництвом бутанолу із суміші цукрів та мав однакове ефективне ортогональне споживання С5 і С6 цукрів. Подібним чином целюлозний бутанол можна виробляти за допомогою співкультивування Одним із методів попередньої обробки сировини є використання ферментів. Було досліджено вплив вищих грибів на лігноцелюлозну сировину з подальшим культивуванням штаму-продуценту бутанолу *C. acetobutylicum* UCM B-7407 (табл. 4.15).

Отримані дані свідчать, що використання вищих грибів для попередньої підготовки сировини не є перспективним. Це дуже тривалий процес (гриби культивуються протягом двох тижнів), а підвищення у накопичені бутанолу за використання штаму *C. acetobutylicum* UCM B-7407 не значне. Через непіддатливість лігноцелюлозної біомаси попередня обробка є вирішальним кроком, який руйнує складну структуру лігноцелюлозних матеріалів і збільшує площу поверхні і пористість, тим самим посилюючи оцукрювання з вивільненням цукрів, що зброджуються (Jafarov et al. 2023).

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. 4.16).

Таблиця 4.15

Накопичення бутанолу штамом *C. acetobutylicum* UCM B-7407 на заторі з дротовидного проса після вирощування вищих грибів

Зразок	Бутанол, мг/л
P. djamor стерильне	40±1,6
P. djamor	460±18,4
P. ostereatus стерильне	50±2,0
P. ostereatus	430±17,2
H. myxotricha стерильне	500±20,0
H. myxotricha	520±20,8
A.aurea стерильне	620±24,8
A.aurea	500±20,2
L. lusciana	530±21,2
L. lusciana стерильне	500±20,1
S.canmune	430±17,2
S.canmune стерильне	500±20,0
S. litschaneri	300±12,0
S. litschaneri стерильне	300±12,0
Crinipellis	450±18,5
Crinipellis стерильне	430±17,0
Контроль	100±4,0

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. 4.16). Показано, що

культивування штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 за використання незернової біомаси п’яти видів сільськогосподарських відходів з різними попередніми підготовками існує можливість підвищення накопичення бутанолу за умов використання декількох підходів. У залежності від виду сировини можна отримати підвищену акумуляцію бутанолу з оптимізацією оброблення.

Таблиця 4.16

Накопичення бутанолу за різного виду попередньої обробки біомаси

Біомаса	Накопичення бутанолу, г/л					
	Гідроліз				УЗД	Нативна
	Лужний	Лужно-ензиматичний	Кислотний	Кислотно-ензиматичний		
Соя	2,9±0,1	1,8±0,1	1,2±0,2	2,2±0,2	2,3±0,1	1,0±0,1
Пшениця	1,0±0,2	1,2±0,1	1,0±0,5	1,4±0,2	1,6±0,1	0,5±0,1
Ячмень	1,0±0,1	1,0±0,1	2,0±0,2	2,2±0,1	1,8±0,1	0,6±0,1
Соняшник	1,8±0,2	1,6±0,3	1,0±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1	0,6±0,1
Кукурудза	1,0±0,2	0,8±0,1	3,0±0,2	3,2±0,2	1,6±0,1	0,6±0,1

Результати дослідження свідчать, що за лужного гідролізу біомаси сої та соняшника накопичення цільового продукту зростало 2,8 та в 3 рази, відповідно. Натомість, найбільший показник акумуляції бутанолу на незерновому сільськогосподарському відході пшениці отримано за УЗД і він був вищий в 3 рази.

Найбільш перспективним для ячменю та кукурудзи, як підробіток виявився кислотно-ензиматичний гідроліз, який збільшував вихід бутанолу в 4 та 5 разів, відповідно. Менш ефективним виявився кислотний гідроліз, певно за рахунок накопичення інгібіторів у середовищі та лужно-ензиматичний, що може бути пов’язано з ускладненням дії ферменту після олуговування біомаси. Оптимізація технологічних параметрів з урахуванням потреб культур, дала змогу підвищити накопичення цільового продукту. Наведені результати свідчать про ефективність

застосування різних видів та підходів до попередньої обробки сільськогосподарських відходів, що може бути конкурентоспроможним у промислових умовах.

Було проведено попередню підготовку незернової частини біомаси ріпаку за допомогою лужного, кислотного, лужно-ензиматичного та кислотно-ензиматичного гідролізів. Встановлено pH нейтральне pH середовища за допомогою додавання крейди та HCl та проведено ферментацію та порівняння УЗД з іншими методами. Отримані результати приведено на рис. 4.36.

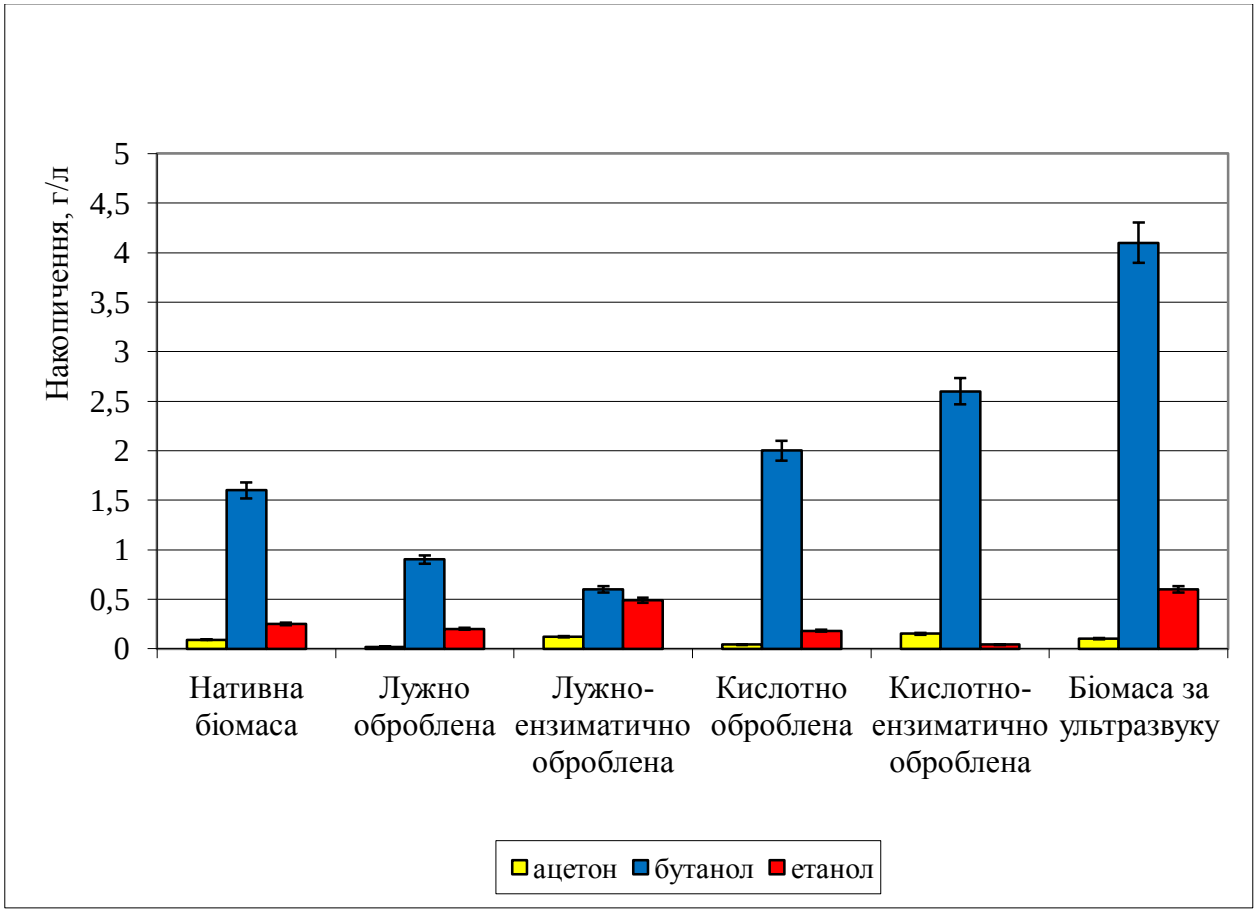


Рис. 4.36 Накопичення продуктів АБЕ ферментації за різної попередньої підготовки біомаси ріпаку

Було показано, що оброблення за допомогою кислотного гідролізу 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.

Найбільше накопичення бутанолу було показано за використання УЗД як методу попередньої підготовки ріпаку (4,1 г/л). Наведені результати свідчать про ефективність та доцільність застосування ультразвуку як попереднього обробляння сировини в технологіях рідких біопалив, а також дозволяють встановити оптимальні значення технологічних параметрів. УЗД економічно вигідніша за гідроліз, отже цей спосіб попередньої підготовки біомаси може бути конкурентно спроможнім в промислових умовах.

Через стійкість лігноцелюлозної біомаси попередня обробка є вирішальним кроком, який руйнує складну структуру лігноцелюлозних матеріалів і збільшує площу поверхні і пористість, тим самим посилюючи оцукрювання з вивільненням цукрів, що зброджуються (Abolore et al. 2024). Виходячи з результатів досліду компонентного складу (табл. 4.3), найменше лігнину містилося в незерновій біомасі міскантусу, що характеризує його як перспективну сировину для подальших досліджень. Інокулят вносили у створене ензиматичне середовище, яке містило 60 г/л кожного з видів сировини: нативної та попередньо підготовленої за допомогою лужного, кислотного, лужно-ензиматичного та кислотно-ензиматичного гідролізів. Встановлено нейтральне pH середовища за допомогою додавання крейди та HCl та проведено ферментацію. Отримані результати наведено на рис. 4.37.

У результаті роботи було показано, що всі види сировини конвертувалися до бутанолу. Встановлено, що оброблення за допомогою лужного гідролізу не суттєво впливало на накопичення продуктів АБЕ ферментації. Лужна попередня підготовка сировини знижувала накопичення бутанолу у культуральній рідині порівняно з нативною біомасою, що може бути обумовлене накопиченням інгібіторів у гідролізатах біомаси. Кислотний гідроліз біомаси позитивно впливав на акумуляцію цільового продукту та підвищував його.

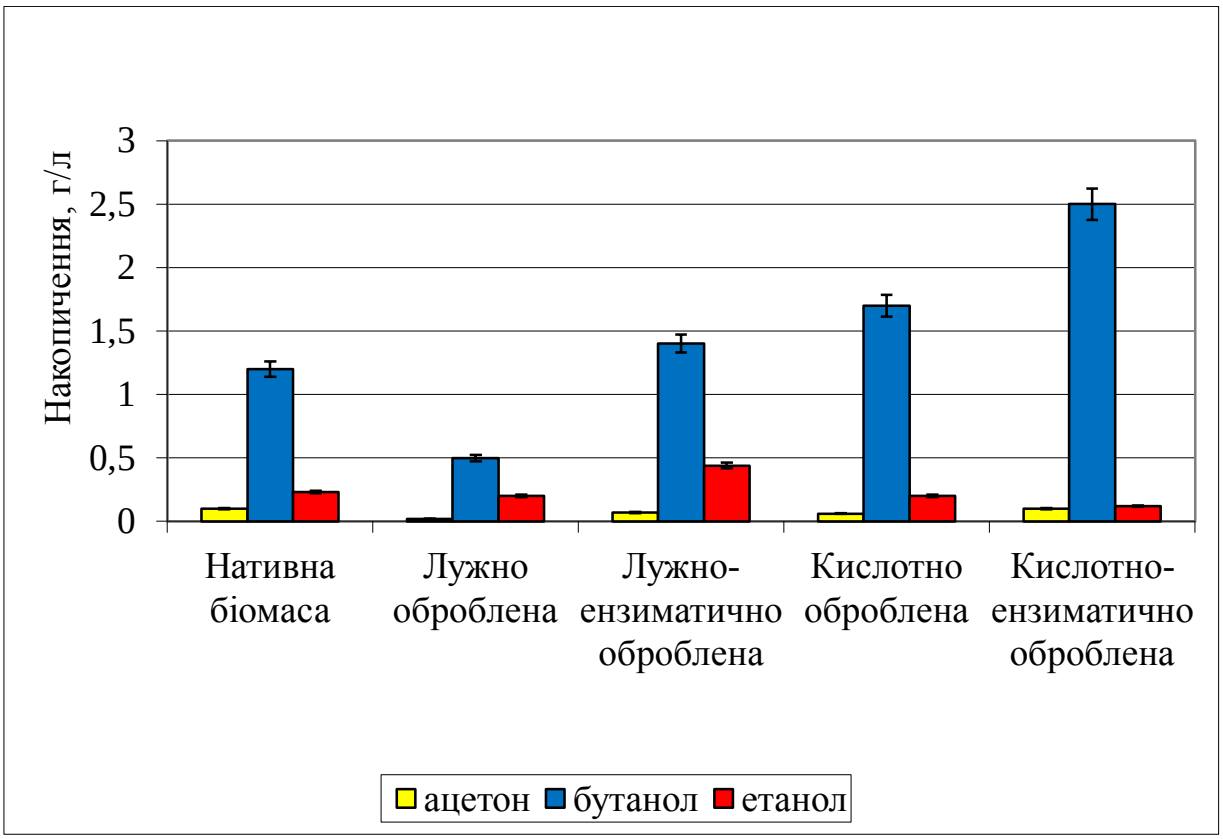


Рис. 4.37 Накопичення продуктів АБЕ ферментації на ензиматичному середовищі за різної попередньої підготовки біомаси міскантусу

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. Наші майбутні дослідження будуть зосереджені на оптимізації оцукрювання.

У Національному ботанічному саду імені М. М. Гришка НАН України створено цілий генофонд *Sorghum saccharatum* (L.) Moench, який характеризується скоростиглістю, посухостійкістю, високою врожайністю фітомаси, високим вмістом вуглеводів у надземній масі та виходом біоетанолу (Rakhmetova et al., 2020). За даними НБС НАН України у період воскової стиглості рослини *Sorghum saccharatum* досягають максимальних продуктивних. Серед досліджуваних сортів найбільшу врожайність стебла (63,1-73,3 т/га) та вихід етанолу (3,53-4,39 т/га) забезпечили сорти Ботанічний, Енергодар та

Медове. Загальна вартість етанолу становила від 132,60 до 228,280 тис.грн/га (табл. 4.17).

Таблиця 4. 17

Продуктивність стеблової маси, вихід та вартість етанолу з фітосировини *Sorghum saccharatum* у період воскової стиглості

Сорт	Продуктивність стебла, т/га	Вихід етанолу, т/га	Загальна вартість етанолу, тис.грн/га
Янтар	49,1±2,0	2,55±0,1	132,600
Медове	63,1±2,5	3,53±0,2	183,560
Ботанічний	73,3±2,9	4,39±0,2	228,280
Прогрес	61,8±2,5	3,47±0,1	180,440
Енергодар	72,8±2,9	4,33±0,2	225,160
Памяті Шепеля	59,4±2,4	3,48±0,1	180,960

Доведено, що сорго є цінною сировиною для виробництва біобутанолу. Вихід біобутанолу суттєво залежить від багатьох чинників. Було проведено попередню підготовку незернової частини біомаси сорго сортозразку Alta Seads за допомогою лужного, кислотного, лужно-ензиматичного та кислотно-ензиматичного гідролізів. Встановлено нейтральне pH середовища за допомогою додавання крейди та HCl та проведено ферментацію. Отримані результати наведено на рис. 4.38.

Було показано, що оброблення за допомогою кислотного гідролізу не впливало на накопичення продуктів АБЕ ферментації. Лужна та лужно-ензиматична попередня підготовка сировини підвищила накопичення бутанолу у культуральній рідині порівняно з нативною біомасою. Найбільше накопичення бутанолу було отримано за кислотно-ензиматичної попередньої обробки та становило 2 г/л порівняно з нативною біомасою – 1 г/л.

Було проведено попередню підготовку незернової частини біомаси сорго сортозразку St-20 за допомогою лужного, кислотного, лужно-ензиматичного та кислотно-ензиматичного гідролізів. Встановлено нейтральне pH середовища за допомогою додавання крейди та HCl та проведено ферментацію. Отримані результати наведено на рис. 4.39.

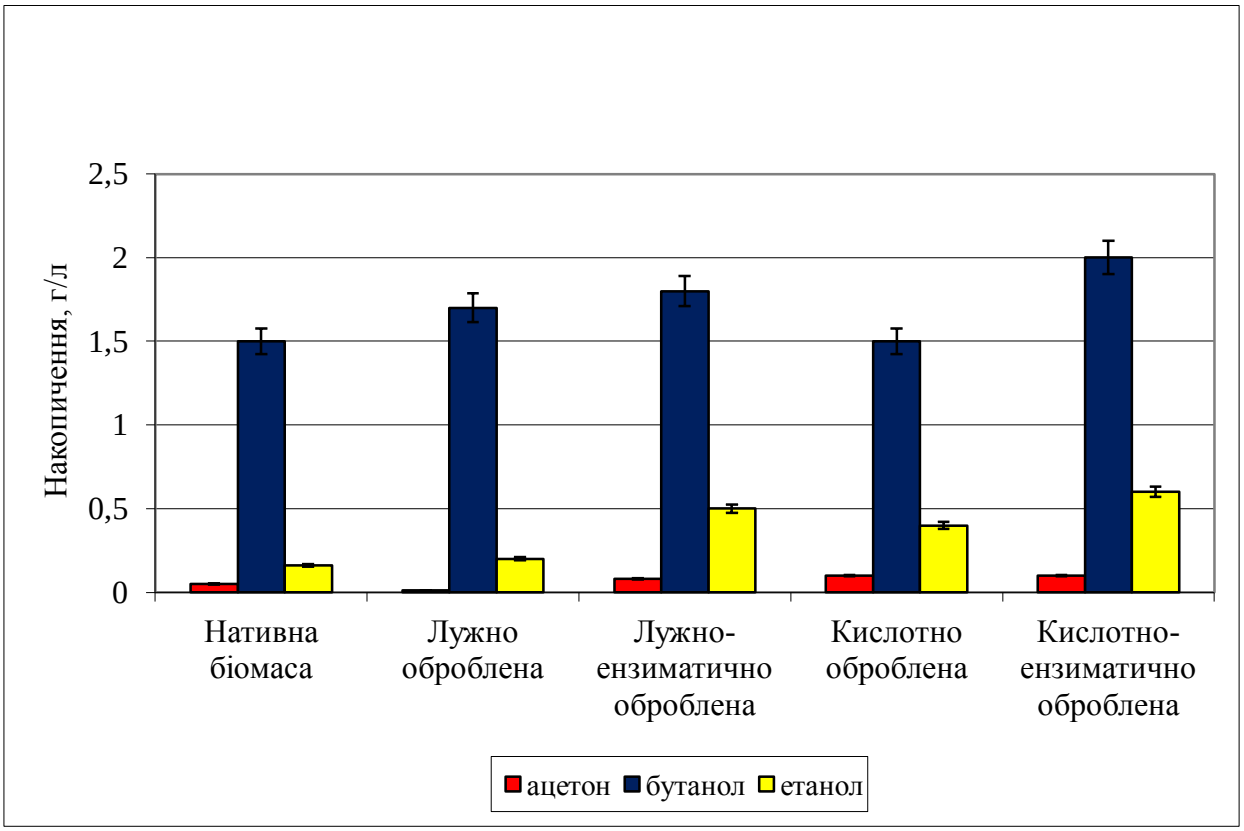


Рис 4.38 Накопичення продуктів АБЕ ферментації на ензиматичному середовищі за різної підготовки сорго цукрового сортозразку Alta Seads

Було показано, що оброблення за допомогою кислотного гідролізу не впливало на накопичення продуктів АБЕ ферментації. Лужна та кислотно-ензиматична попередня підготовка сировини підвищила накопичення бутанолу у культуральній рідині порівняно з нативною біомасою. Найбільше накопичення бутанолу було отримано за лужно-ензиматичної попередньої обробки та становило 2 г/л порівняно з нативною біомасою – 1 г/л.

Було проведено попередню підготовку незернової частини біомаси сорго

сортозразку Амбер-1 Індія за допомогою лужного, кислотного, лужно-ензиматичного та кислотно-ензиматичного гідролізів. Встановлено нейтральне pH середовища за допомогою додавання крейди та HCl та проведено ферментацію. Отримані результати приведено на рис. 4.40.

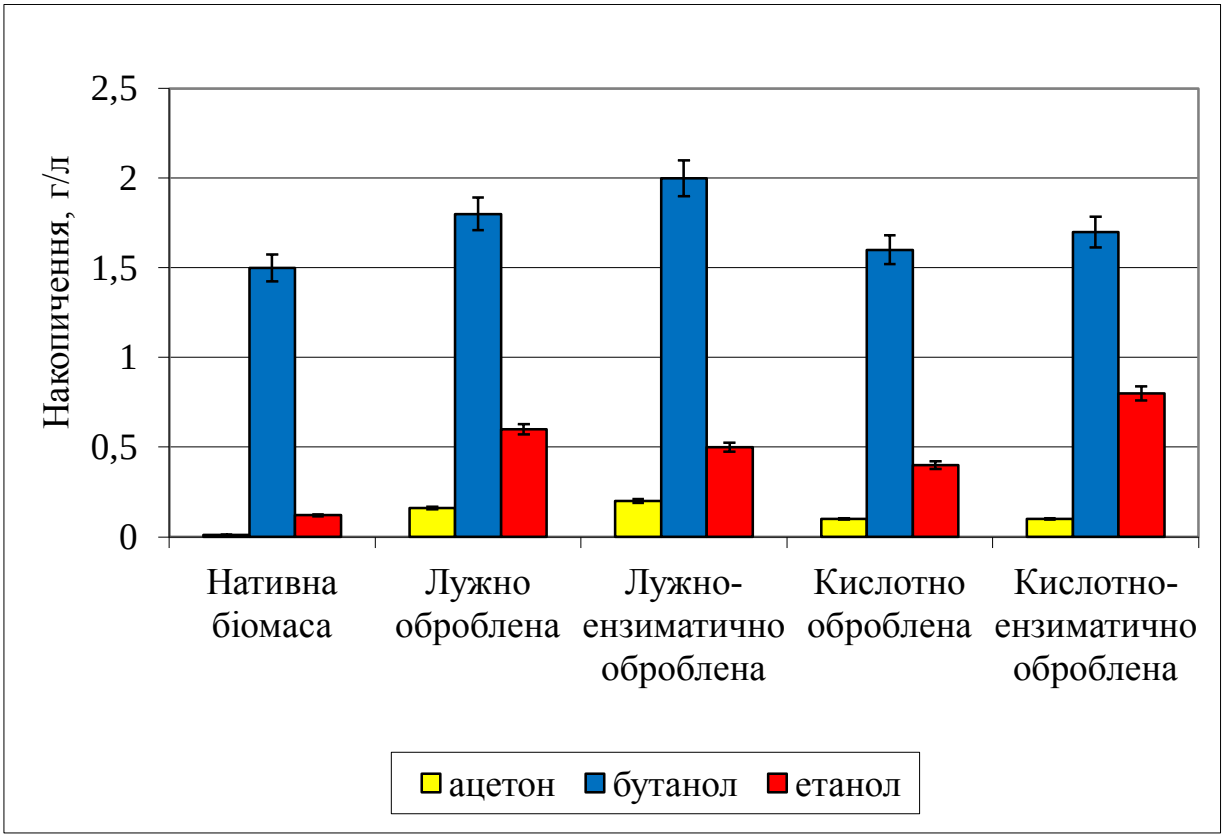


Рис. 4.39 Накопичення продуктів АБЕ ферментації на ензиматичному середовищі за різної підготовки сорго цукрового сортозразку St-20.

Було показано, що оброблення за допомогою кислотного гідролізу не впливало на накопичення продуктів АБЕ ферментації. Лужна та лужно-ензиматична попередня підготовка сировини підвищила накопичення бутанолу у культуральній рідині порівняно з нативною біомасою. Найбільше накопичення бутанолу було отримано за кислотно-ензиматичної попередньої обробки та становило 6,2 г/л порівняно з нативною біомасою – 5 г/л.

Було проведено попередню підготовку незернової частини біомаси сорго сорту Енергодар за допомогою лужного, кислотного, лужно-ензиматичного та кислотно-ензиматичного гідролізів. Встановлено нейтральне pH середовища за

допомогою додавання крейди та HCl та проведено ферментацію. Отримані результати приведено на рис. 4.41

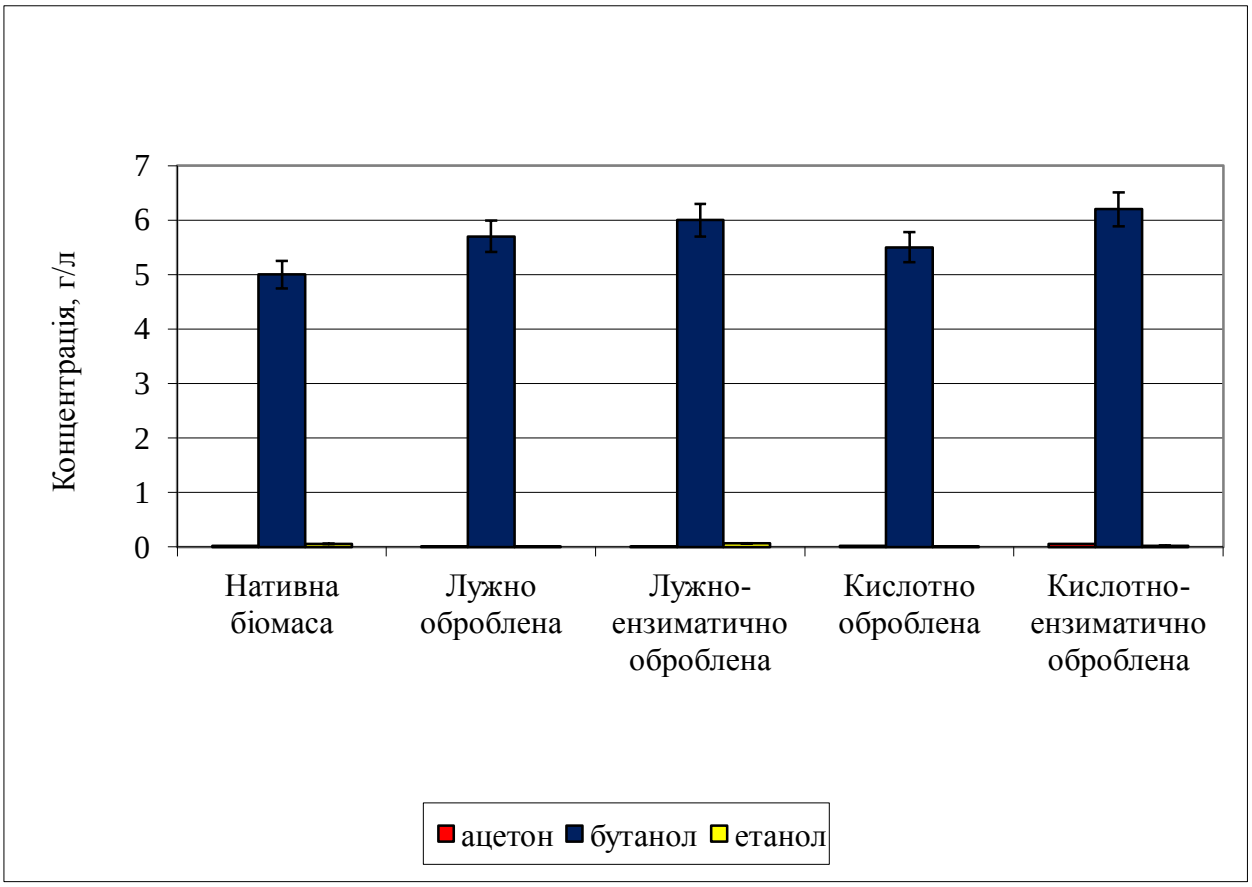


Рис. 4.40 Накопичення продуктів АБЕ ферментації на ензиматичному середовищі за різної підготовки сорго цукрового сортозразку AMBR

Було показано, що лужна, кислотна та лужно-ензиматична попередня підготовка сировини підвищила накопичення бутанолу у культуральній рідині порівняно з нативною біомасою. Найбільше накопичення бутанолу було отримано за кислотно-ензиматичної попередньої обробки та становило 7 г/л порівняно з нативною біомасою – 5,3 г/л.

Для підвищення біоконверсії незернової біомаси сорго цукрового (сортозразків Energodar, hybrid AMBR-1, hybrid-720, hybrid ST-207) було проведено попередню підготовку незернової частини біомаси цукрового сорго за використання лужного, кислотного, лужно-ензиматичного та кислотно-

ензиматичного гідролізу. Встановлено нейтральне pH середовища за допомогою додавання крейди та HCl та проведено ферментацію. Отримані результати накопичення бутанолу (рис. 4.42) за умов культивування *Clostridium* sp. UCM B-7570.

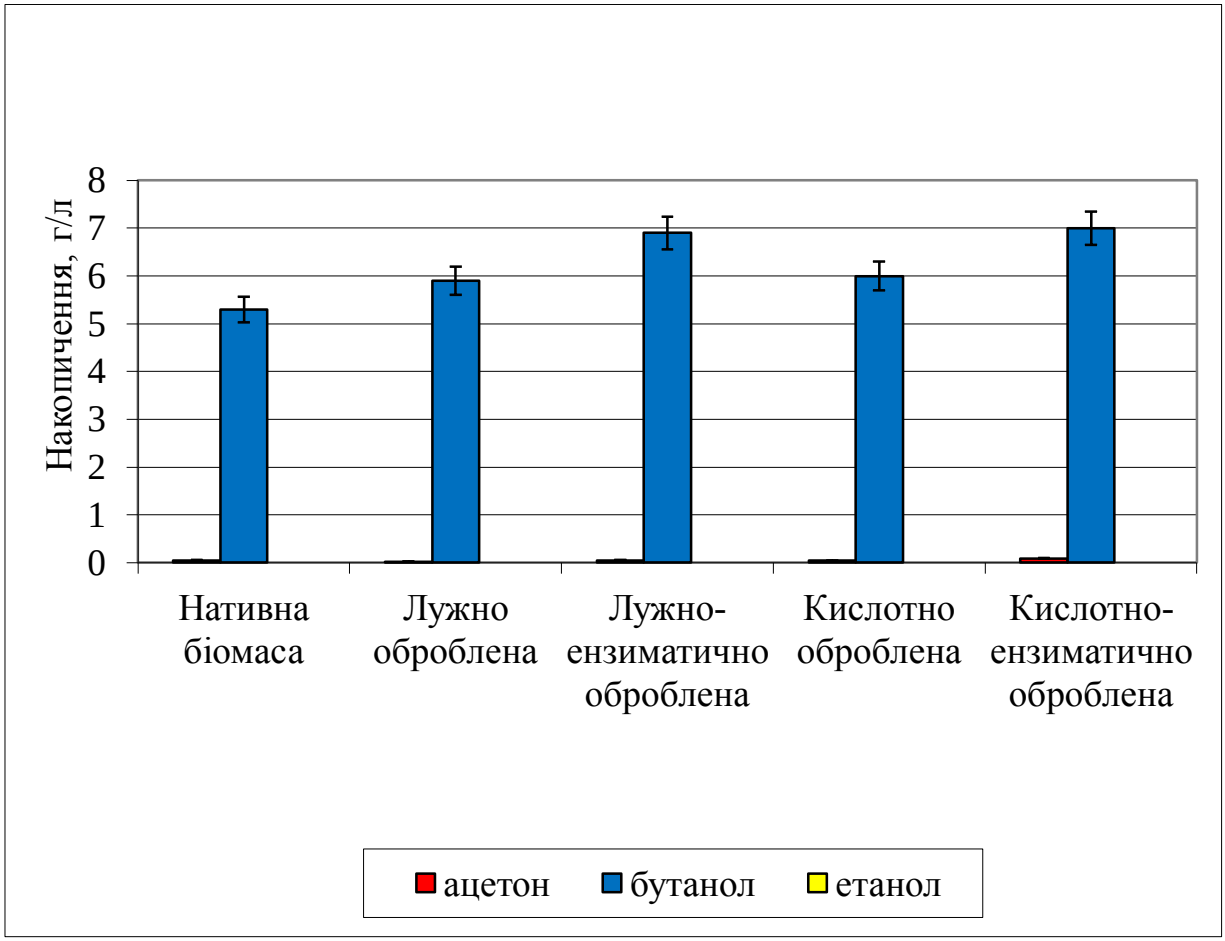


Рис 4.41 Накопичення продуктів АБЕ ферментації на ензиматичному середовищі за різної підготовки сорго цукрового сортозразку Energodar

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 визначали компонентний склад сировини (табл. 4.18).

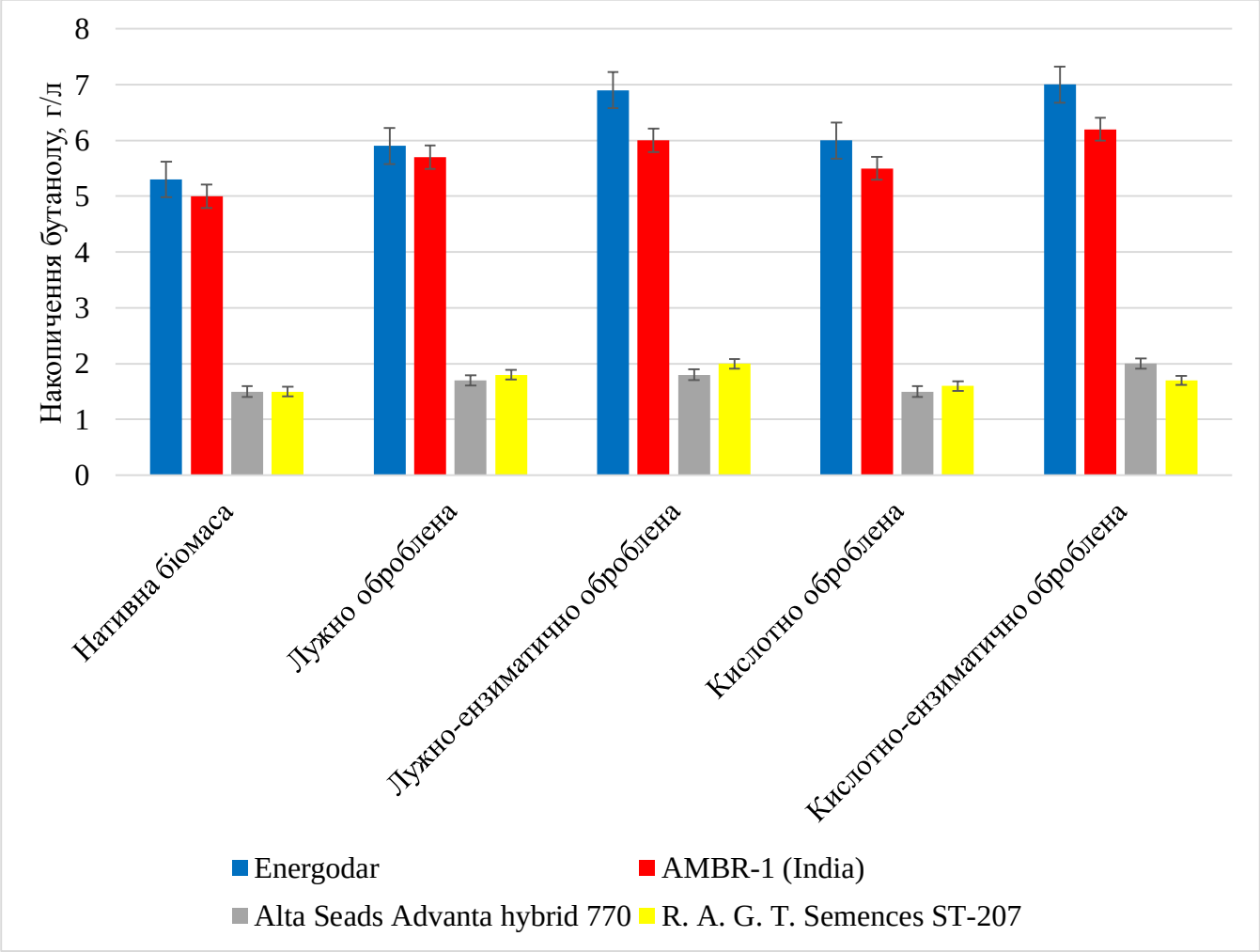


Рис. 4.42 Накопичення продуктів АБЕ ферментації в ензиматичному середовищі за різної попередньої підготовки біомаси сорго цукрового

Результати дослідження показали зміни у компонентному складі біомаси сорго після різних видів гідролізу. Кількість целюлози збільшувалась, що можна пояснити деградацією кристалічності під впливом гідролітичних факторів та

розривом лігніноцелюлозних зв'язків, а також геміцелюлозних комплексів і зменшенням відсотку залишкового лігніну як наслідок руйнування за попередньої обробки.

Таблиця 4.18

Компонентний склад біомаси сорго цукрового сорту Energodar за різної попередньої підготовки

Попередня підготовка сировини	Компонентний склад, %						
	зола	жири, смоли	водороз-чині речовини	целюлоза	лігнін	геміцелюлози	вологість
Вихідне	3,6±0,1	1,6±0,1	16,9±0,7	38,0±1,5	13,0±0,5	26,9±1,0	10,0±0,4
Термоба-рична	3,4±0,1	1,7±0,1	17,5±0,7	39,9±1,6	9,8± 0,4	17,6±0,7	10,0±0,2
Органозоль на 60 хв	2,5±0,1	1,7±0,1	11,9±0,5	42,4±1,7	10,9±0,5	20,5±0,8	10,0±0,3
Органозоль на 90 хв	1,7±0,1	1,6±0,1	6,8± 0,3	42,5±1,7	8,2± 0,5	29,2±0,8	10,0±0,4

Тривалість гідролізу суттєво впливала на компонентний склад, зменшуючи кількість водорозчинних речовин, які не витримували жорстких умов гідролізу та збільшуючи відсоток геміцелюлоз за рахунок ймовірного звільненням з лігнін-геміцелюлозних комплексів. Ензиматичний гідроліз проводили з використанням різної попередньої підготовки біомаси та визначали загальне накопичення цукрів (рис. 4.43)

Найвищий рівень накопичення цукрів було отримано за умов ензиматичного гідролізу біомаси сорго, яка була попередньо оброблена термобарично та органозольно протягом 90 хв. Отримані результати свідчать, що доступність субстрату для ензимів підвищувалась за попередньої обробки біомаси. Показано, що кожен вид гідролізу біомаси сорго цукрового сорту Energodar призводив до отримання концентрації цукру 17 г/л після

ензиматичного оброблення. Проведено культивування з використанням органозольного та термобаричного гідролізу біомаси сорту Energodar та визначено накопичення продуктів АБЕ ферментації (рис. 4.44).

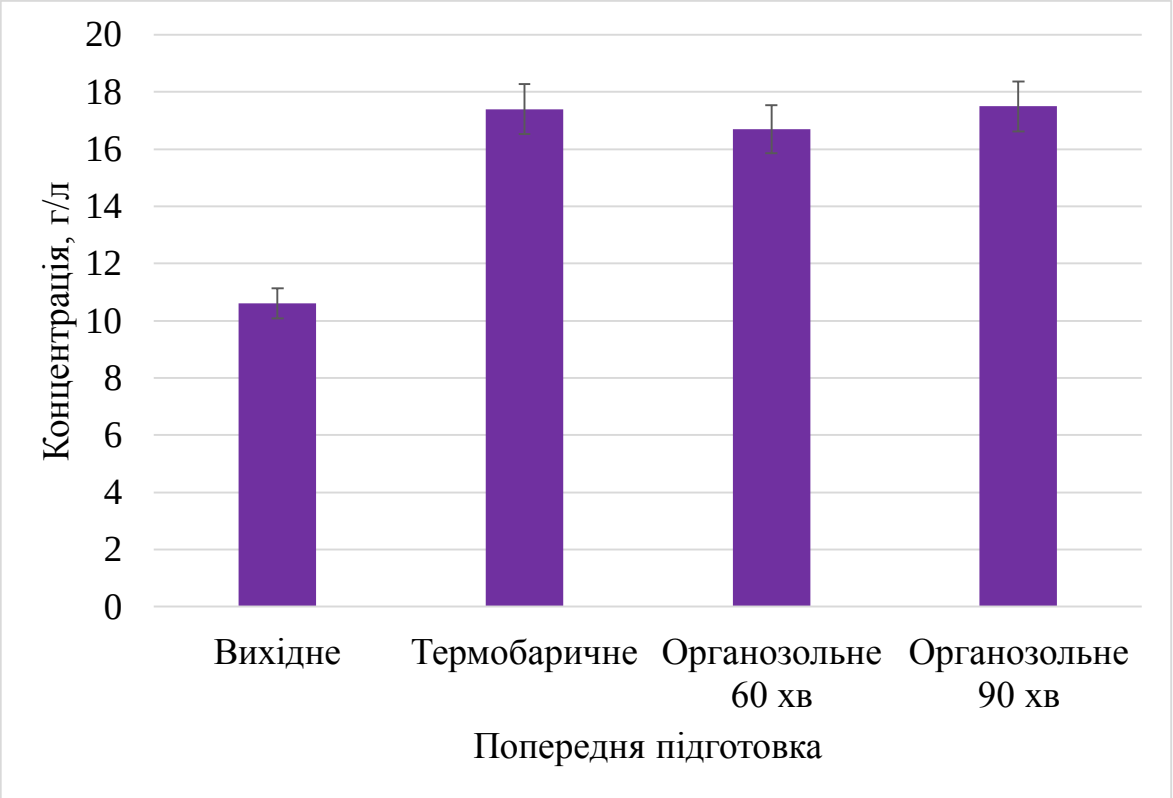


Рис. 4.43. Загальна концентрація цукрів після ензиматичного гідролізу сировини сорго цукрового сорту Energodar за різної попередньої підготовки

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.

Було проведено культивування за використання різної попередньої підготовки біомаси сорту Енергодар та визначено накопичення продуктів АБЕ ферментації (рис. 4.45). За результатами дослідження показано, що найбільше накопичення бутанолу відбувалося у культуральній рідині за використання органозольної підготовленої незернової частини біомаси сорго цукрового сорту

Енергодар.

Вихід біобутанолу суттєво залежить від багатьох чинників. За удосконалення технології отримання біобутанолу, на основі фізіологічних та біохімічних особливостей штамів визначено вихід цільового продукту із зеленої біомаси різних генотипів сорго. Зважаючи на отримані результати ми оцінили потенційний вихід біобутанолу з урожаєм фітосировини сорго з одиниці площі (табл. 4.19).

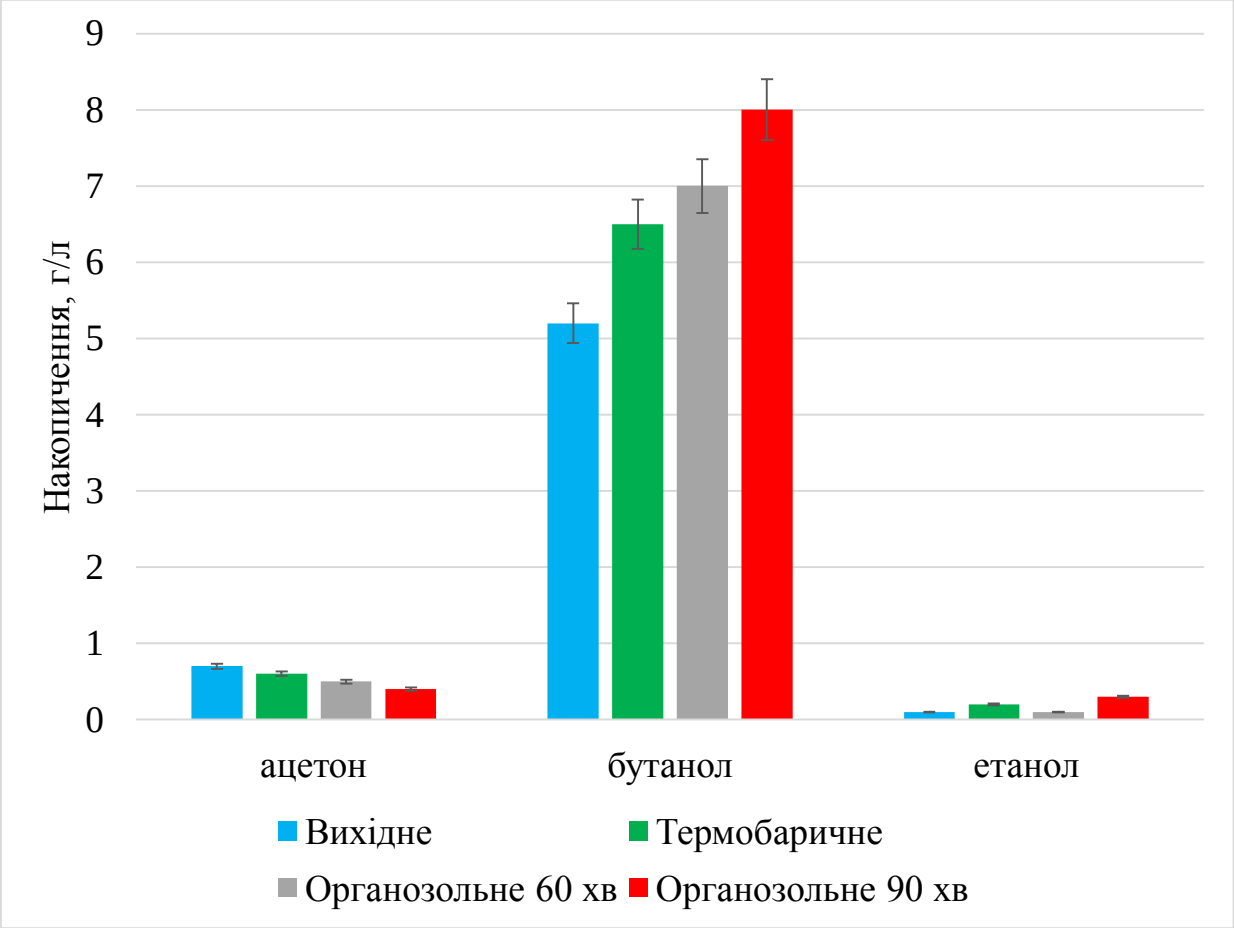


Рис. 4.44 Накопичення продуктів АБЕ ферментації за культивування *Clostridium* sp. UCM B-7570 біомаси сорту Energodar з різним обробленням

Варто зазначити, що всі вивчені сорти забезпечують досить високий розрахунковий вихід біобутанолу – від 3775 до 4925 кг/га. Загальна вартість біобутанолу з урожаю з одиниці площі оцінюється від 430,35 до 561,45 тис.грн/га. Найвищий потенційний вихід біобутанолу та його загальна вартість отримано з урожаю фітосировини сортів Енергодар та Ботанічний.

Таким чином, результати досліджень свідчать про те, що *Sorghum saccharatum* (L.) Moench як нова високопродуктивна біоенергетична культура в північній частині України характеризується високими ростовими, продуктивними, енергетичними та економічними показниками.

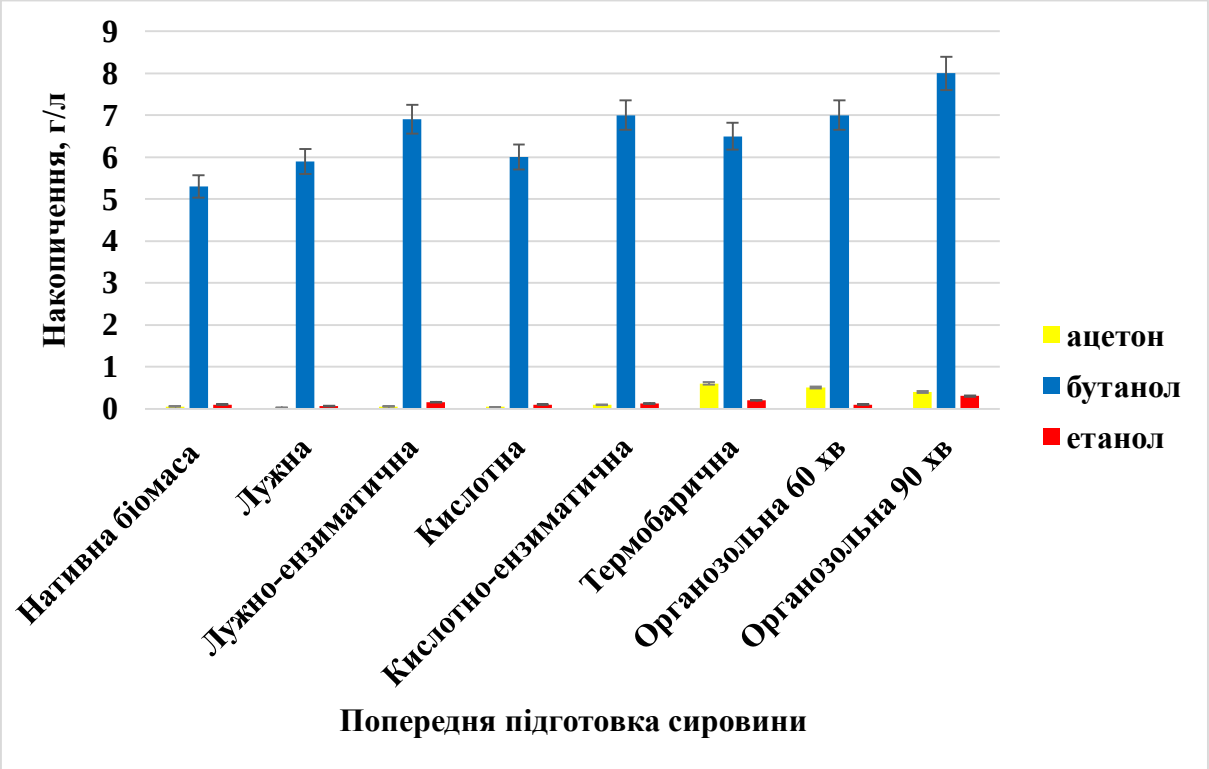


Рис. 4.45 Порівняльне накопичення продуктів АБЕ ферментації за культивування на біомасі сорту Енергодар за різної попередньої підготовки

Було проведено дослідження за різної попередньої підготовки сировини. Отримані дані занесено до табл. 4.20. Наведені розрахунки щодо складу насаджень та обсягів утворення лігноцелюлозної сировини, з урахуванням отриманих даних щодо параметрів складу природних біополімерів та енергетичної цінності сировини, дозволяють визначити динаміку утворення (накопичення, зберігання) та зміни енергетичного потенціалу лігноцелюлозної сировини протягом року. У результаті проведених досліджень показано, що незернова рослинна біомаса містить компоненти, які можуть зброджуватись, а саме целюлолозу, геміцелюлозу, водорозчинні речовини та лігнін, що не

конвертується мікроорганізмами, який складається з фенілпропанових ланок, пов'язаних різними типами міжодиничних зв'язків, які грають цементуючу роль для з'єднання клітин і збільшення властивостей механічної міцності, що робить лігноцелюлозу стійкою до біорозкладання мікроорганізмами.

Таблиця 4.19

Розрахунковий вихід біобутанолу з фітосировини *Sorghum saccharatum*

Сорт	Урожайність фітосировини, т/га	Розрахунковий вихід біобутанолу, кг/га	Загальна вартість біобутанолу, тис.грн/га
Янтар	75,5	3775	430,35
Медове	86,5	4325	493,05
Ботанічний	97,8	4890	557,46
Прогрес	84,7	4235	482,79
Енергодар	98,5	4925	561,45

Тому видалення лігніну з лігноцелюлозної біомаси перед гідролізом целюлози та геміцелюлози дуже бажано для успішної ферментації лігноцелюлози АБЕ. Проведені дослідження показали, що нетрадиційні субстрати (подрібнена біомаса сої, ріпаку, дротовидного проса, пшениці; сік топінамбура, технічний гліцерин, гліцерин-сирець) конвертуються до біобутанолу. Накопичення бутанолу культурою *C. acetobutylicum* UCM B-7407 за культивування від'ємно-доливним методом на гліцерині-сирці не змінювалось протягом першого від'ємно-доливного періоду культивування, а з починаючи з другого – знижувалось.

Таблиця 4.20

Накопичення бутанолу на різних видах лігноцелюлозних субстратів

Субстрати	Бутанол, г/л
зелена біомаса - сої *Glycine max*	1,5±0,1
-ріпаку *Brássica nápus*	2,3±0,1
-пшениці *Tríticum* sp	0,3±0,1
-дротовидного проса *Panicum virgatum* L.	2,8±0,1
-ячменя *Hordeum* sp.	1,2±0,1
-соняшник *Helianthu* L.	1,0±0,1
-*Miscanthus saccharioflorum*	1,2±0,1
сорго - *Sorgum sacharatum* АМБР-1 Індія	5,0±0,2
- Енергодар	**5,2±0,2**
- Alta Seads Advanta	1,5±0,1
- R.A.G.T. Semences ST-207	1,5±0,1
- сік	**8,2±0,3**
- кукурудзи *Zea mays*	0,7±0,1
Вичавки з яблук	**6,0±0,2**
дротовидне просо - компоненти термобаричного гідролізу	2,0±0,1
- біомаса після термобаричного гідролізу	**3,0±0,1**
- з попередниками синтезу	**7,0±0,3**
скоп	0,8±0,1
- після термобаричного гідролізу	1,7±0,1
сорго - АМБР-1 Індія кислотно-ензиматичний гідроліз	**6,2±0,3**
Alta Seads Advanta кислотно-ензиматичний гідроліз	2,0±0,1
R..A.G.T. Semences 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**
Miscanthus saccharioflorum кислотно-ензиматичний гідроліз	2,5±0,1
Zea mays кислотно-ензиматичний гідроліз	**3,2±0,1**
Brássica nápus ультразвукова дезінтеграція	2,5±0,1
Tríticum sp ультразвукова дезінтеграція	1,6±0,1
Hordeum sp. кислотно-ензиматичний гідроліз	2,2±0,1
Glycine max лужний гідроліз	2,8±0,1
Helianthu L. лужний гідроліз	1,8±0,1

Скринінг штамів продуцентів бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570, *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *C. tyrobutylicum* IFBG C4B виявив, що найбільше накопичення бутанолу було у культуральній рідині за використання *Clostridium* sp. штаму UCM B-7570 та подрібненої біомаси цукрового сорго (1,5 г/л) як субстрату та штаму *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та соку (8,2 г/л). Визначено, що біомаса, сік та багаса сорго цукрового конвертувалась штамами-продуцентами бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570, *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *C. tyrobutylicum* IFBG C4B, але накопичення бутанолу залежало від субстрату та його попередньої підготовки. Встановлено, що оптимізація умов попередньої підготовки сировини підвищувала накопичення бутанолу на 25-50 %. Показана можливість використання біомаси сорго цукрового (сорт Energodar, hybrid AMBR-1, hybrid-720, hybrid ST-207), для накопичення бутанолу без деградації штамів. За умов використання сорту Energodar та hybrid AMBR-1, штам-продуцент *Clostridium* sp. UCM B-7570 накопичував найбільше бутанолу (5 г/л). Визначено, що для біомаси сорго цукрового сорту Energodar, hybrid AMBR-1, hybrid-720, hybrid ST-207 оптимальною попередньою підготовкою виявилось поєднання кислотного та ензиматичного гідролізу. Показано, що оптимізація технологічних параметрів культивування, а саме попередньої обробки за допомогою органозольного гідролізу дало змогу отримати 8 г/л біобутанолу з 60 г зеленої біомаси сорго сорту Energodar.

Основні результати даного розділу опубліковані в наукових роботах:

1. **Tigunova, O.O.,** Rakhmetov, D.B., Blume, Ya.B., & Shulga, S.M. (2024). Biobutanol production using non-grain biomass *Sorgum saccharatum* as substrate. *Open agriculture journal*, 18, e18743315284161. doi: 10.2174/0118743315284161231228065512 **Q3**
2. **Тігунова, О.О., та** Шульга, С.М. (2024). Розділ 3. Удосконалення технології отримання біобутанолу на основі дослідження фізіологічних та біохімічних властивостей вітчизняних штамів-продуцентів. Розділ 4.

Дослідження продуктивності штамів-подуцентів бутанолу у процесі зберігання. *Сорго цукрове (Sorgum saccharatum (L.) Moench) в Україні: біологія, генотипове різноманіття, продуктивність та перспективи використання на біопаливо.* Київ. Ліра-К.

3. Шульга, С.М., **Тігунова, О.О.,** Братишко, В.В., та Блюм, Я.Б. (2024). *Біобутанол. Продуценти, субстрати, культивування та відновлення.* Київ: Наукова думка. doi: 10.15407/978-966-00-1918-8.
4. 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. 2024; 23:1008-1015. doi: 10.22616/ERDev.2024.23.TF205
5. **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.
6. 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.
7. 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-практичною конференції A production of agriculture products based on smart technologies. Глеваха 2023, 162-165.
8. 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
9. **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.

10. **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, с. 259-261.
11. **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 **Q2**
12. **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/biotech15.0.005
13. 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.
14. **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. С. 268-269
15. 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
16. 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

17. **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.
18. **Тігунова, О.О.,** Братішко, В.В., Андріяш, Г.С., та Шульга, С.М. (2021). *Накопичення бутанолу штамами-продуцентами на відходах лігноцелюлозної сировини*. Матеріали XXII міжнародної науково-практичної конференції Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI столітті. Київ. 910-912
19. **Тігунова. О.О.,** Андріяш, Г.С., та Шульга, С.М. (2021). *Накопичення бутанолу штамами-продуцентами при використанні яблучних вичавок.* Матеріали XXII міжнародної науково-практичної конференції Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI столітті. Київ. 916-918
20. **Тігунова, О.О.,** Братішко, В.В., Прийомов, С.Г., та Шульга, С.М. (2021). *Біобутанол – перспектива альтернативної енергетики.* Матеріали Всеукраїнської 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» Київ. 97-99
21. **Tigunova, O.O.,** Umansikiy, 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
22. **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. *The open agriculture journal*, 14, 187-197. doi: 10.2174/1874331502014010187 **Q4**
23. **Тігунова, О.О.,** Андріяш, Г. С., та Рахметов, Д. Б. (2020). *Накопичення*

біобутанолу за використання сорго цукрового як субстрату. Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна Київ. 161.

24. Братишко, В.В., Ребенко, В.И., Софиенко, В.С., Шульга, С.М., и **Тигунова, Е.А.** (2020). *Пути повышения кормовой и энергетической ценности незерновой части урожая сельскохозяйственных культур.* Сборник научных статей по материалам xxiii международной научно-практической конференции «Современные технологии сельскохозяйственного производства», Гродно, Белорусь. 223-225.
25. 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.
26. 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.
27. **Tigunova, O.O.,** Beiko, N. E., Andriash, H.S., Zaharova, O.G., Pryiomov, S.H., & Shulga, S.M. (2019). Rape biomass (*Brassica napus*) as raw materials to obtain biobutanol. *Biotechnology Acta,* 12(1), 75-80. doi: 10.15407/biotech12.01.075
28. 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.
29. 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.

30. Захарова, О., **Тігунова, О.,** Андріяш, Г., Рахметов, Д., та Рахметова, С. (2018) *Скринінг штамів-продуцентів бутанолу за використання сорго цукрового як субстрату*. II Міждународна науково-практична інтернет-конференція. Біотехнологія: досвід, традиції та інновації. Київ, 78.
31. 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.
32. Захарова, О., **Тігунова, О.,** Андріяш, Г., та Бейко, Н. (2018). *Накопичення бутанолу штамом Clostridium sp. за використання біомаси ріпаку як субстрату*. II Міждународна науково-практична інтернет-конференція. Біотехнологія: досвід, традиції та інновації. Київ: НУХТ, 77.
33. **Tigunova, O.O.,** Beiko, N. E., Andriash, H.S., 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
34. **Tigunova, O.O.,** Beiko, N. E., Andriash, H.S., Pryiomov, 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
35. **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.
36. **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.
37. 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

38. **Тігунова, О.О.,** Андріяш, Г. С., Забейда, О. Ф., та Круподьорова, Т. А. (2017). *Біоконверсія вищимі грибами лігноцелюлозної сировини для отримання біобутанолу*. Тези Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI ст». Київ 133.
39. **Tigunova, O.O.,** Beiko, N.E., Kamenskyh, D.S., Tkachenko, T.V., Yevdokymenko, V.A., Kashkovskiy, V.I., & Shulga S.M. (2016). Using lignocellulosic raw materials, obtained after explosive autohydrolysis, as substrate for obtaining butanol. *Biotechnology Acta*, 9(4), 28-34. doi: 10.15407/biotech9.04.028
40. **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
41. **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.

РОЗДІЛ 5
ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ *CLOSTRIDIUM*

5.1. Іммобілізація штаму-продуценту на різних носіях

Іммобілізація заснована на фіксації біокаталізаторів у або на різних матеріалах, наприклад, натуральних деревних стручках, желатині, агарозі або синтетичному поліуретані, поліакриламіді або полівініловому спирті (Liu et al., 2022). Отримані покращення біопроцесу можуть включати переробку біокаталізатора в повторюваних серійних або безперервних процесах або захист біокаталізатора від впливу навколишнього середовища (Hierro et al., 2024). Крім того, іммобілізація часто підвищує врожайність і продуктивність, оскільки сприяє високій концентрації біокаталізатора, а також покращує процес і стабільність при зберіганні (Najim et al., 2024). Слід відмітити, що іммобілізовані біокаталізатори часто знижують чутливість до забруднення, дозволяючи в деяких випадках нестерильні умови процесу (Andreu & li del Olmo, 2024). Для підвищення накопичення бутанолу штамом з використанням гліцерину-сирцю як субстрату було проведено іммобілізацію клітин культури на різних носіях, які мали високу адгезивну активність щодо культури (рис.5.1). Після іммобілізації на всіх носіях було отримано приєднану біомасу клітин, однак, за цитологічними дослідженнями морфологія культури змінилась (рис. 5.2).

З рис 5.2 видно, що клітини іммобілізованої культури прикріплювались до носіїв та утворювали довгі ланцюги з приблизно 20 клітин. Вихідна не іммобілізована культура таких ланцюгів не утворювала (Тігунова та Шульга, 2013). Таким чином, можна зробити висновок, що іммобілізовані 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 іммобілізованих клітин свідчили про те, що розмноження клітин, ймовірно, гальмується якимись процесами, які

відбуваються у цих клітинах і які відсутні повністю або не протікають з тією ж інтенсивністю, у вільних клітинах.

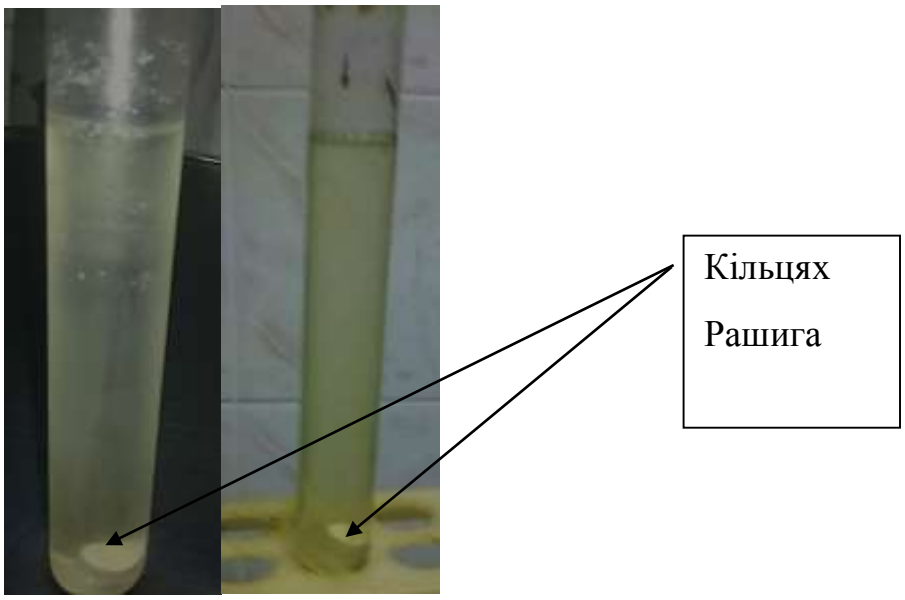


Рис. 5.1 Іммобілізація продуцентів на кільцях Рашига

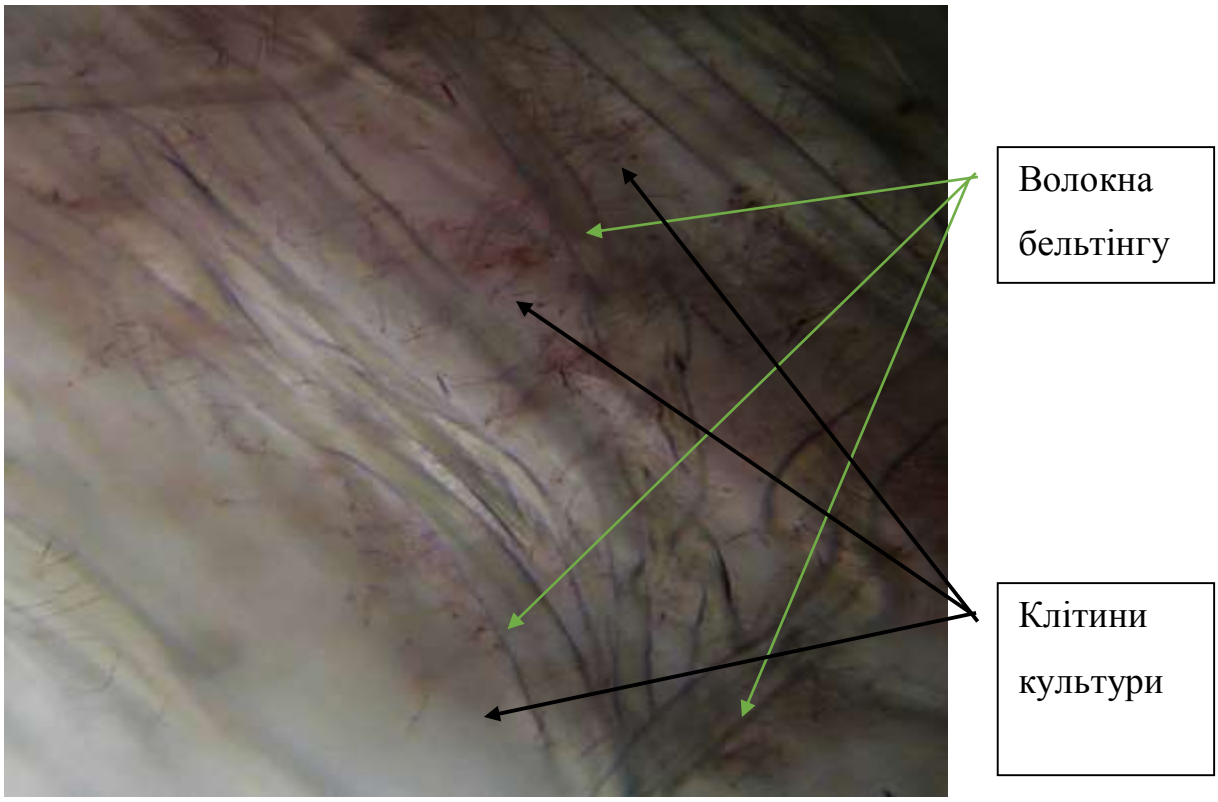


Рис. 5.2 Іммобілізована культура *Clostridium* (забарвлена коричневим) на волокнах бельтінгу (збільшення 900)

Для визначення кількості клітин на носії було проведено відмивання носіїв

та висушування отриманої мікробної біомаси до абсолютно сухої ваги (АСВ). Отримані результати представлено на рис. 5.3.

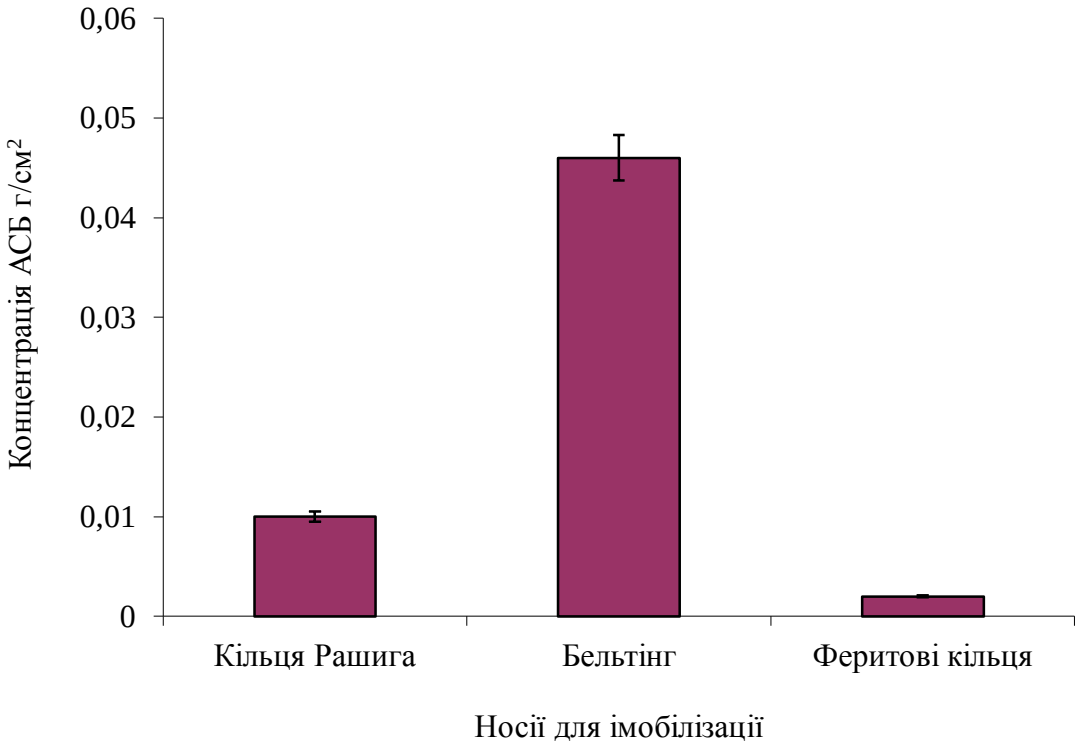


Рис 5.3 Концентрація біомаси на різних носіях.

З рис 5.3 видно, що найбільша кількість клітин абсорбувалась на волокнах смужок бельтінгу. Показано, що біомаса бактерій, що іммобілізувалася на тканині була в 5 разів більше відносно інших носіїв. Отримані дані корелюють з роботою (Chinwatpaiboon et al., 2024), щодо зміни швідкості зростанні культур за імобілізації. Очевидно, що зміна величини питомої швидкості росту клітин при їх іммобілізації також залежить від самих клітин, причому на рівні штаму, а не виду або роду клітин. Однією вкрай важливою характеристикою іммобілізованих клітин, що суттєво відрізняє їх від вільних клітин, є їх надтривала функціональна активність (висока операційна стабільність). У пояснення такої високої стабільності біокаталітичних систем на основі іммобілізованих клітин існує припущення про те, що клітини вступають у деякий

рівноважний стан, сприятливий для їх метаболічної активності, і довго каталізують цільові процеси.

У попередніх дослідженнях було показано, що найкращим джерелом вуглеводу для культури був технічний гліцерин, тому було проведено культивування іммобілізованих клітин з використанням технічного гліцерину як субстрату та визначено накопичення бутанолу. Отримані результати наведено на рис. 5.4.

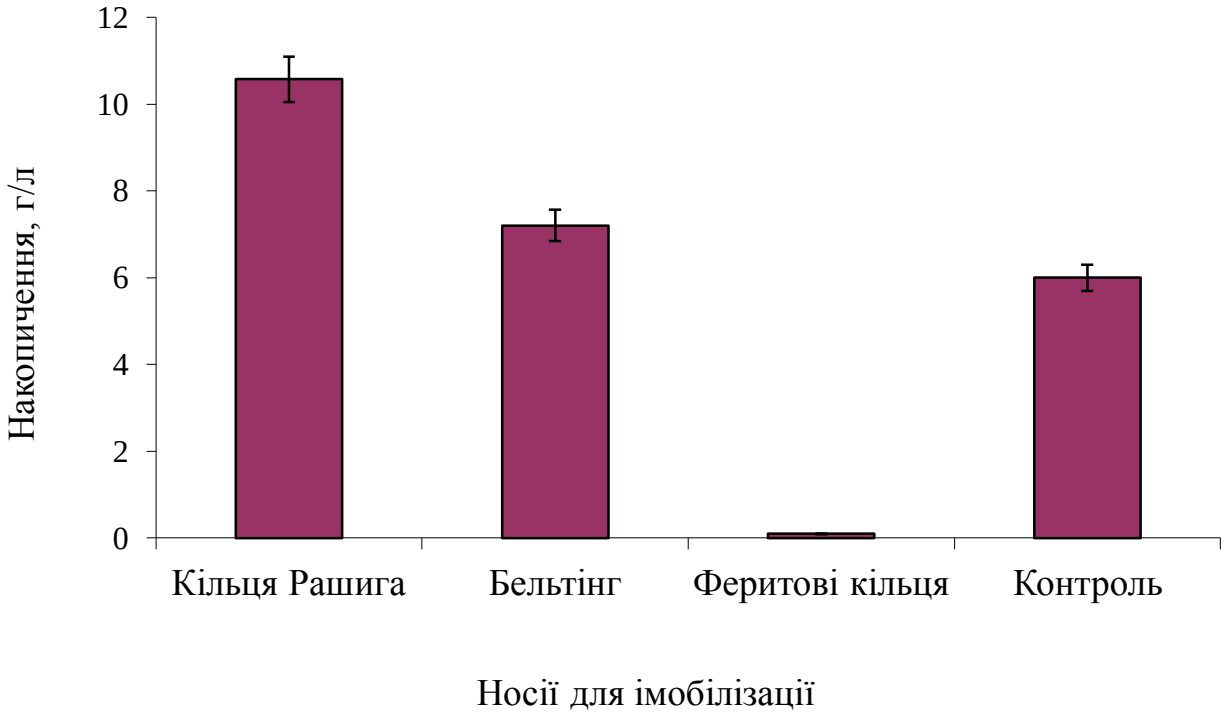


Рис 5.4 Накопичення бутанолу іммобілізованим штамом на різних носіях

З рис 5.4 видно, що 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).

Інгібітори, які вивільняються з біомаси лігноцелюлози під час її обробки, є одним із основних вузьких місць, які перешкоджають її масовому використанню в біотехнологічному виробництві хімічних речовин (Branska et al., 2024). 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. 5.5).

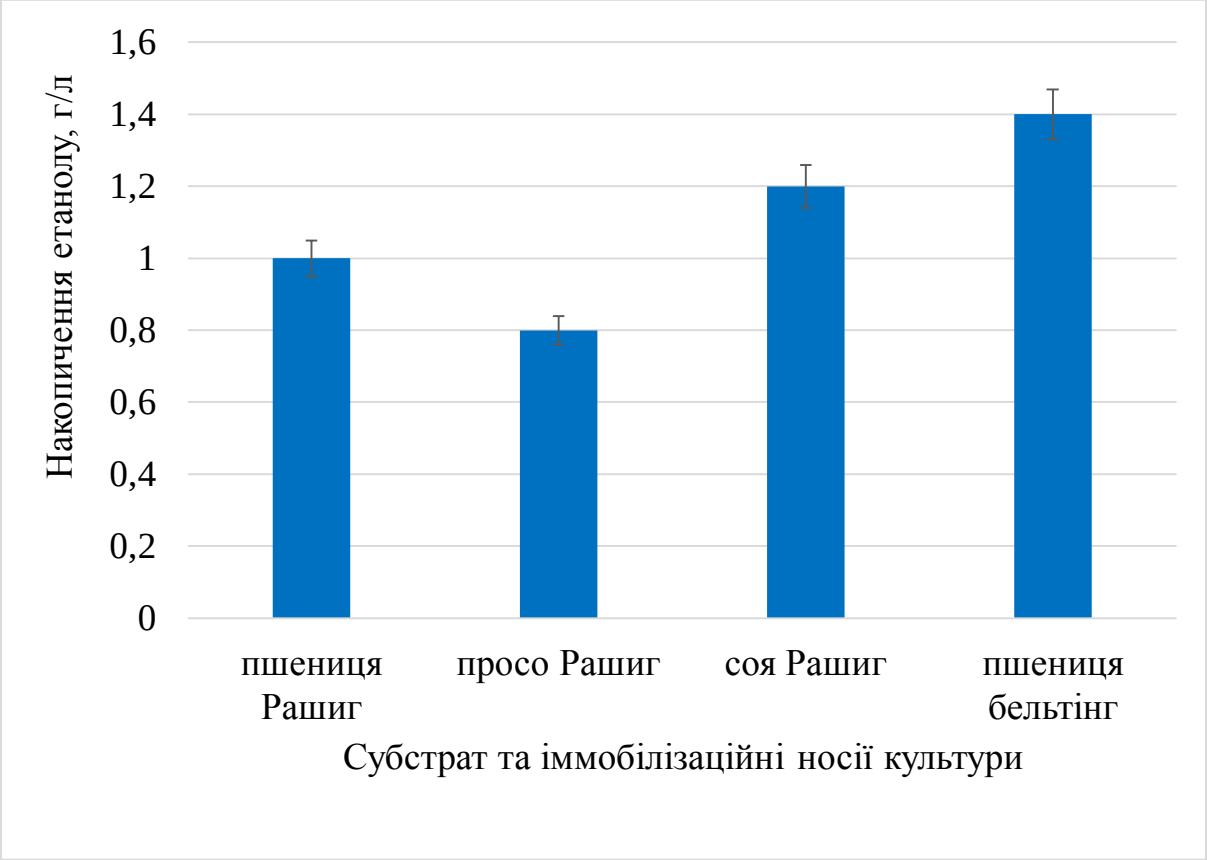


Рис. 5.5 Накопичення етанолу іммобілізованою культурою на лігноцелюлозних субстратах

Найбільше накопичення етанолу було за використання іммобілізованих клітин на бельтингу та за культивування на подрібненій соломі пшениці – 1,4 г/л.

5.2 Спільне культивування

Збільшення виходу бутанолу можливе й у процесі спільного культивування із бактеріями інших видів (Sharma et al. 2023). Спільне культивування, за умови ефективно підібраних партнерів, давало можливість підвищити швидкість та глибину гідролізу субстрату, прискорити біосинтез ензимів, збільшити їхню активність та прискорити утворення метаболітів (Li et al. 2024). Проведено культивування *S. graminifolii* та *Clostridium* sp. UCM B-7570 продовж 36 годин, що є показовим для статистичного дизайну сокультивування (Kumar et al. 2024). Дослідження проводились на нативній біомасі, зі спільним внесенням двох видів одночасно та за попереднього культивування *S. graminifolii* продовж 72 год. Отримані результати показано на рис. 5.6.

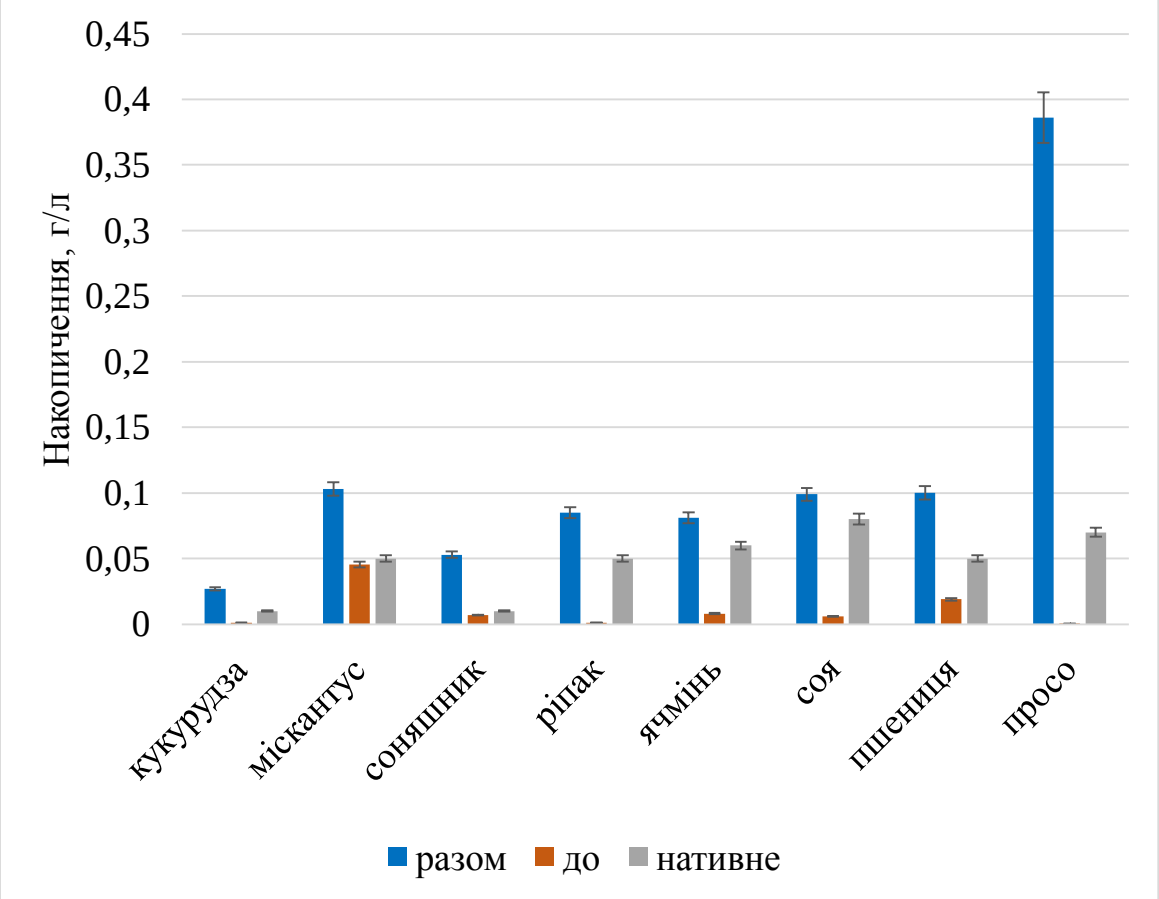


Рис. 5.6 Накопичення бутанолу за сумісного культивування *S. graminifolii* та *Clostridium* sp. UCM B-7570 протягом 36 годин

Отримані дані показали, що вирощування *S. graminifolii* на всіх видах незернової рослинної біомаси до інокулювання середовища *Clostridium* sp. UCM B-7570 знижувало накопичення бутанолу. Це може бути обумовлення використанням стрептоміцетами розщеплених цукрів для власного споживання та нарощування біомаси. 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 незерновою біомасою рослин. Відмічено, що найбільше зростання накопичення цільового продукту у 5,5 разів було за використання проса як субстрату. Використання мікробних систем з раціоанальним поєднанням різних мікроорганізмів та використання метаболічної синергії культур (Jawad et al., 2024), може, у свою чергу мати значні переваги для перетворення складних лігноцелюлозних субстратів (Feng et al., 2024). Вже було продемонстровано (Brown et al., 2023; Rodriguez et al., 2023) перспективність використання систем спільного вирощування нижчих грибів та продуцентів бутанолу. Проведено спільне культивування *Clostridium* sp. UCM B-7570 та *A. awamori* UCM F-100017, *A. niger* IFBG 4, *A. oryzae* IFBG 49-B в порівняні з нативною сировиною та з додаванням 5 г/л масляної кислоти на початку ферментації (табл. 5.1).

Результати дослідження показали значне підвищення акумулювання бутанолу в культуральній рідині порівняно з середовищем з нативною незерновою біомасою рослин. Відмічено, що за використання *A. awamori* UCM F-100017 та біомаси пшениці накопичення бутанолу є більшим за використання попередників синтезу – масляну кислоту. Показано, що найбільше накопичення мало місце за використання біомаси ріпаку та масляної кислоти – 7,15 г/л. Отже, стратегія спільного культивування дозволяє використовувати дешевший субстрат, підтримує ріст *Clostridium* без будь-якої анаеробної обробки та покращує кінцевий вихід бутанолу.

Таблиця. 5.1

Накопичення бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 за спільного культивування з нижчими грибами *A. awamori* UCM F-100017, *A. niger* IFBG 4, *A. orizae* IFBG 49-B

Сировина	Накопичення бутанолу, г/л				
	Нативна	З додаванням масляної кислоти	*A. awamori* UCM F-100017	*A. niger* IFBG 4	*A. orizae* IFBG 49-B
Соя	0,8±0,2	4,41±0,1*	1,7±0,03	1,33±0,5	1,6±0,2
Ріпак	0,7±0,5	7,15±0,5*	1,9±0,2	1,39±0,2	1,6±0,1
Пшениця	0,5±0,1	3,65±0,2*	3,9±0,2*	1,47±0,1*	1,3±0,5

* – $P<0,05$

5.3 Вплив стресових факторів на функціонування клітин *Clostridium* sp. та АВЕ-ферментацію

Оптимізація умов культивування продуцентів при використанні різних субстратів є одним із етапів в процесі підвищення накопичення цільового продукту (Zborowska et al., 2021). Для активізації внутрішніх процесів в клітинах створюють стресові умови для культури, які обумовлюються використанням лімітованого внесення в культиваційне середовища репресорів росту та розвитку (Luo et al., 2021). Дія стресових факторів може призводити до збільшення концентрації бутанолу, зміни метаболічного шляху цільового продукту та підвищення стійкості до сполук-інгібіторів, що пригнічують ріст клітин і утворення продуктів АБЕ ферментації (Foulquier et al., 2022). Фурфурол є однією з таких речовин, яка має інгібуючий вплив в процесі АБЕ ферментації (Gong et al., 2023). Нами було вивчено вплив фурфуролу на накопичення бутанолу продуцентом *Clostridium* sp. UCM B-7570 за використання біомаси ріпаку як субстрату (рис 5.7).

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.

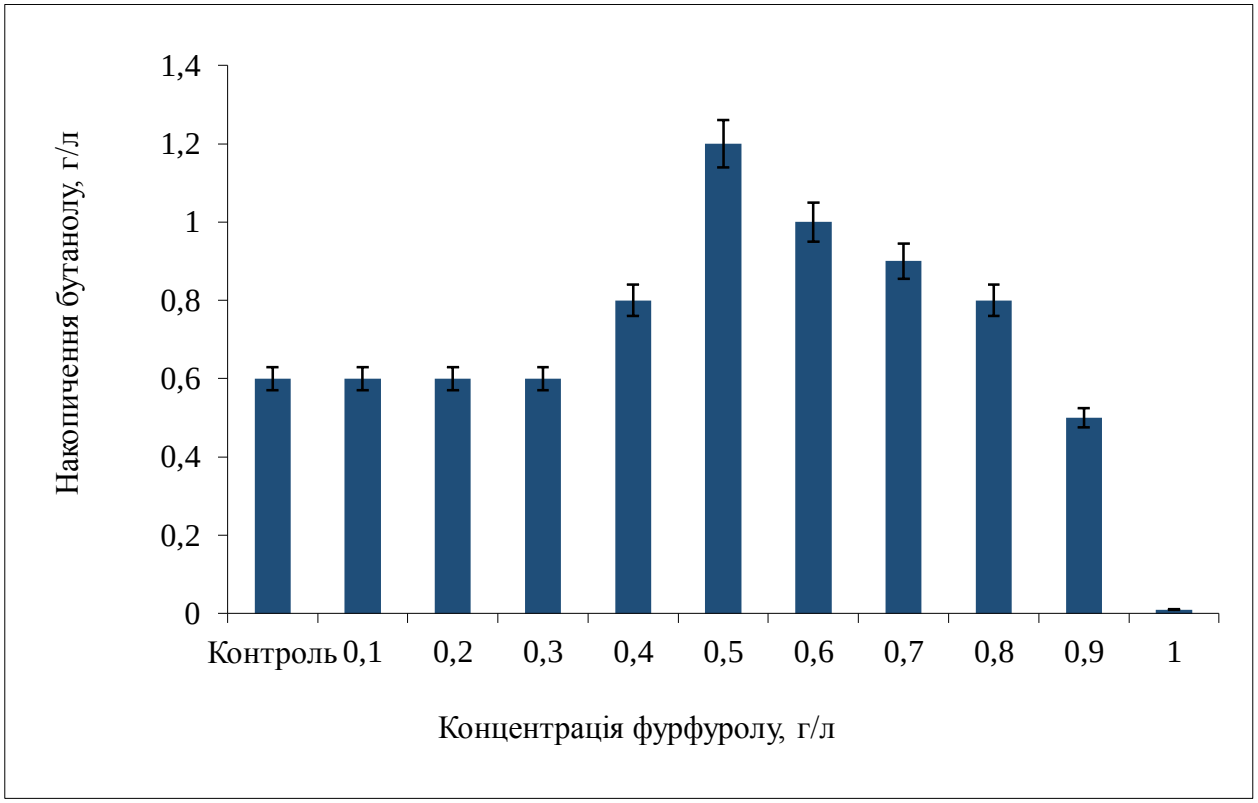


Рис. 5.7 Вплив концентрації фурфуролу на накопичення бутанолу продуцентом *Clostridium* sp. UCM B-7570

Стимулюючий вплив фурфуролу на ріст клітин та солвентогенез пов'язаний з підсиленою регенерацією нікотинаміддинуклеотиду ($НАД^+$), що прискорює окисну стадію (від гліцеральдегід-3-фосфат до 1,3-бісфосфогліцерату) гліколітичного шляху і, в кінцевому рахунку, збільшує гліколіз (Ujor et al., 2016).

За такою ж схемою фурфурол впливає на нікотинаміддинуклеотидфосфат (НАДФН), який відіграє ключову роль в переході від ацето- до солвентогенезу (Tigunova et al., 2013). Підвищення концентрації фурфуролу до 1 г/л інгібувало ріст та розвиток культури та, як наслідок, спричиняло зменшення накопичення бутанолу до 0,1 г/л. Отримані дані корелюють з результатами роботи (Zhang et

al., 2012), в якій показано, що сублетальні дози фурфуролу ≤2 г/л стимулююче впливали на солвентогенез *Clostridium*, що призводило до посилення бродіння та накопичення бутанолу. В іншій роботі (Qureshi et al., 2012) отримано результати, які показали підвищення накопичення біомаси, але не було відмічено вплив на солвентогенез.

Цинк є іншим стресовим фактором, що приводить до затримки росту мікроорганізмів, особливо у формі солей – сульфатів та хлоридів (Molnar-Nagy et al., 2022). Досліджено вплив різної концентрації $ZnSO_4$ на накопичення бутанолу (рис. 5.8).

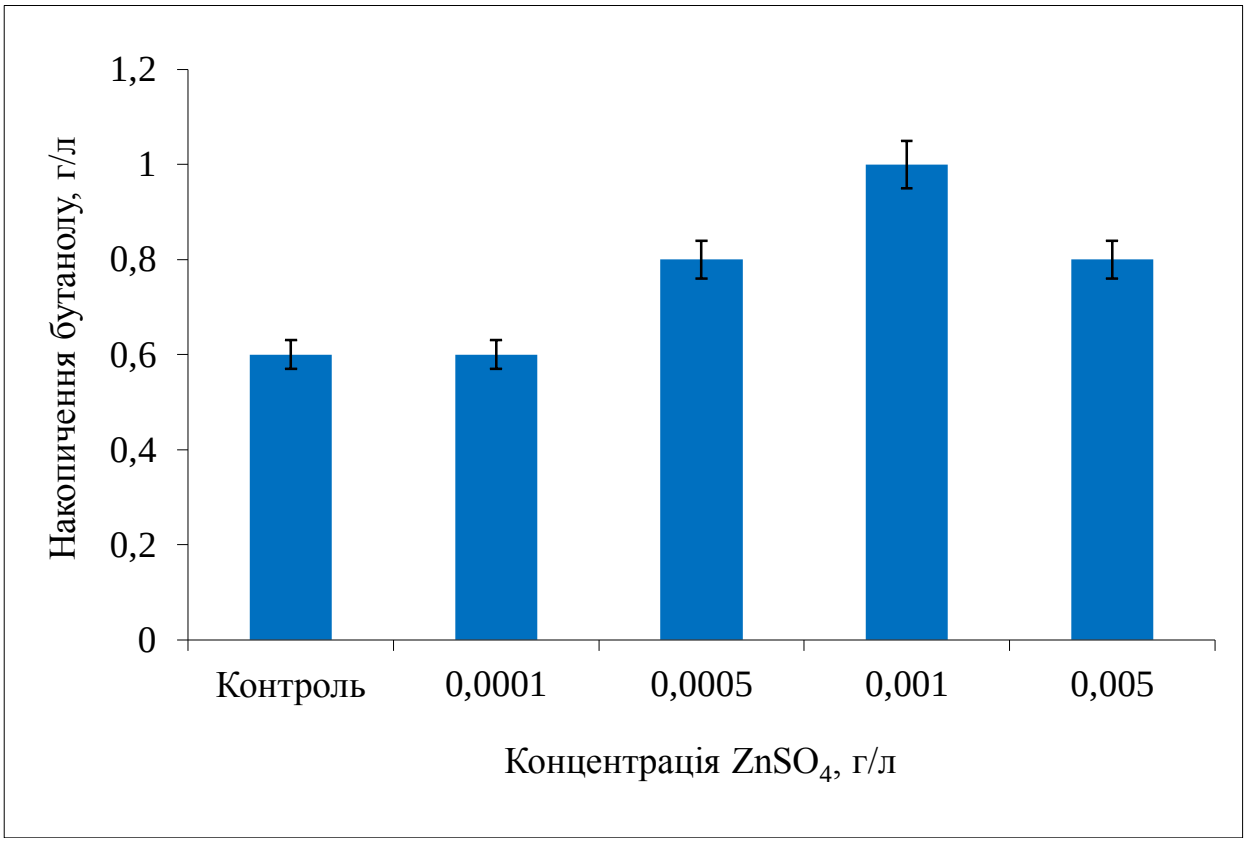


Рис. 5.8 Вплив концентрації $ZnSO_4$ на накопичення бутанолу культурою *Clostridium* sp. UCM B-7570

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 $ZnSO_4$ у ензиматичному

середовищі до 0,005 г/л призводило до зменшення накопичення бутанолу. Такі результати обумовлені токсичністю солей цинку для клітин. У роботі (Wu et al., 2019) було показано, що використання низьких концентрацій цинку приводило до підвищення накопичення біомаси, помірного збільшення накопичення продуктів АБЕ ферментації та продуктивності культури. Використання концентрацій цинку приводило до раннього початку солвентогенеза, який можна пояснити наявністю у клостридій Zn-залежних доменів активації ферментів, наприклад, алкогольдегідрогенази (Cho et al., 2019). Ці домени відіграють ключову роль в регуляції внутрішньоклітинного метаболізму, що опосередковано змінює гліколітичний потік, який стабілізує бутанолдегідрогеназу та ініціює переключення ацидогенезу до накопичення продуктів АБЕ ферментації (Li et al., 2018). Підвищення кінцевої концентрації бутанолу за рахунок додавання солей цинку було показано в роботі (Mukherjee et al., 2019), що індукувало підвищене використання глюкози, ранню продукцію бутанолу та знижувало накопичення етанолу. Зміна цих фенотипових ознак організму була пов’язана з багаторівневою модуляцією центрального метаболізму вуглецю та можливою активацією гліколітичного шляху; підвищенням активності тіолази та ключових проміжних ферментів для біосинтезу кислот і продуктів АБЕ ферментації; підвищенням активності бутирилальдегіддегідрогенази та бутанолдегідрогенази, ферментів, відповідальних за біосинтез бутанолу, зниженням регуляції алкогольдегідрогенази, перенаправленням потоку вуглецю з виробництва етанолу на виробництво бутанолу.

Важливу роль в накопиченні цільового продукту відіграє не лише склад культурального середовища, а й якість інокуляту, яка в першу чергу залежить від складу (Capilla et al., 2024). 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, в біохімії катаболізму гліцеролу (Agu et al., 2019). Присутність гліцеролу в інокуляційному середовищі підвищує

внутрішньоклітинне надходження АТФ та зменшує еквіваленти НАДФН, які є критичними для росту та розвитку культури (Agyeman-Duah et al., 2022). Було досліджено вплив різного співвідношення гліцеролу та глюкози у інокуляційному середовищі на накопичення бутанолу в ензиматичному середовищі (рис. 5.9).

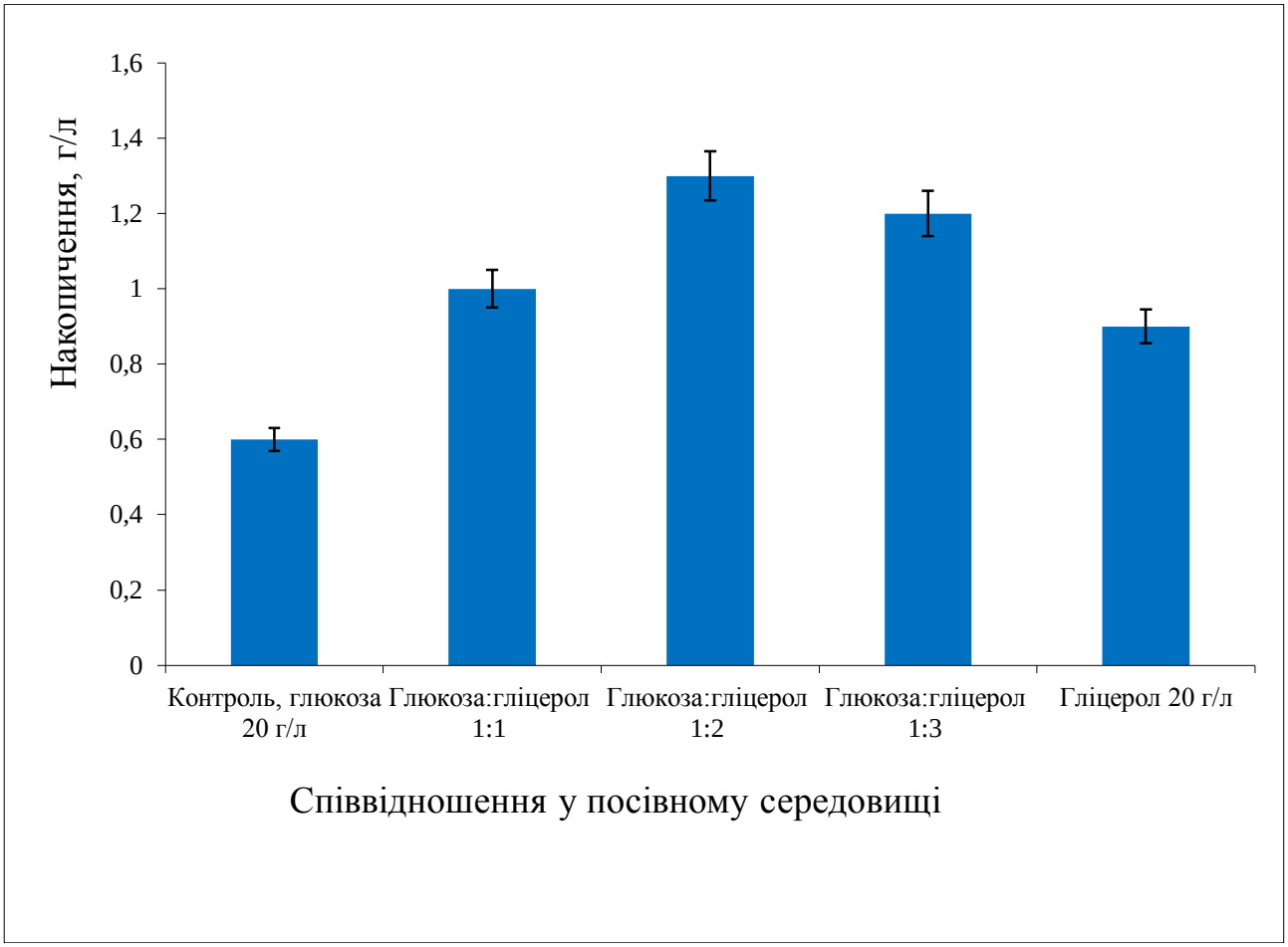


Рис. 5.9 Вплив співвідношення глюкози та гліцеролу на накопичення бутанолу культурою *Clostridium* sp. UCM B-7570 в ензиматичному середовищі

На рис. 5.9 видно, що 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. У роботі (Jiang et al., 2021)

показано, що в порівнянні з молярним еквівалентом глюкози, використання гліцеролу генерує два додаткових моля НАДН і АТФ під час АБЕ ферментації в середовищі глюкоза + гліцерол (молярне співвідношення 1:2), у порівнянні з культивуванням продуцентів лише на середовищі з глюкозою. Культури, вирощені в середовищі суміші глюкози та гліцеролу, демонстрували вищі внутрішньоклітинні рівні НАДН і НАДФН, ніж ті, що культивували тільки в середовищі глюкози. Метаболізм гліцеролу може опосередковано генерувати НАДФН, що, ймовірно, пояснює внутрішньоклітинне підвищення рівня НАДФН у культурах, які культивували в середовищі гліцеролу (Arbter et al., 2021).

Алопуринол (4-гідроксипіразоло-(3,4-D)-піримідин), аналог гіпоксантину та інгібітор НАДФН-генеруючої ксантиндегідрогенази, використовували як стресовий фактор в роботі (Saqr et al., 2021). *In vivo* алопуринол метаболізується до оксипуринолу (4,6-дигідроксипіразоло-(3,4-D)-піримідину), який конкурентно пригнічує ксантиндегідрогеназу (Agu et al., 2018). Нами було проведено дослідження впливу різних концентрацій алопурінолу на накопичення бутанолу культурою *Clostridium* sp. UCM B-7570 (рис. 5.10).

На рис. 5.10 видно, що низькі концентрації алопуринолу не впливали на накопичення бутанолу. При підвищенні концентрації алопуринолу накопичення бутанолу зростало. Найбільше накопичення бутанолу (0,8 г/л) було за концентрації 0,025 г/л алопуринолу у середовищі. Подальше збільшення концентрації алопуринолу призводило до зменшення накопичення бутанолу. Отримані дані корелюють з результатами досліджень (Ujor et al., 2016), в яких додавання алопуринолу до середовища під час АБЕ ферментації призводило до помітного збільшення продукування бутанолу з відповідним збільшенням швидкості росту клітин. Додавання алопуринолу в середовище росту пом’якшувало токсичну дію налідиксової кислоти (антибіотика), що пошкоджує ДНК та викликало 2,4- та 6,7-кратне підвищення рівнів ксантину та мРНК гіпоксантинфосфорибозилтрансферази.

Клостридії – анаеробні бактерії, які не можуть використовувати кисень та гинуть у середовищі, насиченому киснем. Деякі представники цієї родини

можуть споживати кисень у кількості, пропорційній об’єму інокуляту (Yao et al., 2022), що обумовлено активністю НАДН-оксидази та НАДФН-оксидази.

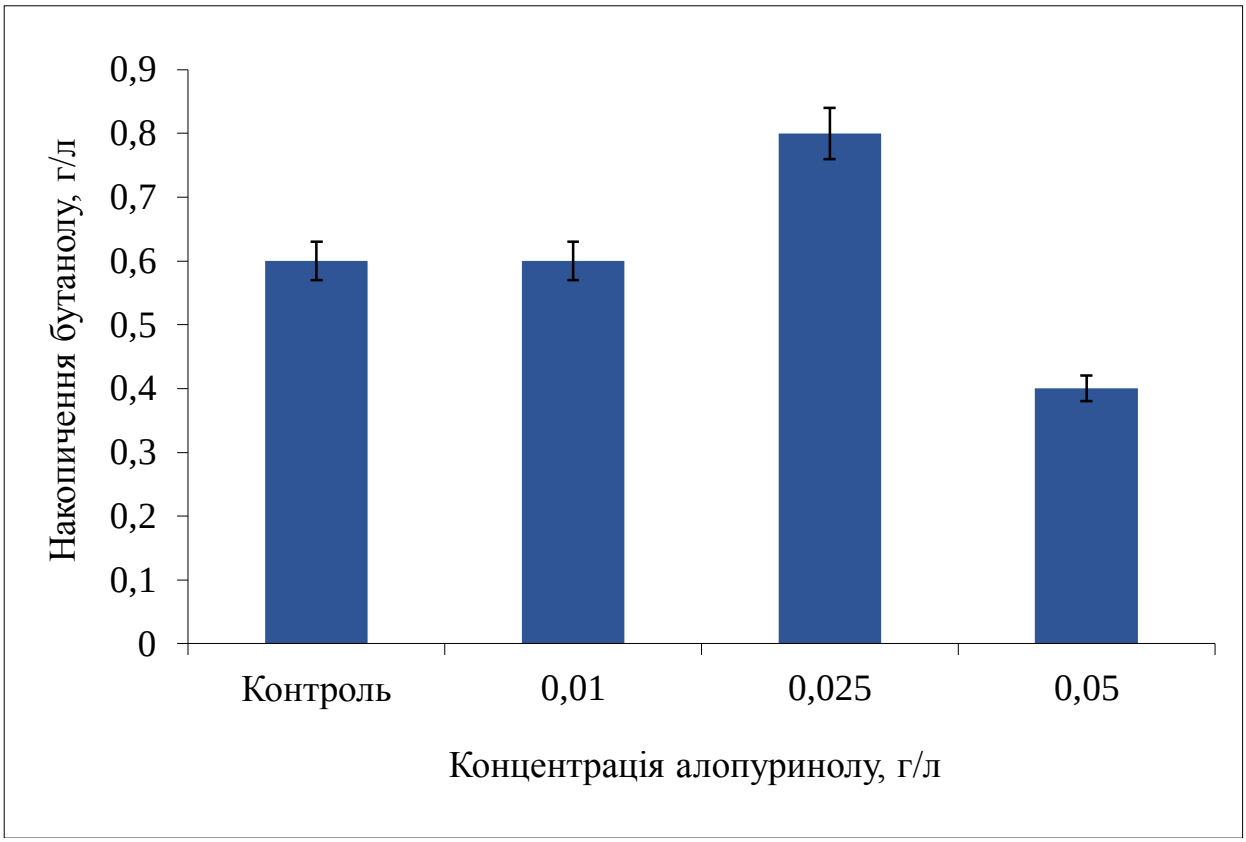


Рис. 5.10 Вплив концентрації алопуринолу на накопичення бутанолу культурою *Clostridium* sp. UCM B-7570

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. Нами було досліджено вплив швидкості перемішування культуральної рідини на накопичення бутанолу (рис. 5.11.). З даних рис 5.11 видно, що накопичення бутанолу зростало пропорційно підвищенню швидкості перемішування з 50 до 100 об/хв. Найбільше накопичення (1,5 г/л) бутанолу відмічено за швидкості перемішування 100 об/хв. Збільшення швидкості перемішування до 110-130 об/хв призводило до зниження рівнів 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.

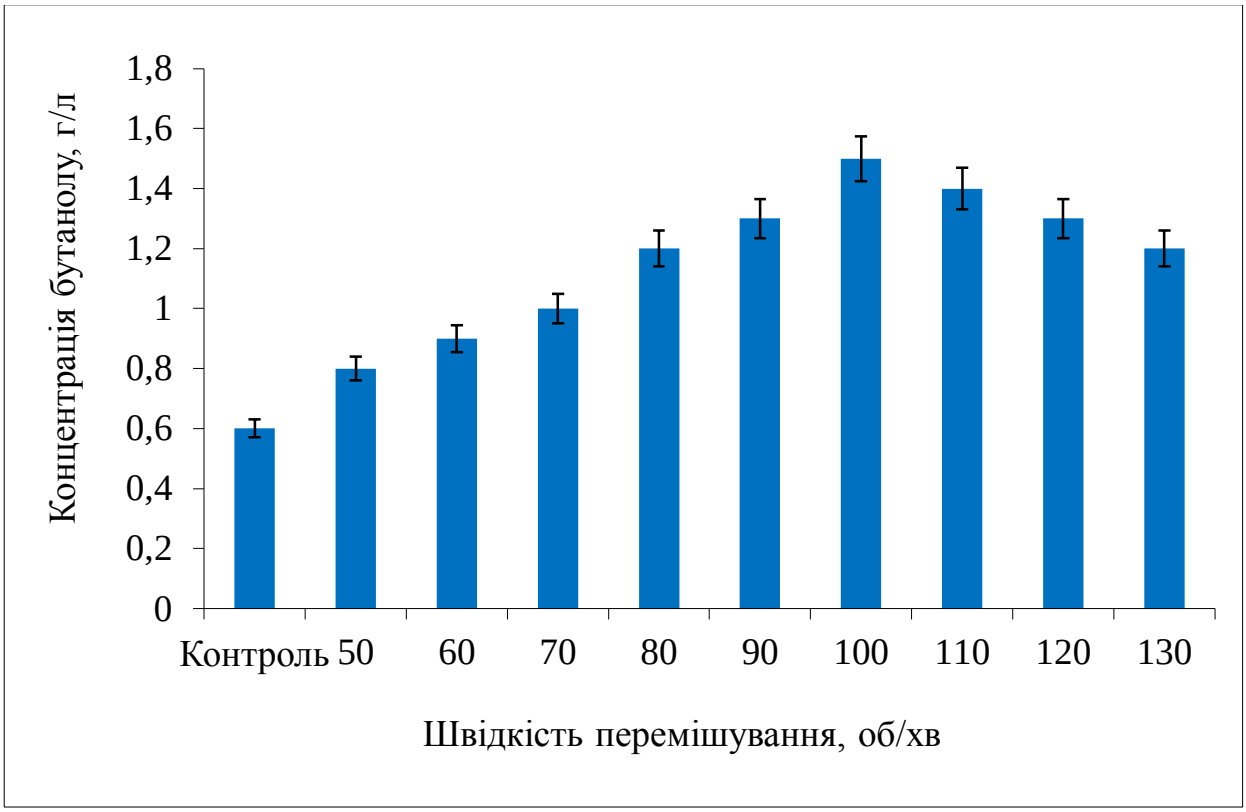


Рис. 5.11 Вплив швидкості перемішування на концентрацію бутанолу культурою *Clostridium* sp. UCM B-7570

У роботі (Li et al., 2020) було показано зупинку росту культури *C. butyricum* в аеробних умовах до повного використання кисню у середовищі, але згодом культура відновлювала швидкість росту і накопичення продуктів АБЕ ферментації. Це свідчить про те, що *in vivo* не відбувається окисного пошкодження, пов'язаного з відновленням кисню. Було проведено цитологічні дослідження, як культури контролю, так і культури після впливу стресових факторів (рис 5.12).

Показано, що за порівняння характеристик культури контролю та після впливу будь-якого зі стресових факторів видно вкорочення довжини клітин, збільшення накопичення всередині гранульози (має темне забарвлення на

рисунку) та зниження кількості паличок в полі зору. Отримані результати можна пояснити цитоекологічним змінами, що опосередковано підтверджуються зміною концентрації бутанолу (як механізм відповіді) в культуральному середовищі.

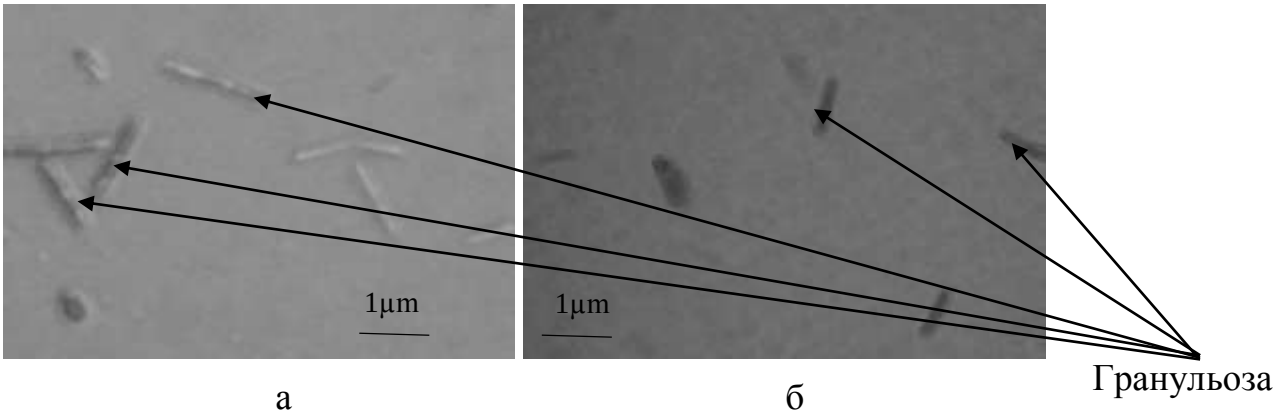


Рис. 5.12 Морфологічні зміни культури *Clostridium* sp. UCM B-7570 (а – контроль, б – за стресових факторів), збільшення 1800

Показано, що концентрація бутанолу в порівнянні з контролем (0,6 г/л) була найвищою (1,2 г/л) за умов додавання 0,5 г/л фурфуролу в інкубаційне середовище. Використання $ZnSO_4$ в низькій концентрації (0,001 г/л) призводило до підвищення концентрації бутанолу (1,1 г/л), а найвищу концентрацію бутанолу (1,3 г/л) було отримано при використанні глюкози та гліцеролу як джерел вуглецю у співвідношенні 1:3. Концентрація бутанолу у культуральному середовищі підвищилась до 0,8 г/л за умов додавання 0,025 г/л алопуринолу. Найбільшу концентрацію бутанолу (1,5 г/л) було отримано за використання перемішування середовища (опосередковано об’єм розчиненого кисню) зі швидкістю 100 об/хв. 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 в їх комбінації для підвищення рівня накопичення цільового продукту. Показано, що підвищення накопичення продуктів АБЕ ферментації можливе за використання внутрішньої здатності мікроорганізмів адаптуватися до стресових умов.

5.4 Ліофілізація штамів-продуцентів

Зберігання на штучних поживних середовищах може призводити до швидкого висихання, відмирання мікроорганізмів та зниження або втрати фізіологічних та ферментативних властивостей. Для «консервування» матеріалів біологічного походження, широке застосування одержав метод ліофільного висушування (Merivaara et al., 2021). Шляхом підбору і використання кріопротекторів – захисних середовищ різного складу можна запобігти негативному впливу евтектичних концентрацій при заморожуванні і ліофільному висушуванні мікроорганізми (Ramachandran et al., 2024). Досліджено вплив захисного середовища (глюкози і цукрози) на гідрофільність бактеріальних суспензій після ліофілізації в залежності від їх концентрації. Для зберігання культур *Clostridium acetobutylicum* UCM B-7407 (IFBG C6H) та *Clostridium* sp. UCM B-7570 (IFBG C6H 5M) було використано метод ліофілізації (рис. 5.13). Для підготовки культур до ліофілізації було досліджено вплив захисного середовища на гідрофільність бактеріальних суспензій після ліофілізації в залежності від концентрації в них глюкози і цукрози. Результати досліджень наведено в табл. 5.2.

З даних таблиці 5.2. видно, як змінювалась залишкова вологість кінцевого матеріалу в залежності від вуглеводів і їх концентрації за одних і тих же умов ліофілізації. При використанні глюкози та цукрози в кількості 10 %, одержали найнижчі показники залишкової вологості 2,0. Для подальшої роботи з підбору захисного середовища для ліофілізації штамів-продуцентів бутанолу було обрано цукрозу як гідрофільний компонент в концентрації 10 %. За результатами досліджень оптимізовано склад захисного середовища, яке містило наступні

компоненти (%): глюкоза – 10,0; желатоза – 10,0; агар – 0,02.



Рис. 5.13 Ліофілізація культури *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *Clostridium* sp. UCM B-7570 у ліофільній сушарці

Важливими для ліофільно висушених зразків є термін і температура зберігання. Для визначення терміну зберігання без значної втрати життєздатності і фізіологічної активності після ліофілізації, необхідно бактеріальні клітин вивести з анабіотичного стану. Якщо не забезпечити оптимальних умов виведення клітин з анабіозу, то одержані дані про життєздатність мікроорганізму будуть занижені.

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». Між температурою зберігання ліофілізованих мікроорганізмів протягом одного місяця і продуктивністю спостерігалась залежність (рис. 5.14).

Таблиця 5.2

Порівняльна гідрофільність суспензії *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *Clostridium* sp. UCM B-7570 *у* залежності від концентрації глюкози та цукрози в середовищі

Штами	Залишкова вологість за використання захисного середовища					
	з глюкозою, %			з цукрозою, %		
	1	10	30	1	10	30
UCM B-7407	18,6±0,7	3,0±0,1	45,4±1,8	18,1±0,7	2,0±0,1	48,3±1,7
UCM B-7570	18,0±0,7	2,6±0,1	43,2±1,7	17,9±0,7	1,7±0,1	50,4±1,9

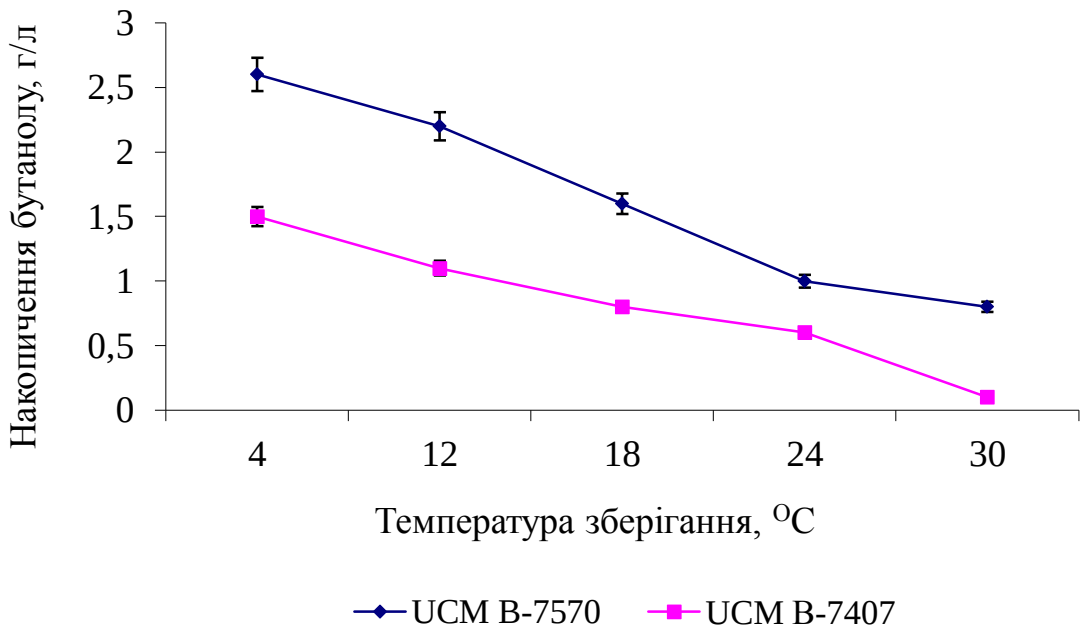


Рис. 5.14 Залежність накопичення бутанолу від температури зберігання ліофілізованих бактерій

За зберігання зразків ліофілізованих бактерій протягом одного місяця за

температури 4 °С кількість біологічна активність клітин не зменшувалась, а з підвищенням температури зберігання поступово знижувалась і за температури 30 °С втрачалося 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 при зберіганні за температури 4 °С протягом півроку не впливало на активність культури (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

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

Пересіви	Технологічні показники		
	pH, 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

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). Оптимізовано склад захисного середовища (%, сахароза – 10,0; желатина – 10,0; агар – 0,02) при проведенні ліофільного висушування штамів-продуцентів бутанолу. Визначено, що зберігання зразків ліофілізованих культур протягом шести місяців за температури 4 °С не впливало на продуктивність штамів.

Проведена іммобілізація клітин культури *C. acetobutylicum* UCM B-7407 на кільцях Рашига, смужках бельтингу та феритових кільцях як носіях показала, що усі носії мали високу адгезивну активність щодо культури. Визначено, що за використання кілець Рашига, як носія для іммобілізації клітин *C. acetobutylicum* UCM B-7407, накопичення бутанолу збільшувалось в 2 рази (з 5,8 до 11 г/л, відповідно).

Показано перспективу використання спільного культивування клостридій як методу зі збільшення продукції бутанолу. 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.

Показано використання адаптивного стресу для підвищення накопичення біобутанолу за рахунок зміни метаболічних шляхів у клітинах мікроорганізмів, опосередковано через дію стресових факторів. Визначено, що підвищення накопичення продуктів АБЕ ферментації можливе за використання внутрішньої здатності мікроорганізмів адаптуватися до стресових умов. Можливо також використовувати стресові фактори і в їх комбінації для підвищення рівня накопичення цільового продукту.

Потреба в способах довготривалого збереження мікроорганізмів та різного матеріалу біологічного походження виникла ще на початку розвитку мікробіологічної науки. У нашій роботі оптимізовано склад захисного середовища, що дає можливість зберігати штами з мінімальною деградацією.

Основні результати даного розділу опубліковані в роботах:

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-подуцентівбутанолу у процесі зберігання. *Сорго цукрове (Sorgum saccharatum (L.) Moench) в Україні: біологія, генотипове*

різноманіття, продуктивність та перспективи використання на біопаливо. Київ. Ліра-К. (с. 59-92)

2. Шульга, С.М., **Тігунова, О.О.,** Братишко, В.В., та Блюм, Я.Б. (2024). *Біобутанол. Продуценти, субстрати, культивування та відновлення.* Київ: Наукова думка. doi: 10.15407/978-966-00-1918-8.

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 **Q4**

4. **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.

5. **Тігунова, О.О.,** Братішко, В.В., Прийомов, С.Г., та Шульга, С.М. (2021). *Біобутанол – перспектива альтернативної енергетики.* Матеріали Всеукраїнської 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» Київ. 97-99

6. **Тігунова, О.О.,** Рахметов, Д.Б., Андріяш, Г.С., та Шульга, С.М. (2021). *Вплив температури зберігання на накопичення бутанолу ліофілізованим штамом-продуцентом*. Матеріали XXII міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI столітті». Київ. 913-915

7. Захарова, О.Г., Андріяш, Г.С., та **Тігунова, О.О.** (2020). *Виділення стрептоміцетів з грунтів різних регіонів України.* Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна Київ. 147.

8. **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. *The open agriculture journal*, 14, 187-197. doi: 10.2174/1874331502014010187 **Q4**

9. 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.

10.**Tigunova, O.O.,** Beiko, N. E., Andriash, H.S., 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

11.**Tigunova, O.O.,** Beiko, N. E., Andriash, H.S., Pryiomov, 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

12.**Тігунова, О.О.,** Андріяш, Г. С., Забейда, О. Ф., та Круподьорова, Т. А. (2017). *Біоконверсія вищимі грибами лігноцелюлозної сировини для отримання біобутанолу*. Матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття». Київ 133.

13.**Тігунова, О.О.,** Андріяш, Г. С., Круподьорова, Т. А., Забейда, О. Ф., та Рахметов, Д.Б. (2016). *Біоконверсія дротовидного проса вищіми грибами.* Матеріали XIII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів». Київ. 108-110.

14.**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

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Дослідження потенціалу *Clostridium pasteurianum* у круговій біоекономіці показує кілька викликів і можливостей, що відкриває шлях для майбутніх досліджень та інновацій. Країни з розвиненим промисловим виробництвом потребують значної кількості енергоресурсів, водночас забезпеченість ними у кожній країні різна (Samadi et al., 2023). Більшість країн, зокрема й Україна, імпортують енергоносії (Luschini et al., 2024). З метою зменшення залежності від імпортних енергоносіїв здійснюється пошук відновлюваних джерел енергії (Marouani et al., 2023). Сьогодні більш як 50 країн законодавчо підтримують розвиток відновлюваних джерел енергії, шукаючи альтернативи традиційному паливу, однією з яких є біологічні види палива (далі — біопаливо), отримані шляхом переробки органічної сировини (Malik et al., 2024). Це, зокрема біогаз, біоетанол, біобутанол та дизельне біопаливо (Ye et al., 2024). Загалом Україна має досить високий потенціал для виробництва альтернативних видів рідкого палива (Trypolska, 2024). Важливо, що у сфері отримання альтернативного транспортного палива виключно з вітчизняної сировини, установи НАН України мають необхідний науковий потенціал, багаторічний досвід досліджень, а також перспективні технологічні розробки.

Так, в НАН України свого часу було розроблено концепцію програм, спрямованих на диверсифікацію джерел енергії, використання потенціалу аграрного виробництва та переробної промисловості шляхом запровадження та використання біотехнологій, технологій переробки органічної сировини, взокрема побутових і промислових відходів (Блюм та ін., 2010). У рамках взаємопов’язаних цільової комплексної науково-технічної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії» (2013-2017 рр.) та цільової програми наукових досліджень НАН України «Біопаливні ресурси і біоенергетика» (2018-2022 рр.) було передбачено вирішення комплексу проблем: від розроблення сучасних методів поліпшення біомаси як вихідної сировини для отримання різних видів біопалива

до розроблення та удосконалення науково-технологічних процесів їх виробництва у подальшому. Ряд міністерств України також започаткували наукові дослідження і розробки в галузі біоенергетики, зокрема Міністерство освіти і науки України. Національний університет біоресурсів і природокористування України, розпочав дослідження з використання лігноцелюлозної біосировини для отримання біопалива другого покоління. Роботи фінансуються за рахунок зовнішнього інструменту допомоги Європейського Союзу для виконання зобов'язань України у Рамковій програмі Європейського Союзу з наукових досліджень та інновацій «Горизонт 2020».

Всі ці заходи спрямовано на виконання певних зобов'язань, які Україна взяла на себе у сфері запобігання змінам клімату: в 2016 р. ратифікувала Паризьку угоду; у 2020 р. підтримала Європейський зелений курс; брала участь у конференції ООН з питань зміни клімату, яка відбулася 31 жовтня 2021 р. у Глазго. Такі документи як рішення РНБО України «Про виклики і загрози національній безпеці України в екологічній сфері та першочергові заходи щодо їх нейтралізації» та відповідні Постанови Уряду України передбачають створення стратегії низьковуглецевого розвитку України на період до 2050 р. і концепції Державної науково-технічної програми у сфері зміни клімату.

Біобутанол відкриває суттєві перспективи як замінник транспортного пального (Karimi et al., 2024). Головна перевага біобутанолу (перед іншим рідким альтернативним паливом) полягає в тому, що він є чистим спиртом з більш довгим вуглеводневим ланцюгом (Munoz-Munoz & Lopez-Galan, 2024). Це робить його неполярним, з енергетичним вмістом, подібним бензину і, отже, може безпосередньо використовуватися як пальне в існуючих двигунах внутрішнього згоряння в змішаному або чистому вигляді (Jayaraman et al., 2024). Ще одна перевага біобутанолу полягає в тому, що його горіння відбувається за постійної температури і тиску, оскільки це однокомпонентне паливо (Olson et al., 2023). Це відрізняє його від бензину, оскільки останній складається з багатьох різних компонентів і має інтервал температури горіння і, відповідно, тиску, що призводить до неповного його згоряння, і як результат, забруднення

навколишнього середовища викидами та зниження потужності двигуна (Kluczyk, 2024). Незалежно від способу виробництва (біомаса або викопне паливо), властивості біобутанолу залишаються такими самими, на відміну від інших альтернативних джерел енергії (Malik et al., 2024), що робить непотрібним зберігання бутанолу в резервуарах під високим тиском як природного газу. Його можна змішувати (10–100 %) з будь-яким викопним паливом, а також транспортувати через наявні трубопроводи постачання (Shang et al., 2024).

Бутанол можна виробляти з відновлюваних джерел шляхом АБЕ ферментації для створення біобутанолу або з викопного палива для отримання петробутанолу (Dawi & Uthman, 2024). Незважаючи на подібні хімічні властивості цих двох форм бутанолу, виходу на ринок біобутанолу все ще перешкоджають високі витрати на його виробництво, порівняно з витратами на нафтобутанол. У роботі висвітлено історію промислового виробництва бутанолу та останні досягнення у виробництві бутанолу шляхом АБЕ-ферментації з виділенням кількох нових підходів. Ці підходи базуються на пошуку невичерпних і низьковартісних субстратів і оптимізації процесів на початку та в кінці технологічного ланцюга. Оскільки виробництво бутанолу за допомогою АБЕ-ферментації складається з кількох критичних етапів, у цій роботі висвітлено чотири основних:

1) вибір вихідної сировини,

2) попередня підготовка сировини,

3) вибір або створення продуцентів,

4) культивування.

При цьому в роботі узагальнено останні досягнення, а також наведено нові виклики та потенційні шляхи дослідження. Низький вихід бутанолу та токсичність кінцевого продукту залишаються основними недоліками класичного виробництва бутанолу шляхом АБЕ-ферментації (Duran-Aranguren et al., 2024). Для успішного виробництва біобутанолу необхідно розглянути низку критичних питань, таких як: розробка клостридіальних і неклостридіальних продуцентів, інноваційних методів відновлення, пошук інтегрованих з процесом АБЕ-

ферментації. У роботі розглянуто метаболічні шляхи синтезу бутанолу мікроорганізмами та їх регулювання, найбільш перспективні штами-продуценти для промислового виробництва та методи підвищення їхної продуктивності, умови культивування та вибір оптимальних технологічних параметрів, культивування. Зроблено спробу підсумувати різні аспекти останніх досліджень та розробок, зокрема авторські дослідження у галузі ефективного виробництва біобутанолу.

Основний чинник, що впливає на економіку виробництва біобутанолу є вартість і наявність сировини (Sampaio et al., 2024). Прийняття та визнання користувачами біобутанолу як нейтрального палива та його альтернативи викопному, можуть суттєво мотивувати сільське господарство та промисловість. Результатом може стати нова державна політика, що підтримує використання альтернативних джерел енергії для зниження собівартості продукції. Створення нових біопереробних заводів для невеликих міст і недостатньо розвинутих територій може започаткувати найсучасніші технології швидше, ніж традиційні практики. Хоча опубліковано чимало досліджень з різних аспектів АБЕ-бродіння, більшість їх описані для лабораторних масштабів, незначною кількістю досліджень на стендових установках або у пілотному масштабі (Rafieyan et al., 2024).

Необхідно терміново оцінити життєздатність у пілотному масштабі процесів, які було розроблено і оцінено як перспективні за лабораторних умов (Edelman et al., 2024). Розробка економічної та ефективної технології АБЕ-бродіння можлива лише завдяки спільним зусиллям мікробіологів, біотехнологів та інженерів-хіміків. Виклики, поставлені перед науковою спільнотою – це створення генетично модифікованих продуцентів з підвищеною стійкістю до продуктів АБЕ ферментації і метаболічно модифікованих штамів, здатних до використання різноманітних джерел вуглецю з отриманням більшої кількості бутанолу, а не інших побічних продуктів. Як наведено у попередніх розділах, спільне культивування клостридій, за якого відбувається одночасне оцукрювання і бродіння, дозволяє створювати технології, які за успішного

впровадження у виробництво можуть призвести до появи економічно обґрунтованої та доцільної технології отримання бутанолу. У даній роботі підсумовано результати досліджень автора щодо отримання нових штамів-продуцентів лігнолітичних бактерій роду Streptomyces, їх ідентифікації генетичними методами з подальшим вивченням характеристик та біологічних особливостей штамів, обговорюються різні шляхи біотехнологічного процесу сокультивування. Розглянуто методи з підвищення накопичення бутанолу штамами-продуцентами, показано перспективу використання сокультивування клостридій як методу зі збільшення продукції бутанолу. Показано можливість використання нехарчової сировини як субстрату для культивування, проведено порівняння різних методів попередньої підготовки сировини та їх вплив на накопичення бутанолу у культуральній рідині. Охарактеризовано проблеми зберігання штамів-продуцентів та визначено середовище для захисту мікроорганізмів під час ліофільного висушування.

З огляду на останні досягнення в галузі біотехнології та біообробки, поза сумнівом, технологія синтезу біобутанолу має підґрунтя для комерціалізації (Kasprzak, 2024). Здатність відновлюваних джерел енергії забезпечувати глобальні енергетичні потреби якщо не повністю, то значною мірою, була достатньо доведена (Orakzai et al., 2024). Що має статися зараз, щоб уможливити масштабне впровадження? Особлива увага наразі приділяється шансам комерціалізації біопалива, що забезпечує обґрунтовану оцінку різних техніко-економічних аспектів пілотного виробництва енергії в майбутньому (Satheesh et al., 2024).

Майбутнє відновлюваної енергетики буде розглядатися як критичне та авторитетне джерело для стратегічного планування розвитку відновлюваної енергетики в усьому світі. Поточний стан виробництва енергії і супутні нові напрями біологічних процесів у виробництві біопалива надають промисловості унікальну перспективу щодо розв’язання наявних чи майбутніх наукових проблем та їхніх можливих рішень, і можливість зорієнтувати біотехнологію на реалізацію сучасної концепції створення комерційного виробництва товарних

біопродуктів. Комерційне виробництво останніх у найближчому майбутньому матиме далекосяжний ефект у реалізації мети сталого перетворення відновлюваних ресурсів для задоволення енергетичних потреб людства.

Ефективне управління відходами є однією з найбільших екологічних проблем світу. Технологічний прогрес, економічний розвиток, урбанізація, зростання населення та споживчі звички значною мірою сприяють швидкому збільшенню кількості відходів, одним з яких є яблучні вичавки (Pascoalino et al., 2025). Більше того, немає ознак уповільнення цієї тенденції в найближчому майбутньому. Основним методом утилізації яблучних вичавок є їх траспортування на звалище безпосередньо в ґрунт, але існує і альтернатива – використання вичавок в кормах та використання макрокомпонентів вичавок у технологічних процесах. Яблучні вичавки можна використовувати як комплексний субстрат для мікроорганізмів, який містить багато поживних речовин необхідних для їх життєдіяльності. У дисертації представлено результати дослідження промислових відходів в процесі отримання соку з різних сортів яблук. Показано, що вичавки містили 9,0 % вологи, 2,27 % жиру, 2,37 % білка, 1,6 % золи, 84, 7% вуглеводів, 5,6 % крохмалю та 54,2 % загального цукру, а також кальцій, калій та магній.

Показано можливість комплексного використання всіх (як розчинних, так і нерозчинних) вуглеводів у яблучних вичавках для отримання бутанолу. Одержані результати дають змогу зробити висновок, що більша частина компонентів може бути використана штамами-продуцентами роду *Clostridium* у біоконверсії без попереднього гідролізу. Виняток становили лігнін та віск, які не ферментувались та пектин, клітковина і геміцелюлози, що ферментувались лише частково. Пектин після екстрагування можна використовувати у виробах харчової промисловості (Pascoalino et al., 2025). Отримані результати корелюють з роботою авторів (Azarakhsh et al., 2024), де розчинні цукри та гідролізовані кислотою або лугом цукри було об’єднано як субстрат для виробництва бутанолу штамом продуцентом *C. beijerinckii* P260.

Інші автори (Wqdrzyk et al., 2025) використовували лише розчинні цукри

вичавок. У роботі (Rebolledo-Leiva et al., 2025) автори застосували різні види попередньої обробки (автогідроліз, кислотний гідроліз, лужний гідроліз, гідроліз органічними та поверхнево-активними речовинами) вичавок з подальшим ферментативним гідролізом для розщеплення структурних вуглеводів до гідролізованих цукрів і отримання бутанолу.

У результаті наших дослідження альтернативного субстрату (яблучних вичавок) показано можливість конвертування штамами *Clostridium* sp. UCM B-7570 та *C. acetobutylicum* UCM B-7407 без гідролізу макрокомпонентів вичавок з отриманням бутанолу. Макрокомпонентний склад субстрату свідчив, що більша його частина може бути використана мікроорганізмами для накопичення цільового продукту. Показано, що штам продуцент *Clostridium* sp. UCM B-7570 в процесі культивування конвертував більший відсоток цукрів яблучних вичавок. Проведено дослідження з оптимізації параметрів культивування штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 (кількість субстрату та інокуляту) і показано, що оптимальною кількістю внесеного посівного матеріалу було 10% за якого накопичувалось 8 г/л бутанолу. Визначено, що найбільша концентрація бутанолу (10 г/л) накопичувалось за внесення 10% інокуляту і за концентрації 120 г/л субстрату. Отримані дані показують можливість використання яблучних вичавок як альтернативного субстрату в технології біобутанолу.

Альтернативним субстратом може бути лігноцелюлозна сировина, наприклад, сорго цукрове має велику кількість різноманітних сортів і гібридів, які вирощують в світі і кожен відрізняється один від одного як морфологічно (висота і діаметр стебел, форма волоті, колір зерна), так і періодом дозрівання зерна та його якістю (Xu et al., 2024).

Серцевина стебла сорго цукрового містить солодкий сік з різним складом цукрів: сахарози, глюкози та фруктози (Kansaye et al., 2023) Для мікробіологічних виробництв використовують саме сік, сироп або багасу сорго цукрового (Ruperao et al., 2023). Найбільш інтенсивно цукри в стеблах накопичуються після цвітіння. Максимальну кількість цукрів рослина містить в фазі воскової і повної стиглості зерна (Kugedera et al., 2023).

Інтегральним показником, який характеризує ефективність вирощування сорго цукрового на енергетичні цілі, є вихід біопалива (біоетанолу, біогазу, твердого біопалива) та вихід енергії (Nazli et al., 2024). Біоетанол отримують з використанням соку сорго цукрового в промислових масштабах (Gamayunova et al., 2022). Сік зі стебел сорго цукрового отримують переважно за допомогою вальцевого пресу (Wen et al., 2023). Отримання бутанолу з використанням сорго цукрового як сировини в основному находиться на стадії розробки (Thanapornsin et al., 2024).

Для збільшення біоконверсії лігноцелюлозної сировини її попередньо підготовлюють. Основною стадією для всіх видів лігноцелюлозної сировини є стадія подрібнення (Poveda-Giraldo & Candola Alzate, 2024). Характеристики помелу обумовлюють температурний режим водно-теплової обробки і ступінь втрат зброджувальних вуглеводів. За збільшення ступеню диспергування сировини знижувалась температура розварювання, зменшувались втрати цукру та підвищувалось накопичення продуктів АБЕ ферментації. Це пояснювалось частковим розчепленням целюлози та утворенням додаткової кількості зброджувальних цукрів (Wang et al., 2024).

За використання таких видів попередньої підготовки вихід цукрів збільшувався, зменшувалась кількість нерозчинного лігніну та підвищувався вміст целюлози, що легко розщеплювалась. Для подальшої біоконверсії проводять стадію гідролізу біомаси до пентозних або гексозних цукрів. Гідроліз, як правило, відбувається із застосуванням або лугів, або кислот, або ензимів.

У випадку ензиматичного гідролізу використовували як ензими, так і мікроорганізми, що продукують ензими. Активність ензимів залежить від температури, концентрації водних іонів, присутності активатора та інгібітора. Детальний механізм ензиматичного гідролізу лігноцелюлози до цього часу невідомий, хоча значні успіхи досягнуті у вивчені лігноцелюлолітичних генів мікроорганізмів, що беруть участь в ензиматичному гідролізі.

Ми вивчили можливість використання вітчизняних штамів продуцентів для виробництва бутанолу з різних компонентів біомаси сорго цукрового та

визначили залежність накопичення бутанолу від різних сортів сорго, які використовували як субстрат. Показано, що використання штаму *Clostridium* sp. UCM B-7570 та біомаси сорго цукрового сорту Energodar як субстрату дає можливість розпочати розробку ефективної біотехнології отримання бутанолу в порівнянні з існуючими (Avila et al., 2023).

Сучасна енергетична криза, вичерпання запасів викопного палива та глобальна зміна клімату змусили пошук альтернативних джерел енергії, які були б економічно стійкими та безпечними для навколишнього середовища. Тут ми розглядаємо різні шляхи перетворення біомаси в біоенергію, а саме бутанол. Біомасу можна перетворити на біопаливо різними методами, включаючи біохімічні та термохімічні методи перетворення. Визначення найкращого підходу залежить від типу використовуваної біомаси, бажаного кінцевого продукту та того, чи є він економічно стійким. Біохімічні методи конверсії в даний час найбільш широко використовуються для виробництва біопалива з біомаси, на них припадає приблизно 80 % усього біопалива, виробленого в усьому світі (Osman et al. 2023).

Гідроліз і біотрансформація лігноцелюлози, тобто біопереробка, може забезпечити людей біопаливом, біохімічними речовинами та матеріалами, а також є важливою технологією для вирішення кризи викопної енергії та сприяння глобальному сталому розвитку. Біопереробка включає такі етапи, як попередня обробка, оцукрювання та ферментація, і останніми роками дослідники розробили різноманітні стратегії біопереробки для оптимізації процесу та зниження витрат на процес. Гідролізати лігноцелюлози є платформами, які поєднують процес оцукрювання та подальше бродіння. Склад гідролізату тісно пов’язаний із сировиною, процесом попередньої обробки та вибором стратегій біоочищення, і забезпечує не лише поживні речовини, але й можливі інгібітори для подальшого бродіння. У цій роботі підсумовано вплив кожного етапу біопереробки лігноцелюлози на поживні речовини та можливі інгібітори, проаналізували величезні відмінності в утримуванні поживних речовин та утворенні інгібіторів між різними стратегіями біопереробки та підкреслили, що

всі етапи біопереробки лігноцелюлози необхідно розглядати комплексно, щоб досягти максимальне збереження поживних речовин і оптимальний контроль інгібіторів за низьких витрат, щоб забезпечити орієнтир для розвитку енергії біомаси та хімікатів (Wang et al 2024). Досліджено склад основних типів біомаси, показано, що він відрізняється від сівозміни 2021 (Bratishko et al. 2021), що можна пояснити впливом різних климатичних умов протягом року. Отримані дані корелюють з аналізом зв'язку між змінами лігноцелюлозних компонентів і географічним розташуванням, широтою та початкового місця зростання міскантусу в Китаї (Xu et al. 2020).

Ферментація лігноцелюлозної сировини за рахунок бактерій *Clostridium* була розроблена для виробництва бутанолу та інших хімічних речовин із доданою вартістю, але їх розвиток стримується деякими обмеженнями, такими як відносно висока вартість субстрату та необхідність підтримувати анаеробні умови. Останнім часом спільне культивування стає популярним способом усунення цих обмежень шляхом введення партнерського штаму з *Clostridium* (Zhang et al., 2023). Для видалення кисню із середовища часто потрібне спеціальне обладнання, що барботує азот і відновники, що збільшує вартість цього процесу. Спільне культивування мікробів, що споживають кисень, з анаеробними видами *Clostridium* є ефективним способом усунення кисню. Продемонстровано потенціал штучних мікробних консорціумів для виробництва біотехнологічних продуктів на базі широкого спектру успішно створених процесів спільного культивування (Cui et al. 2021). Нами було показано можливість виділення та використання нових видів лігнолітичних бактерій на прикладі *S. graminifolii.*

Для покращення загального біопроцесу в стійкому масштабі також були запропоновані інші можливі рекомендації (Srivastava et al. 2023). Варто відзначити, що сучасні підходи до «зеленого менеджменту» міських середовищ передбачають використання широкого переліку видів насаджень, зокрема, трав'яних, які здатні поєднувати в собі як декоративні так і ґрунтозахисні й інші функції (захист від шуму, пилу тощо). Однією з найбільш перспективних культур

для використання у міському, урбаністичному, середовищі, яка характеризується композиційно-естетичною цінністю, є міскантус, який в останній час знаходить широке поширення як біоенергетична культура та технології вирощування й переробки якого присутні в Україні (Роїк та ін., 2019). Відповідна целюлозна сировина для біопереробних заводів включає лісові залишки, сільськогосподарські відходи, міські відходи та швидкозростаючі енергетичні культури, однією з яких є міскантус. Ці культури є особливо перспективними, оскільки більшість із них є відходами, які мають достатню доступність і можуть використовуватися стабільно (Chen et al. 2020). Наші дослідження показали, що міскантус мав найменшу кількість лігніну, що характеризує його, як перспективну сировину для отримання рідкого біопалива. Крім того, більшість досліджень цієї сировини лише оцінювали вплив попередньої обробки біомаси (Banerjee et al., 2024). Однак, наші експерименти були направлені на визначення накопичення саме бутанолу, оскільки деякі інгібітори, які токсичні для мікроорганізмів можуть утворюватися під час попередньої обробки. Накопичення цільового продукту на незерновій біомасі міскантусу було отримано за рахунок різних методів обробляння та порівняно між собою. Наші дослідження показали ймовірні варіанти гідролізів для збільшення накопичення бутанолу.

Ефективна попередня обробка необхідна для досягнення високої ефективності перетворення врожаю на зброджуваний цукор, а згодом на біопаливо та інші цінні продукти (Khunnonkwao et al., 2024). Одним із методів попередньої обробки біомаси, яка покращує біодоступність вуглеводів та білків є УЗД (Liiv et al. 2024). Ці розчинні вуглеводи та білки можна використовувати для виробництва високоенергетичного біопалива шляхом ферментації АВЕ з мінімальним утворенням відходів (El-Dalatony et al. 2022). Нами було досліджено і показано вплив різних параметрів дезінтеграції на подальший процес ферментації. Виявлено, що оптимально ефективним було використання невеликого проміжку часу для оброблення. Це може свідчити, за вивільнення цукрів за рахунок руйнування міцних лігноцелюлозних зв’язків та зниження

кристалічності целюлози. Однак, навіть потужне вивільнення цукрів не означає, що всі вони будуть перетворені на бутанол. Нами було показано, що інтенсифікація цільового продукту суттєво залежить від способу попередної обробки.

З іншого боку, продукція бутанолу клостридіями з гідролізатів лігноцелюлозної біомаси має деякі обмеження, у тому числі нездатність штамів переносити інгібітори, присутні в гідролізатах біомаси, непереносимість штамів до високих концентрацій бутанолу та низький титр. Поліпшення утилізації сирого гліцерину іммобілізованими біокаталізаторами вже повідомлялося для виробництва водню (Sanghvi et al., 2024), 1,3-пропандіолу (Cordeiro et al., 2024) і бутанолу (Almeida et al., 2024). Щоб подолати ці обмеження, необхідна подальша інженерія клостридій для підвищення толерантності штаму до інгібіторів і бутанолу, підвищення ефективності штаму в метаболізмі широкого спектру цукрів, присутніх в гідролізатах біомаси, і перенаправлення потоку вуглецю на синтез бутанолу для досягнення бутанолу для досягнення бутанолу з відходів лігноцелюлозної біомаси (Segers et al., 2024). Потрібно виявлення найдешевших джерел вуглецю шляхом дослідження відходів лігноцелюлозної біомаси та методів її попередньої обробки (Karthikeyan et al., 2024). Процес ферментації також слід оптимізувати. Об'єднання цих областей для виробництва бутанолу з найдешевшого джерела вуглецю зі стійкою біомасою відходів може призвести до максимального використання ресурсів відходів для ефективного управління відходами з максимальною продуктивністю. Розробка альтернативного підходу консолідованої біообробки з використанням біологічного оцукрювання сприятиме тому, щоб лігноцелюлозне біопаливо стало реальністю (Raut et al. 2019).

Зазвичай, види клостридій здійснюють фракційну АБЕ-ферментацію лігноцелюлозної сировини, зокрема: целюлози та геміцелюлози (Barharathiraja et al., 2017). Однак, важливі етапи попередньої обробки обмежують ефективність бродіння лігноцелюлозної біомаси, оскільки становлять значну частку вартості процесу. Тому вкрай важливо розвивати більш рентабельні процеси попередньої

обробки, які зводять до мінімуму утворення інгібіторів, спричиняють знижують енерговитрати, зменшують операційні витрат та одночасно максимізують виробництво продуктів АБЕ ферментації з ретельним урахуванням властивостей вихідної сировини (Zhang et al., 2021).

Втрата карбону може відбуватися у формі ксилози під час попередньої обробки біомаси та виділення значної кількісті карбону у формі CO_2 під час бродіння та когенераційних процесів (Sanchez et al., 2014). Інноваційним способом підвищення ефективності виробництва спиртів за допомогою газового бродіння є шлях Вуда-Люнгдала, під час якого ацетогени зброджують CO_2 та H_2 для отримання летких жирних кислот і спиртів, як продемонстровано на прикладі *C. carboxidivorans* (Shen et al., 2017; Chakraborty et al., 2019; Muller et al., 2019). Крім того, ефективне використання ксилози в геміцелюлозі також є ключовим фактором зниження собівартості виробництва біобутанолу. Щоб збільшити конкурентоспроможність бутанолу, створити економічно ефективну промислову технологію з використанням лігноцелюлозної сировини необхідно додатково оптимізувати попередню обробку та гідроліз біомаси (Barybina et al., 2024). Крім того, необхідно мати відповідний продуцент для підтримки метаболічного шляху синтезу, ефективне транспортування цукру, використання суміші зброджувальних цукрів, а також хорошу толерантність у процесі промислового виробництва бутанолу, що може додатково підвищити ефективність бродіння та знизити витрати на цей процес.

Продуктивність лігноцелюлозної ферментації може бути покращена таким чином:

1) інтеграцією та інтенсифікацією процесу для подальшого збільшення продуктивності та економічної конкурентоспроможності ферментації лігноцелюлози до бутанолу, зокрема інтеграцією а) попередньої обробки з гідролізом, б) гідролізу з ферментацією, і навіть в) гідролізу, бродіння та відновлення продукту;

2) адаптацією та вдосконаленням фізіологічних характеристик цільових мікроорганізмів: швидким трансформуванням гексоз і пентоз;

толерантністю до бутанолу, проміжного продукту масляної кислоти та інгібіторів в сировині; стійкістю до умов стресу з низьким pH і за наявності органічних кислот і бутанолу, високою метаболічною активністю; можливістю підтримувати відповідний метаболічний шлях протягом усього процесу бродіння;

3) виробництвом бутанолу з лігноцелюлози з урахуванням клітинного стресу, проблем токсичності бутанолу в процесі бродіння та неоднорідності промислового виробництва.

Отже, попередня обробка лігноцелюлози, фізіологія і характеристики продуцентів, вуглецева ефективність, технологія екстракції та відновлення бутанолу мають бути відповідним чином оптимізовані для поліпшення фізіологічної діяльності мікробів. Для досягнення як підвищеної, так і постійної концентрації бутанолу в поєднанні з функціями біологічної стабільності клітин.

Тривале зберігання культур є основною проблемою колекцій мікроорганізмів та промислового мікробіологічного виробництва. Причиною зниження життєздатності бактерій та їх фізіологічних властивостей є зміна складу популяції під дією різних фізико-хімічних факторів (Feldman et al., 2024; Jones et al., 2024). Для зберігання матеріалів біологічного походження, як правило, застосовують метод ліофільного висушування. Основною проблемою збереження мікроорганізмів у колекціях є лабільність біологічного матеріалу. За зберігання на штучних поживних середовищах мікроорганізми швидко висихають, відмирають, знижують або гублять свої фізіологічні та ферментативні властивості. Потреба в способах довготривалого збереження мікроорганізмів та різного матеріалу біологічного походження виникла ще на початку розвитку мікробіологічної науки. У нашій роботі оптимізовано склад захисного середовища, що дає можливість зберігати штами з мінімальною деградацією. Досліджено стабільність та активність штамів-продуцентів бутанолу під час зберіганні. Оптимізовано склад захисного середовища (%: глюкоза – 10,0; желатина – 10,0; агар – 0,02) для проведення ліофільного висушування культури. Показано, що зберігання зразків ліофілізованих бактерій

протягом шести місяців за температури 4 ^{0}C не впливало на активність штамів.

Усі біотехнологічні процеси суттєво залежать від продуктивності штаму та умов ферментації. При виробництві бутанолу цю проблему вирішують різними способами: селекцією та генною інженерією штамів-продуцентів, оптимізацією ензиматичного середовища та самого процесу ферментації. Обсяги виходу бутанолу під час використання різних джерел вуглецю можна збільшити за допомогою оптимізації метаболічних шляхів синтезу. На додаток до інженерії метаболічних шляхів можна оптимізувати глобальні регулятори синтезу та фактори транскрипції, які супроводжують клітинні протеїни, що збільшують вихід бутанолу та сприяють толерантності штамів. Розробка нових підходів до процесу ферментації на основі мутантних штамів може істотно вплинути на економіку процесу отримання біобутанолу.

Багатообіцяючим напрямком розвитку можливостей *C. pasteurianum* є генна інженерія (Joseph & Sandoval, 2023). Маніпулюючи метаболічними шляхами та оптимізуючи експресію ферментів (Yang et al., 2024), дослідники можуть потенційно підвищити ефективність використання субстрату бактерією (Agyeman-Duah et al., 2024), вихід продукту (Nguyen, 2024) і толерантність до інгібіторних сполук (Jimenez-Bonilla et al., 2024). Генетичні модифікації також можуть бути використані для адаптації *C. pasteurianum* до певної сировини або цільових продуктів, тим самим підвищуючи його універсальність у різних застосуваннях циклічної біоекономіки (Kumar et al., 2024).

C. pasteurianum є основним видом бактерій для виробництва бутанолу шляхом перетворення гліцерину в n-бутанол і 1,3-пропандіол (Liberato et al., 2019). Рівень виробництва бутанолу залежить від конкретних умов культивування штаму (середовище, pH, температура, тривалість, джерела азоту та вуглецю) і типу ферментації, періодичної чи безперервної. Оцінка виходу бутанолу, накопиченого штамами *C. pasteurianum*, показала, що концентрація бутанолу варіювала від 5,5 г/л (ATCC 6013) до 6,7 г/л (DSM 525) (Pyne et al., 2016; Gallardo et al., 2014), тоді як штам із зовнішнього середовища могли синтезувати до 12,4 г/л і 15 г/л відповідно. Вітчизняний штам-продуцен

Clostridium sp. UCM B-7570 продемонстрував помірний рівень синтезу бутанолу (10 г/л) порівняно з опублікованими даними. Для підвищення виходу бутанолу було застосовано різні підходи хімічного мутагенезу та метаболічної інженерії для посилення процесів синтезу штамами *C. pasteurianum*. Це дозволило збільшити виробництво бутанолу втричі. Наведене дослідження показало, що геном *Clostridium* sp. UCM B-7570 містить усі кластери генів, необхідні для біосинтезу та накопичення бутанолу. Зважаючи на це, саме зазначений штам може бути перспективним для промислового виробництва бутанолу з гліцерину з використанням методів і підходів оптимізації умов культивування та генної інженерії.

Центральний ферментативний метаболізм *C. pasteurianum* є безпрецедентним за своєю природою, оскільки організм поєднує метаболічні шляхи, які є незалежно один від одного в інших клостридіях. *C. pasteurianum* має шляхи утворення клостридій бутирату та бутанолу, характерні для продуцентів АБ, таких як *C. acetobutylicum* та C. *beijerinckii* (Tyszak & Rehmann, 2024). Навпаки, організм зазвичай не виробляє ацетон, головний побічний продукт історичного АБЕ ферментативного процесу. Крім того, за певних умов культивування *C. pasteurianum* експресує високоактивний 1,3-пропандіольний шлях подібно до *C. butyricum*, у якого відсутній активний шлях утворення бутанолу. Завдяки цьому унікальному метаболічному різноманіттю центральний метаболізм *C. pasteurianum* є складним і сильно залежить від субстрату.

Метаболічна інженерія — це потужна стратегія маніпулювання метаболізмом і збільшення виходу бажаних продуктів. Метаболічна інженерія вже застосовувалася до різних штамів *Clostridium* (Serrano et al., 2024). Проте було повідомлено про небагато досліджень метаболічної інженерії *C. pasteurianum*, хоча цей мікроорганізм також представляє великий інтерес для інших цікавих біопроцесів, таких як фіксація N_2. Молекулярні інструменти для генетичної обробки *C. pasteurianum* для ефективного виробництва селективних сполук на сьогоднішній день недостатньо розроблені. Крім того, відносно мало відомо про регулювання селективності продукту при ферментації

C. pasteurianum різних субстратів. У цій роботі ми додатково розробили та оптимізували інструменти для метаболічної інженерії цього мікроорганізму, включаючи створення ніказної системи CRISPR/Cas9 для видалення генів. За допомогою сконструйованих штамів було отримано важливе розуміння вуглецевого обміну та його регуляції.

Фізіологічна продуктивність мікробів має вирішальне значення для успішного біологічного бродіння. Поліпшення ефективності через метаболічну інженерію спирається на інтеграцію знання стосовно фізіологічної функціональності та ефективних біоінженерних підходів (Zhang et al., 2009). Наприклад, застосування pro (область-попередник)–mtg (мікробна трансглутаміназа) у *C. acetobutylicum* покращило стійкість до окисного стресу, викликало ріст продуктивності і виробництво продуктів АБЕ ферментації (Tao et al., 2015). У минулому багато штамів, отриманих стратегіями метаболічної інженерії, не були стабільними і не демонстрували очікуваного фенотипу, оскільки фізіологічні стресові реакції мікроорганізмів ігнорувалися. Таким чином, мікроорганізми повинні мати не тільки потужну метаболічну здатність, й володіти високого фізіологічною міцністю й адаптованістю для того, щоб ефективно працювати в реальних біологічних процесах.

C. pasteurianum окислює цукри до піруват за допомогою повсюдно поширеного шляху Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (EMP). Організація генів шляху EMP у *C. pasteurianum* подібна до тієї, що виявлена в *C. ljungdahlii* (Ponsetto et al., 2024) та інших клостридіях, де два кластери генів (CP6013_0364–0368: гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, фосфогліцераткіназа, триосефеосефаза, хосфогліцератмутаза та енолаза; і CP6013_0418 і CP6013_0419: 6-фосфофруктокіназа і піруваткіназа) становлять основну частину генів шляху EMP. На відміну від *C. ljungdahlii*, однак, *C. pasteurianum* не має окисної фази пентозофосфатного шляху (PPP).

Повний комплекс генів, що відповідають неокислювальній фазі PPP, включаючи кілька копій рибулозо-5-фосфат ізомерази (CP6013_0382, CP6013_2877, CP6013_3967), транскетолази (CP6013_0396, CP6013_0396,

CP6013_0396, CP6013_0396, CP6013_0396, CP6013_0396, CP6013_0396, CP6013_0396, CP6013_0396, CP6013_0396, CP6013_03201, CP6013_0320, CP6013_0382, CP6013_0382 CP6013_2340), були ідентифіковані в геномі. Як і більшість грампозитивних бактерій, *C. pasteurianum* також не має повного шляху Ентнера-Дудорова (ED). Замість цього глюконат катаболізується за допомогою модифікованого шляху ED шляхом перетворення в 2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконат, який згодом викачується в гліколіз через гліцеральдегід-3-фосфат і піруват. Як і інші клостридії (наприклад, *C. acetobutylicum*, *C. ljungdahlii*, C. *autoethanogenum*) *C. pasteurianu*m має нециклічний або розгалужений цитратний «цикл». Показано, що безклітинні екстракти утворюють глутамат з оксалоацетату, що представляє одну гілку шляху, який складається з цитратсинтази, аконітази (CP6013_2146) та ізоцитратдегідрогенази (CP6013_1709). Хоча нам не вдалося знайти ген, що відповідає цитратсинтазі в геномі *C. pasteurianum*, передбачається, що утворення глутамату з оксалоацетату відбувається за вищезгаданим шляхом. Прикладом другої гілки цитратного циклу є малатдегідрогеназа (CP6013_0066 і CP6013_0670) і фумаратгідратаза (CP6013_3554 і CP6013_3555). Проте гени, що відповідають α-кетоглутаратдегідрогеназі, сукцинатдегідрогеназі та сукциніл-КоА-синтетазі, не вдалося ідентифікувати в геномі *C. pasteurianum.*

Таким чином, це дослідження продемонструвало, що застосованний підхід досягнення оптимальних параметрів ферментації з використанням різних видів сільськогосподарських відходів, які дозволяють здійснювати недороге та високоефективне ферментативне оцукрювання різноманітних джерел лігноцелюлози, забезпечує потенційну стратегію для великомасштабного виробництва біопалива для всіх основних біоенергетичних культур. Ці результати являють собою значний крок вперед у біоенергетичних технологіях, пропонуючи як практичні ідеї, так і стійкі рішення для покращеного виробництва біопалива. У сукупності проведені дослідження дають нове розуміння того, чому гідролізати лігноцелюлозної біомаси стійкі до ферментації до біопалива та хімікатів. Слід відзначити, показану ефективність сокультивування, яке є

найперспективнішим методом для зменшення забруднення під час виробництва бутанолу, що корелює з дослідженями інших авторів (Silva et al., 2024). Визначено перспективні рішення для біопереробки різних енергетичних культур. Поєднання та методи попередньої обробки незернової рослинної біомаси мають великий потенціал для виробництва біопалива (рис. 6.1.).



Рис. 6.1 Блок-схема основних етапів біотехнології виробництва бутанолу з лігноцелюлозних субстратів

Перехід від лабораторних експериментів до промислових застосувань є серйозною проблемою. Підсумовуючи, хоча *Clostridium pasteurianum* пропонує величезний потенціал у круговій біоекономіці, вирішення проблем, пов'язаних із генною інженерією, масштабуванням, дотриманням нормативних вимог і безпекою є обов'язковим для його успішного промислового впровадження. Крім того, використання додаткового шляху ферментації та дослідження нових видів сировини може відкрити нові можливості для сталого використання ресурсів і диверсифікації продукції. Ці майбутні напрямки обіцяють більш сталу та

регенеративну біоекономіку, керовану метаболічними можливостями *C. pasteurianum*.

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 показана 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. Визначено, що геном містить 4262 гени, 4057 з яких кодують протеїни, містить 30 оперонів рРНК і 80 оперонів тРНК.

2. Виділенно 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, 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, мав змінений метаболічний шлях в порівняні 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: целюлолозу (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 з'єднаних клітин лігноцелюлози і перешкоджають біорозкладанню мікроорганізмами.

5. Показано можливість використання 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*, *Zey 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 як альтернативних субстратів для отримання бутанолу.

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 репресорів 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 використання внутрішньої здатності мікроорганізмів адаптуватися до стресових умов.

ПЕРЕЛІК ПЕРШОДЖЕРЕЛ

1. Адамчук, В. В., Кузьменко, В. Ф., Кузьмич, А. Я., та Максіменко, В. В. (2019). Аспекти процесів збирання незернової частини врожаю кукурудзи та соняшнику як твердого біопалива. *Механізація та електрифікація сільського господарства*, 9 (108), 10-20.
2. Блюм, Я.Б., Гелетуха, Г.Г., Григорюк, І.П., Дмитрук, К.В., Дубровін, В.О., Ємець, А.І., Забарний, Г.М., Калетнік, Г.М., Мельничук, М.Д., Мироненко, В.Г., Рахметов, Д.Б., Сибірний, А.А., та Циганков, С.П. (2010). *Біологічні ресурси і технології виробництва біопалива*. Київ: Аграр Медіа Груп.
3. Братішко, В.В., Шульга, С.М., Тігунова О.О., Ребенко, В.І., та Красюк, А.О. (2020). Ресурсний потенціал незернової частини біомаси основних сільськогосподарських культур в Україні. *Механізація та електрифікація сільського господарства,* 12 (111), 184-191. doi: 10.37204/0131-2189-2020-12-21
4. Гриник, П.І., Стеценко, М.П., Шнайдер, С.Л., Листопад, О.Г., та Борейко, В.Є. (2010). *Стародавні дерева України: реєстр-довідник*. Київ: Логос.
5. Гуменюк, О.Л. (2022). *Технологія жирів та жирозамінників.* Ченігів: НУ «Чернігівська політехніка».
6. Підгорний, А.В., Назарова, Т.М., та Дуда, Т.І. (2020). *Хімія*. Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського.
7. Роїк, М.В.. Сінченко, В.М., Пиркін, В.І., Квак, В.М., Гументик, М.Я., Ганженко, О.В., Саблук, В.Т., Грищенко, О.М., Фучило, Я.Д., Гончарук, Г.С., Фурман, В.А., Суслик, Л.О., Макух, Я.П., Ременюк, С.О., Іваніна, В.В., Фурса, А.В., Бондар, В.С., Бех, Н.С., Коцар, М.І., Цвіргун, Г.В., Ковальчук, Н.С., Недяк, Т.М., Ворожко, С.П., Доронін, В.А., Дрига, В.В., Бузинний, М.В., Дубовий, Ю.П., Педос, В.П., Балагура, О.В., Смірних, В.М., Заіменко, Н.В., Рахметов, Д.Б., Щербакова, Т.О., Рахметов. С.Д., та Кателевський, В.М. (2019). *Міскантус в Україні*. Київ: ТОВ ЦП Компрінт.

8. Тігунова, О.О., та Шульга, С.М. (2013). Нові штами-продуценти біобутанолу. І. Виділення та ідентифікація. *Biotechnol Acta,* 6 (1), 97-104. doi: 10.15407/biotech6.01.097
9. Халаїм, О.О., Забарна, О.Г., Скок, А.В., та Сладкова, О.А. (2023). Можливості прозорої, партисипативної та дієвої інвентаризації міських зелених насаджень у населених пунктах України на прикладі міста Києва. Аналітичний звіт. Київ: Cedos.
10. Шульга, С.М., Тігунова, О.О., Братишко, В.В., та Блюм, Я.Б. (2024). *Біобутанол. Продуценти, субстрати, культивування та відновлення.* Київ: Наукова думка. doi: 10.15407/978-966-00-1918-8
11. Шульга, С.М., Тігунова, О.О., та Блюм, Я.Б. (2013). Лігноцелюлоза як альтернативна сировина для одержання біобутанолу. *Biotechnology Acta*, 6 (2), 9-20.
12. Abolore, S.R., Jaiswal, S., & Jaiswal, A.K. (2024). Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review. *Carbohydr Polym Technol Appl,* 7, 100396. doi: 10.1016/j.carpta.2023.100396
13. Addas, A. (2023). The importance of urban green spaces in the development of smart cities. *Front Environ Sci,* 11, 1206372. doi: 10.3389/fenvs.2023.1206372
14. Agu, V.Ch., Ujor V., & Ezeji, T.C. (2018). Allopurinol supplementation of the growth medium enhances the fermentation of lignocellulose hydrolysates to ethanol by *Saccharom*yces *cerevisiae*. *Biocatal Agric Biotechnol*, 14, 151-159. doi: 10.1016/j.bcab.2018.03.001
15. Agu, V.Ch., Ujor V., & Ezeji, T.C. (2019). Metabolic engineering of *Clostridium beijerinckii* to improve glycerol methabolism and furfural tolerance. *Biotechnol Biofuels*, 12 (50). doi:10.1186/s13068-019-1388-9
16. Agyeman-Duah, E., Kumar, S., Gangwar, B., & Unjor, V. (2022). Glycerol utilization as a sole carbon source disrupts the membrane architecture and solventogenesis in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Fermentation*, 8, 339. doi:10.3390/fermentation8070339

17. Agyeman-Duah, E., Kumar, S., & Unjor, V. (2024). Unravelling the roadblocks to 1,2-propanediol biosynthesis in selected solventogenic *Clostridium* species. *bioRxiv,* 581430. doi: 10.1101/2024.02.22.581430
18. Ahn, S., Luo, Q., Mendoza, S., & Norwood, F.B. (2024). Rethinking the traditional American lawn: perspectives of U.S. households in a natonwide survey. *Urban Forestry & Urban Greening.* 99, 128480. doi: 10.1016/j.ufug.2024.128460
19. Al-Hinai, M.A., Jones, S.W., & Papoutsakis E.T. (2014). σ^K of *Clostridium acetobutylicum* is the first known sporulation-specific sigma factor with two developmentally separated roles, one early and one late in sporulation. *Journal of Bacteriology*, 196 (2), 287-299. doi: 10.1128/ JB.01103-13
20. Al-Hinai, M.A., Jones, S.W., & Papoutsakis, E.T. (2015). The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 79 (1), 19-37. doi: 10.1128/mmbr.00025-14
21. Aljabali, A.A.A., El-Tanani, M., & Tambuwala, M.M. (2024). Principles of CRISPR-Cas9 technology: advancements in genome editing and emerging trends in drug delivery. *JDDST*, 92, 105338. doi: 10.1016/j.jddst.2024.105338
22. Almeida, E.L., Olivo, J.E., & Andrade, C.M.G. (2023). Production of biofuels from glycerol from the biodiesel production process – a brief review. *Fermentation*, 9(10), 869. doi:10.3390/fermentation9100869
23. Alsaker, K.V., & Papoutsakis, E.T. (2005). Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, 187 (20), 7103-7118. doi: 10.1128/JB.187.20.7103-7118.2005
24. Ambaye, T.G., Vaccari, M., Bonilla-Petriciolet, A., Prasad, S., van Hullebusch, E.D., & Rtimi, S. (2021). Emerging technologies for biofuel production: A critical on recent progress, challenges and perspective. *Journal of Environmental Manegment*, 290, 112627. doi: 10.1016/j.jenvman.2021.112627

25. Amiri, H., & Karimi, K. (2018). Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 270, 702-721. doi: 10.1016/j.biortech.2018.08.117
26. Ampese, L.C., Ziero, H.D.D., Velasquez, J., Sganzerla, W.G., Martins, G., & Forster-Carneiro, T. (2023). Apple pomace management by anaerobic digestion and composting: a life cycle assessment. *Biofpr*, 17 (1), 29-45 doi:10.1002/bbb.2446
27. Andreu, C., & li del Olmo, M. (2024). Biocatalysis with unconventional yeasts. *Catalysts*, 14 (11), 767. doi: 10.3390/catal14110767
28. Anuradha, A., Bharathiraja, B., Kumar, M., & Kumar, R.P. (2023). Recent Technologies for the Production of Biobutanol from Agricultural Residues. In: Ramanujam, P.K., Parameswaran, B., Bharathiraja, B., Magesh, A. (eds) *Bioenergy. Energy, Environment, and Sustainability*. (pp. 219-242). Springer, Singapore doi: 10.1007/978-981-99-3002-9_12
29. Apiwatanapiwat, W., Vaithanomsat, P., Thanapase, W., Ratanakhanokcai, K., & Kosugi, A. (2018). Xylan supplement improves 1,3-propandiol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(6), 662-668. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.006
30. Arbter, Ph., Sabra, W., Utesch, T., Hong, Y., & Zeng, A.-P. (2021). Metabolomic and kinetic investigations on the electricity-aided production of butanol by *Clostridium pasteurianum* strains. *Eng Life Sci*, 21, 181-195. doi: 10.1002/elsc.202000035
31. Armylisas, N.H.A., Hoong, S.S., & Ismail, T.M.N.T. (2024). Characterization of crude glycerol and glycerol pitch from palm-based residual biomass. *Biomass conversion and biorefinery,* 14, 28341-28353. doi:10.1007/s13399-023-04003-4
32. Atsumi, S., Hanai, T., & Liao J.C. (2008). Non-Fermentative Pathways for Synthesis of Branched-Chain Higher Alcohols as Biofuels. *Nature*, 451, 86-89. doi: 10.1038/nature06450

33. Attarbachi, T., Kingsley, D.M., & Spallina, V. (2024). Waste-derived low-grade glycerol purification and recovery from biorefineries: an experimental investigation. *Biofuels Bioproducts & Biorefining,* 18 (5), 1077-1865. doi:10.1002/bbb.2638
34. Ávila, M., Rochón, E., & Lareo, C. (2023). Improvements in the formulation of sugarcane-sweet sorghum juices fermentation media for enhanced isopropanol and butanol production. *Biomass Conv Bioref*, 13, 4575-4585. doi: 10.1007/s13399-021-01458-1
35. Azarakhsh, F.A.-S., Ziloue, H., Ebrahimian, F., Khoshnevisan, B., Denayer, J.F.M., & Karimi, K. (2024). Life cycle analysis of apple pomace biorefining for biofuel and pectin production. *Science of Total Environment*, 951, 175780. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.175780
36. Balan, V. (2014). Current challenges in commercially production biofuels from lignocellulosic biomass. *ISRN Biotechnology*, 463074. doi: 10.1155/2014/463074
37. Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52 (2), 858-875. doi: 10.1016/j.enconman.2010.08.013
38. Banerjee, S., Dien, B.S., Eilts, K.K., Sacks, E.J., & Singh, V. (2024). Pilot-scale processing of *MiscanthusXgiganteus* for recovery of anthocyanins integrated with production of microbial lipids and lignin-rich residue. *CEJ*, 485, 150117. doi: 10.1016/j.cej.2024.150117
39. Bansod, Y., Crabbe, B., Forster, L., Ghasemzadeh, K., & D`Agostino, C. (2024). Evaluating the environmental impact of crude glycerol purification derived from biodiesel production: A comparative life cycle assessment study. *Journal of Cleaner Production*, 437, 140485. doi:10.1016/j.jclepro.2023.140485
40. Bao, G., Wang, R., Zhu, Y., Dong, H., Mao, S., Zhang, Y., Chen, Z., Li, Y., & Ma, Y. (2011). Complete genome sequence of *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731, a solvent-producing strain with multireplicon genome architecture.

Journal of Bacteriology, 193 (18), 5007-5008. doi: 10.1186/s13068-015-0410-0

41. Bao, T., Zhao, J., Zhang, Q., & Yang, S.-T. (2019). Development of a shuttle plasmid without host restriction sites for efficient transformation and heterologous gene expression in *Clostridium cellulovorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 103 (13), 5391-5400. doi: 10.1007/s00253-019- 09882-0
42. Baral, N.R., & Shah, A. (2014). Microbial inhibitors: formation and effects on acetone-butanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 98 (22), 9151-9172. doi: 10.1007/s00253-014-6106-8
43. Barybina, L.O., Tkachenko, T.V., Haidai, O.O., Sokol, V.S., Korinenko, B.V., Kamenskyh, D.S., Sheludko, Y.V., Povazhny, V.A., Bohatyrenko, V.A., Ruban, S.V., & Yevdokymenko, V.O. (2024). Structural and morphological features of microcrystalline cellulose from industrial hemp hurd. *Chemistry. Physics and Technology of Surface,* 15 (4), 524-533. doi: 10.15407/hftp15.04.524
44. Basu, D., Le, J., Zakharova, T., Mallery, E.L., & Szymanski, D.B. (2008). A SPIKE1 Signaling Complex Controls Actin-Dependent Cell Morphogenesis through the Heteromeric WAVE and ARP2/3 Complexes. *PNAS,* 105 (10), 4044-4049. doi: 10.1073/pnas.0710294105
45. Benito-Vaquerizo, S., Diender, M., Olm, I. P., dos Santos, V.A.P. M., Schaap, P.J., Sousa, D.Z., & Suarez-Diez, M. (2020). Modeling a co-culture of *Clostridium autoethanogenum* and *Clostridium kluyveri* to increase syngas conversion to medium-chain fatty-acids. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3255-3266, doi: 10.1016/j.csbj.2020.10.003
46. Berezina, O.V., Zakharova, N.V., Yarotsky, C.V., & Zverlov, V.V. (2012). Microbial producers of butanol. *Applied Biochemistry and Microbiology,* 48, 625-638. doi: 10.1134/ S0003683812070022
47. Berrios-Rivera, S.J., Bennett, G.N., & San, K.Y. (2002). The effect of increasing NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli*

chemostat cultures. *Metabolic Engineering*, 4 (3), 230-237. doi: 10.1006/mben.2002.0228

48. Bharathiraja, B., Jayamuthunagai, J., Sudharsanaa, T., Bharghavi, A., Praveenkumar, R., Chakravarthy, M., & Yuvaraj., D. (2017). Biobutanol — an impending biofuel for future: areview on upstream and downstream processing techniques. *Renewable and Sustainable Energy Reviws*, 68, 788-807. doi: 10.1016/j.rser.2016.10.017

49. Biebl, H. (2001). Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 27, 18–26. doi: 10.1038/sj.jim.7000155

50. Birgen, C., Durre, P., Preisig, H.A., & Wentzel, A. (2019). Butanol production from lignocellulosic biomass: revisiting fermentation performance indicators with exploratory data analysis. *Biotechnology for Biofuel*, 12, 167. doi: 10.1186/s13086-019-1508-6

51. Blasi, A., Verardi, A., Lopresto, C.G., Siciliano, S., & Sangiorgio, P. (2023). Lignocellulosic agricultural waste valorization to obtain valuable products: an overview. *Recycling*, 8 (4), 61. doi: 10.3390/recycling8040061

52. Boas, V.N.R., & Mendes, F.M. (2022). A review of biodiesel production from non-edible raw materials using the transesterification process with a focus on influence of feedstock composition and free fatty acids. *Journal of the Chilean chemical society*, 67(1). doi:10.4067/s0717-97072022000105433

53. Boopathy, R. (2009). Anaerobic biotransformation of furfural to furfuryl alcohol by a methanogenic archaebacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, 63, 1070-1072. doi: 10.1016/j.ibiod.2009.09.011

54. Borrero-Lopez, A.M., Valencia, C., & Franco, J.M. (2022). Lignocellulose materials for the production of biofuels, biochemical and biomaterials and applications of lignocellulose-based polyurethanes: a review. *Polymers*, 14 (5), 881. doi: 10.3390/polym14050881

55. Boynton, Z.L., Bennett, N.G., & Rudolph, B.F. (1996). Cloning, sequencing and expression of cluster genes encoding β-hydroxybutyryl-Coenzyme A (CoA)

dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology,* 178 (11), 3015—3014. doi: 10.1128/jb.178.11.3015-3024.1996

56. Bozzolan, N., Mohren, F., Grassi, G., Schelhaas, M.-J., Staritsky I., Stern, T., Peltoniemi, M., Seben, V., Hassagawa, M., Verkerk, P.J., Patacca, M., Jansons, A., Jankovsky, M., Palatova, P., Blauth H., McInerney, D., Oldenburger, J., Jastad, E.O., Kubista J., Anton-Fernandez, C., & Nabuurs, G.-j. (2024). Preliminary evidence of softwood shortage and harwood availability in EU regions: A spatial analysis using the European Forest Industry Database. *Forest Policy and Economics,* 169, 103358. doi: 10.1016/j.forpol.2024.103358
57. Branska, B., Koppova, K., Husakova, M., & Patakova, P. (2024). Application of fed-batch strategy to fully eliminate the negative effect of lignocellulose-derived inhibitors in ABE fermentation. *Biotechnol Biofuels,* 17 (87). doi: 10.1186/s13068-024-02520-6
58. 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
59. Bratishko, V., Tkachenko, T., Shulga, S., & Tigunova, O. (2021) Results of composition analysis of non-grain part of major field crops in Ukraine. *ERDev* 21, 584-588. doi:10.22616/ERDev.2021.20.TF125
60. Bravo-Venegas, J., Prado-Acebo, I., Gullon, B., Lu-Chau, T.A., & Eibes, G. (2023). Avoiding acid crash: From apple pomace hydrolysate to butanol through acetone-butanol-ethanol fermentation in a zero-waste approach. *Waste Management,* 164, 47-56, doi: 10.1016/j.wasman.2023.03.039
61. Brown, L.J., Perisin, M.A., Swift, C.L., Benyamin, M., Liu, S., Singan, V., Zhang, Y., Savage, E., Pennacchio, C., Grigoriev, I.V., & O`Malley, A.M. (2023). Co-cultivation of anaerobic fungi with *Clostridium acetobutylicum* bolsters butyrate and butanol production from cellulose and lignocellulose. *JIMB,* 49(6), kuac024. doi: 10.1093/jimb/kuac024

62. Brunt, J., van Vliet, A.H.M., Carter, A.T., Stringer, S.C., Amar, C., Grant, K.A., Godbole, G., & Peck, M.W. (2020). Diversity of the Genomes and Neurotoxins of Strains of *Clostridium botulinum* Group I and *Clostridium sporogenes* Associated with Foodborne, Infant and Wound Botulism. *Toxins*, 12(9), 586. doi: 10.3390/toxins12090586

63. Busch, S., Kasdorp, R., Koolen, D., Mercier, A., & Spooner, M. (2023). The development of renewable energy in the electricity market. *European Commission,* 18, 411281. doi: 10.2765/411281

64. Cai, G.Q., Jin, B., Saint, C., & Monis, P. (2011). Genetic manipulation of butyrate formation pathways in *Clostridium butyricum. Journal of Biotechnology*, 155 (3), 269-274. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.07.004

65. Cai, S., Kumar, R., & Singh, B.R. (2021). Clostridial Neurotoxins: Structure, Function and Implications to Other Bacterial Toxins. *Microorganisms*, 9(11), 2206, 1-30. doi: 10.3390/microorganisms9112206

66. Can, M.A., Yildirim, R.M., & Karadag, A. (2024). The properties of pectin extracted from the residues of Vinegar-fermented apple and apple pomace. *Fermentation*, 10 (11), 556. doi: 10.3390/fermentation10110556

67. Cao, L., Gao, Y., Wang, X.-Zh., Shu, G.-Y., Hu, Y.-N., Xie, Z.-P., Cui, W., Guo, X.-P., & Zhou, X. (2021). A Series of Efficient Umbrella Modeling Strategies to Track Irradiation-Mutation Strains Improving Butyric Acid Production From the Pre-development Earlier Stage Point of View. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi:10.3389/fbioe.2021.609345

68. Capilla, M., Valles, A., San-Valero, P., Alvares-Hornos, F.J., & Gabaldon, C. (2024). Solvent production from rice straw by a co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae:* effect of pH control. *Biomass Con Bioref*, 14, 5561-5573 doi: 10.1007/s13399-022-02750-4

69. Cavelius, P., Engelhart-Straub, S., Mehlmer, N., Lercher, J., Awad, D., & Bruck, T. (2023). The potential of biofuels from first to fourth generation. *PLOSBiology*, 21(3), e3002063. doi: 10.1371/journal.pbio.3002063

70. Chakraborty, S., Rene, E.R., Lens, P.N.L., Veiga, M.C., & Kennes, C. (2019). Enrichment of a solventogenic anaerobic sludge converting carbon monoxide and syngas into acids and alcohols. *Bioresource Technology,* 272, 130-136. doi: 10.1016/j.biortech.2018.10.002
71. Chang, Z., Cai, D., Wang, Y., Chen, C., Fu, C., Wang, G., Qin, P., Wang, Z., & Tan, T. (2016). Effective multiple stages continuous acetone-butanol-ethanol fermentation by immobilized bioreactor: Making full use of fresh corn stalk. *Bioresource Technology,* 205, 82-89. doi: 10.1016/j.biortech.2016.01.034
72. Charubin, K., & Papoutsakis, E.T. (2019). Direct cell-to-cell exchange of matter in a synthetic Clostridium syntrophy enables CO_2 fixation, superior metabolite yields, and an expanded metabolic space. *Metabolic Engineering,* 52, 9-19. doi: 10.1016/j.ymben.2018.10.006
73. Chen, K.-T., Liu, C.-L., Huang, S.-H., Shen, H.-T., Shieh, Y.K., Chiu H.-T., & Lu, C.L. (2018). CSAR: a contig scafolding tool using algebraic rearrangements. *Bioinformatics*, 34 (1), 109-111. doi: 10.1093/bioinformatics/btx543
74. Chen, J., Ma, X., Liang, M., Guo, Z., Cai, Y., Zhu, C., Wang, Z., Wang, S., Xu, J., & Ying, H. (2024). Physical-chemical-biological pretreatment for biomass degradation and industrial applications: a review. *Waste*, 2 (4), 451-473. doi: 10.3390/waste2040024
75. Chen, M., Malaret, F., Firth, A.E.J., Verdia, P., Abouelela, A.R., Chen, Y., & Hallett, J.P. (2020). Design of a combined ionosolv-organosolv biomass fractionation process for biofuel production and high value-added lignin valorization. *Green Chem*, 22, 5161-5178 doi: 10.1039/D0GC01143F
76. Cheng, C., Bao, T., & Yang, S.-T. (2019). Engineering *Clostridium* for improved solvent production: recent progress and perspective. *Applied Microbiology Biotechnology*, 103, 5549-5566. doi: 10.1007/s00253-019-09916-7
77. Cheng, H.-H., Whang, L.-M., Chan, K.-C., Chung, M.-C., Wu, S.-H., Liu, C.-P., Tien, S.-Y., Chen, S.-Y., Chang, J.-S., & Lee, W.-J. (2015). Biological butanol production from microalgae-based biodiesel residues by *Clostridium*

acetobutylicum. *Bioresource Technology,* 184, 379-385. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.017

78. Chi, X., Li, J., Leu, S.-Y., Wang, X., Zhang, Y., & Wang, Y. (2019). Features of a staged acidogenic/solventogenic fermentation process to improve butanol production from rice straw. *Energy Fuels*, 33 (2), 1123-1132. doi: 10.1021/acs.energyfuels.8b03095
79. Chinwatpaiboon, P., Boonsombuti, A., Chaisuwan, T., Savarajara, A., & Luengnaruemitchai, A. (2024). Modified activated carbon: a supporting material for improving *Clostridium beijerinckii* TISTR1461 immobilized fermentation. *Bioinorg Chem Apll*, 9852623. doi: 10.1155/2024/9852623
80. Cho, Ch., Hong, S., Moon, G.H., Jang, Y.-S., Kim, D., & Lee, S.Y. (2019). Engineering clostridial aldehyde/alcohol dehydrogenase for selective butanol productions. *mBio*, 10 (1), e02683-18. doi: 10.1128/mBio.02683-18.
81. Cordeiro, C.N., Veras, S.T.S., Kato, M.T., Florencio, L., & Sanz, J.L. (2024). Enhanced Production of 1,3-Propanediol by Glycerol Fermentation Using an Attached-to-Silicone Biofilm Reactor. *Waste Biomass Valor* 15, 687-695 doi: 10.1007/s12649-023-02188-3
82. Cornillot, E., Nair, R.V., Papoutsakis, E.T., & Soucaille, P. (1997). The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. *Journal of Bacteriology,* 179 (17), 5442-5447. doi: 10.1128/jb.179.17.5442-5447.1997
83. Cruz-Morales, P., Orellana, A.C., Moutafis, G., Moonen, G., Rincon, G., Nielsen, K.L., & Marcellin, E. (2019). Revisiting the Evolution and Taxonomy of *Clostridia* a Phylogenomic Update. *Genome Biology and Evolution,* 11(7), 2035-2044. doi: 10.1093/gbe/evz096
84. Cuebas-Irizarry, M.F., & Grunden, A.M. (2024). *Streptomyces* spp. as biocatalyst sources in pulp and paper and textile industries: Biodegradation, bioconversion and valorization of waste. *Microb Biotechnol*, 17, e14258. doi: 10.1111/1751-7915.14258
85. Cui, Y., Kun-Lin, Y., Zhou, K. (2021). Using co-culture to functionalize

Clostridium fermentation. *Trends in Biotechnology*, 39(9), 914-926. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.11.016

86. Dafnomilis, I., Hoefnagels, R., Pratama, Y.W., Schott, D.L., Lodewijks, G., & Junginger, M. (2017). Review of solid and liquid biofuel demand and supply in Northwest Europe towards 2030 — A comparison of national and regional projection. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 31-45. doi: 10.1016/j.rser. 2017.04.108
87. Dawi, H.A., & Uthman, T.O. (2024). Characterization, compositional and thermogravimetric analyses of lignocellulosic fibers of *Syzygium Cumini* (L.) Leaf litter: investigating the potential of biofuel production. *IntechOpen*. doi: 10.5772/geet.20240061
88. Dellomonaco, C., Rivera, C., Campbell, P., & Gonzalez, R. (2010). Engineered respiro-fermentative metabolism for the production of biofuels and biochemicals from fatty acid-rich feedstocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5067-5078. doi: 10.1128/AEM.00046-10
89. Dong, H., Zhao, C., Zhang, T., Zhu, H., Lin, Z., Tao, W., Zhang, Y., & Li, Y. (2017). A systematically chromosomally engineered *Escherichia coli* efficiently produces butanol. *Metabolic Engineering*, 44, 284-292. doi: 10.1016/j.ymben.2017.10.014
90. Drake, H.L., Küsel, K., & Matthies, C. (2006). Acetogenic Prokaryotes. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds), *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. doi:10.1007/0-387-30742-7-13
91. Du, Y., Zou, W., Zhang, K., Ye, G., & Yang, J. (2020). Advances and Applications of *Clostridium* Co-culture Systems in Biotechnology. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.560223
92. Durán-Aranguren, D.D., Toro-Delgado, J., Núñez-Barrero, V., Florez-Bulla, V., Sierra, R., Posada, J.A., & Mussatto, S.I. (2024). Data clustering for classification of vegetable biomass from compositional data: A tool for biomass valorization. *Biomass and Bioenergy*, 191, 107447. doi:10.1016/j.biombioe.2024.107447

93. Dürre, P., & Eikmanns, B.J. (2015). C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*, 35, 63-72. doi: 10.1016/ j.copbio.2015.03.008
94. Dziemianowicz, W., Kotarska, K., & Swierczynska, A. (2024). The effect of technological conditions on ABE fermentation and butanol production of rye straw and the composition of volatile compounds. *Moleculs,* 29(14), 3398. doi: 10.3390/moleculs29143398
95. Edelman, H., Thieme, N., Ehrenreich, A., Zverlov, V., & Liebl, W. (2024). Valorization of milling byproducts and ergot-sclerotia-contaminated rye via clostridial ABE fermentation. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts,* 17, 139. doi: 10.1186/s13068-024-02590-6
96. Edwards, K., Logan, J., & Saunders, N. (2005). Real-time PCR: an essential guide. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (1), 185-186. doi: 10.3201/eid1101.040896
97. Ehsaan, M., Kuit, W., Zhang, Y., Cartman, S.T., Heap, J.T., Winzer, K., & Minton, N.P. (2016). Mutant generation by allelic exchange and genome resequencing of the biobutanol organism *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnology for Biofuels,* 9 (1), 4. doi: 10.1186/s13068-015-0410-0
98. El-Araby, R. (2024). Biofuel production: exploring renewable energy solutions for a greener future. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts,* 17, 129. doi: 10.1186/s1308
99. El-Dalatony, M.M., Basak, B., Kurade, M.B., Roh, H.-S., Jang, M., & Jeon, B.-H. (2022). Effect of sonication pretreatment on hydrogen and acetone-butanol-ethanol coproduction from *Chlamydomonas mexicana* biomass using *Clostridium acetobutylicum*. *J Env Chem Eng*, 10 (3), 107600 doi: 10.1016/j.jece.2022.107600
100. Erkmen, O. (2021). Practice 10 – Gram staining technique. *Laboratory practices in microbiology* (pp. 99-105). Britany: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-323-91017-0.00028-7

101. Farmanbordar, S., Javid, A., Amiri, H., Denayer, J.F.M., & Kamiri, K. (2024). Enhanced biobutanol production with sustainable Co-substrates synergy from paper waste and garden waste with municipal biowaste. *Biomass and Bioenergy,* 186, 107262. doi: 10.1016/j.biombioe.2024.107262

102. Feldmane, L., Raita, S., Berzina, I., Geiba, Z., Mika, T., Kuzmika, I., & Spalvins, K. (2024). Effects of temperature, pH, and agitation on growth and butanol production of *Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii,* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum. Environmental and climate technologies*, 28 (1), 71-83. doi: 10.2478/rtuect-2024-0007

103. Feng, F., Wu, C.-H., Li, F., Wang, X., Zhu, J., Zhang, R., & Chen, S.-C. (2024). Research on integration of microbial fuel cells with conventional wastewater treatment technology: advantages of aerobic fermentation. *Energy convention and management: X,* 23, 100680. doi: 10.1016/ j.ecmx.2024.100680

104. Foulquier, C., Riviere, A., Heulot, M., Reis, S.D., Perdu, C., Girbal, L., Pinault, M., Dusseaux., S., Yoo, M., Soucaille, P., & Meynial-Salles, I. (2022). Molecular characterization of the missing electron pathway for butanol synthesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Nature communication,* 13, 4691. doi: 10.1038/s41467-022-32269-1

105. Gallardo, R., Alvec, M., & Rodrigues, L.R. (2014). Modulation of crude glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 towards the production of butanol. *Biomass and Bioenergy*, 71, 134-143. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.10.015

106. Gamayunova, V., Khonenko, L., & Kovalenko, O. (2022). Bioethanol producing from sorghum crops. *Ukrainian Black Sea Region Agrar Sci*, 26(1), 9-18. doi: 10.56407/2313-092X/2022-26(1)-1

107. Gao, K., Orr, V., & Rehmann, L. (2016). Butanol fermentation from microalgae-derived carbohydrates after ionic liquid extraction. *Bioresource Technology*, 206, 77-85. doi: 10.1016/ j.biortech.2016.01.036

108. Garg, D., Samota, M.K., Kontis, N., Patel, N., Bala, S., & Rosado, A.S. (2023). Revolutionizing biofuel generation: unleashing the power of CRISPR-

Cas mediated gene editing of extremophiles. *Microb Res*, 274, 127443. doi: 10.1016/j.micres.2023.127443

109. Geletukha, G.G., & Zhelezna, T.A. (2014). Prospects for the use of agricultural waste for energy production in Ukraine. *7th analytic note of the bioenergy association of Ukraine.* Kyiv. Retrieved from: https://uabio.org/wp-content/uploads/2020/04/position-paper-uabio-7-ua.pdf

110. Ginni, G., Kumar, S.A., Usman, T.M.M., Pakonyi, P., & Banu, J.R. (2020). Chapter 13 – Integrated biorefineries of food waste. *Food waste to valuable resources. Application and management* (pp. 275-298). Britany: Academic press. doi: 10.1016/B978-0-12-818353-3.00013-4

111. Gong, F., Cai, Z., & Li Y. (2016). Synthetic biology for CO_2 fixation. *Science China-Life Sciences*. 59, 1106—1114 doi: 10.1007/s11427-016-0304-2

112. Gong, Ch., Meng, X., Jin, C., Yang, M., Liu, J., Sheng, K., Pu, Y., Ragauskas, A., Ji, G., & Zhang, X. (2023). Green synthesis of cellulose formate and its efficient conversion into 5-hydroxymethylfurfural. *Ind Crops and Prod*, 192, 115985 doi:10.1016/jindcrop.2022.115985

113. Gonzalez-Garcia, R.A., McCubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L.K., & Marcellin E. (2017). Microbial Propionic Acid Production. *Fermentation*, 3(2), 1-21. doi: 10.3390/fermentation3020021

114. de Gonzalo, G., Colpa, D.I., Habib, M.H.M., & Fraaije, M.W. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, 236, 110-119. doi: 10.1016/j.jbiotec. 2016.08.011

115. Grimmler, C., Janssen, H., Krauβe, D., Fischer R.-J., Bahl, H., Durre, P., Liebl, W., & Ehrenreich, A. (2011). Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology Physiology*, 20 (1), 1-15. doi: 10.1159/000320973

116. Grippi, D., Clemente, R., & Bernal, M.P. (2020). Chemical and bioenergetic characterization of biofuels from plant biomass: perspectives for Southern Europe. *Appl Sci*, 10(10), 3571. doi: 10.3390/app10103571

117. Guo, Y., Liu, Y., Guan, M., Tang, H., Wang, Z., Lin, L., & Pang, H. (2022). Production of butanol from lignocellulosic biomass: recent advances, challenges, and prospects. *RSC Advances,* 12, 18848-18863. doi: 10.1039/D1RA09396G

118. Gupta, K.H., Nowicki, C., Giurini, E.F., Marzo, A.L., & Zloza, A. (2021). Bacterial-Based Cancer Therapy (BBCT): Recent Advances, Current Challenges, and Future Prospects for Cancer Immunotherapy. *Vaccines*, 9(12), 1497. doi:10.3390/vaccines9121497

119. Haldar, D., & Purkait, M.K. (2020). Lignocellulosic conversion into value-added products: A review. *Process Biochemistry*, 89, 110-133. doi: 10.1016/j.procbio.2019.10.001

120. Han, J., & Morag, C. (1995). The influence of the sigmoid function parameters on the seed of backpropagation learning. *From Natural to Artificial Neural Computation,* 930, 195-201. doi: 10.1007/3-540-59497-3-175

121. Han, Y.F., Xie, B.T., Wu, G.X., Guo, Y.Q., Li, D.-M., & Huang, Z.-Y. (2020). Combination of Trace Metal to Improve Solventogenesis of Clostridium carboxidivorans P7 in Syngas Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-12. doi: 10.3389/ fmicb.2020.577266

122. Hasan, M., Abedin, M.Z., Amin, M.B., Nekmahmud, M., & Olah, J. (2023). Sustaninable biofuel economy: A mapping through bibliometric research. *Journal of Environmental Management,* 336, 117644. doi: 10.1016/j.jenvman.2023.117644

123. Hasan, R., Aktar, N., Kabir, S.M.T., Honi, U., Halim, A., Islam, R., Sarker, M.D.H., Haque, M. S., Alam, M.M., & Islam, M.S. (2020). Pectinolytic Bacterial Consortia Reduce Jute Retting Period and Improve Fibre Quality. *Sci Rep*, 10, 5174. doi: 10.1038/s41598-020-61898-z

124. He, C.R., Kuo, Y.Y., & Li, S.Y. (2017). Lignocellulosic butanol production from Napier grass using semi-simultaneous saccharification fermentation. *Bioresource Technology,* 231, 101-108. doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.039

125. Herrmann, G., Jayamani, E., Mai, G., & Buckel, W. (2008). Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 190 (3), 784-791. doi: 10.1128/JB.01422-07

126. Hierro, A.G.D., Moreno-Cid, J.A., & Casey, E. (2024). Continuous biomanufacturing for sustainable bioeconomy applications. *EFB Bioeconomy Journal*, 4, 100071. doi: 10.1016/j.bioeco.2024.100071

127. Hocq, R., Bouilloux-Lafont, M., Ferreira, N. L., & Wasels, F. (2019). σ 54 (σ L) plays a central role in carbon metabolism in the industrially relevant *Clostridium beijerinckii*. *Scientific Reports*, 9 (1), 7228. doi: 10.1038/s41598-019-43822-2

128. Hrab, P., Ruckert, C., Busche, T., Ostash, I., Kalinowski, J., Fedorenko, V., Yushchuk, O., & Ostash, B. (2021). Complete genome sequebce of *Streptomyces cyanogenus* S136, producer of anticancer angucycline landomycin A. *3Biotech*, 11(6), 282. doi: 10.1007/s13205-021-02834-4

129. Hristoskiva, S.P., Yocheva, L.D., Yankov, D.S., & Danova, S.T. (2018). Newly characterized butyrate producing *Costridium* sp. stain 4a1, isolated from chickpea beans (*Cicer arietinum L.). Bulgarian chemical communication,* 50(3), 459-466.

130. Hu, S., Zheng, H., Gu, Y., Zhao, J., Zhang, W., Yang, Y., Wang, S., Zhao, G., Yang, S., & Jiang, W. (2011). Comparative genomic and transcriptomic analysis revealed genetic characteristics related to solvent formation and xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* EA 2018. *BMC Genomics*, 12 (1), 93. doi: 10.1186/1471-2164-12-93

131. Humphreys, R.J., Debebe, B.J., Diggle, S.P., & Winzer, K. (2023). *Clostridium beijerinckii* strain degeneration is driven by the loss of Spo0A activity. *Frontiers in Microbiology*, 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.1075609.

132. Huzir, M.N., Aziz, A.M.M., Ismail, S.B., Adbullah, B., Mahmood, N.A.N., Umor, N.A., & Muhammad, S.F.A.S. (2018). Agro-industrial waste to biobutanol production: Eco-friendly biofuels for next generation. *Renewable and sustainable energy reviews*, 94, 476-485. doi: 10.1016/j.rser.2018.06.036

133. Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P.F., Land, L.M., Larimer, F.W., & Hauser, L.J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identifcation. *BMC Bioinformatics*, 11, 119. doi: 10.1186/1471-2105-11-119

134. Ibitoye, E.S., Mahamood, R.M., Jen, T.-C., Loha, C., & Akinlabi, E.T. (2023). An overview of biomass solid fuels: Biomass sources, processing methods, and morphological and microstructural properties. *Journal of Bioresources and Bioproducts,* 8(4), 333-360. doi: 10.1016/j.jobab.2023.09.005

135. Illumina. Getting started with next-generation sequencing (NGS). (2023). Illumina inc.

136. Inui, M., Suda, M., Kimura, S., Yasuda, K., Suzuki, H., Toda, H., Yamamoto, S., Okino, S., Suzuki, N., & Yukawa, H. (2008). Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli. Applied Microbiology and Biotechnology*, 77 (6), 1305-1316. doi: 10.1007/s00253-007-1257-5

137. Iwaki, A., Kawai, T., Yamamoto, Y., & Izawa, S. (2013). Biomass Conversion inhibitors furfural and 5-Hydroxymethylfurfural Induce Formation of Messenger RNP Granules and Attenuate Translation activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology,* 79 (5), 1661-1667. doi: 10.1128/AEM.02797-12

138. Jahangeer, M., Rehman, M.U., Nelofer, R., Nadeem, M., Munir, B., Smulek, W., Jesionowski, T., & Qamar, S.A. (2024). Biotransformation of lignocellulosic biomass to value-added boiproducts: insights into bio-saccharification strategies and potential concerns. *Top Catal.* doi: 10.1007/s11244-024-01941-9

139. Jafarov, M.A., Yevdokymenko, V.O., Kamenskyh, D.S., Rustamov, K.A., & Jafarov, Z.A. (2023). Mathematical modeling of hexafluoro salicate ammonia desublimation. *Evolutions Mech Eng*, 4(4), 000595. doi: 10.31031/EME.2023.04.000595

140. Jawad, M., Wang, H., Wu, Y., Rehman, O., Song, Y., Xu, R., Zhang, Q.,

Gao, H., & Xue, C. (2024). Lignocellulosic ethanol and butanol production by Saccharomyces cerevisiae and *Clostridium beijerinckii* co-culture using non-detoxified corn stover hydrolysate. *Journal of Biotechnology,* 379, 1-5. doi: 10.1016/j.jbiotec.2023.11.002

141. Jaismal, N., Agarwal, A., & Tripathi, A.D. (2021). Application of microorganisms for biofuel production. *Bioenergy Research: Basic advanced concepts. Clean Energy Production Technologies* (pp. 35-72). Singapore: Springer. doi: 10.1007/978-981-33-4611-6_2

142. Jayaraman, K., Anbuchezhiyan, G., Mubarak, M.N., Hosseini-Bandegharaei, A., & Abnisa, F. (2024). Exploring the combustion, emission and performance of n-butanol with Deccan hemp oil methyl ester on dual fuel diesel engine. *Scientific Reports,* 14, 28015. doi: 10.1038/s41598-024-78966-3

143. Jensen, O.R., Schulz, F., Roux, S., Klingeman, D.M., Mitchell, W.P., Udwary, D., Morais, S., Reynoso, V., Winkler, J., Nagaraju, S., Tissera, S.D., Shapiro, N., Ivanova, N., Reddy, T.B.K., Mizrahi, I., Utturkan, S.M., Bayer, E.A., Woyke, T., Mouncey, N.J., Jewett, M.C., Simpson, S.D., Kopke, M., Jones, D.T., & Brown, S.D. (2024). Phylogenomics and genetic analysis of solvent-producing *Clostridium* species. *Scientific Data,* 11, 432. doi: 10.11038/s41597-024-03210-6

144. Jeong, S.H., Lee, H.J., & Lee, S.J. (2024). Use of paired Cas9-NG nickase and truncated sqRNAs for single-nucleotide microbial genome editing. *Front Genome Ed*, 6, 1471720. doi: 10.3389/fgeed.2024.1471720

145. Jiang, Y., Lv, Y., Wu, R., Lu, J., Dong, W., Zhou, J., Zhang, W., Xin, F., & Jiang, M. (2020). Consolidated bioprocessing performance of a two-species microbial consortium for butanol production from lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering,* 117 (10), 2985-2995. doi: 10.1002/bit.27464

146. Jiang, Y., Wu, R., Lu, J., Dong, W., Zhou, J., Zhang, W., Xin, F., & Jiang, M. (2021). Quantitative proteomic analysis to reveal expression difference for butanol production from glycerol and glucose by *Clostridium sp.* stain CT7.

*Microb Cell Fac*t, 20 (12). doi: 10.1186/s12934-021-01508-3

147. Jiang, Y., Wu, R., Zhou, J., He, A., Xu, J., Xin, F., Zhang, W., Ma., J., Jiang, M., & Dong, W. (2019). Recent advances of biofuels and biochemicals production from sustainable resources using co-cultivation system. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 155. doi: 10.1186/s13068-019-1495-7

148. Jiang, Y., Xu, C., Dong, F., Yang Y., Jiang W., & Yang S. (2009). Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metabolic Engineering*, 11 (4-5), 284-291. doi: 10.1016/j.ymben.2009.16.002

149. Jimenez-Bonilla, P., Wang, S., Whitfield, T., Blersch, D., Wang, Y., Gonzales-de-Bashan, L.-E., Luo, W., & Wang, Y. (2024). Tolerance in solventogenic clostridia for enhanced butanol production: genetic mechanisms and recent strain engineering advances. *Synthetic Biology and Engineering*, 2(2), 10007. doi: 10.35534/sbe.2024.10007

150. Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C.-fon F., & Ji, J. (2011). Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (8), 4080-4106. doi: 10.1016/j.rser.2011.06.001

151. Johnson, J.S., Spakowicz, J.D., Hong, B.-Y., Petersen, L.M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S.R., Hanson, B.M., Agresta, H.O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G.M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun*, 10 (1), 5029. doi: 10.1038/s41467-019-13036-1

152. Jones, D.T. (2024). The industrial fermentation process and *Clostridium* species used to produce biobutanol. *Applied microbiology,* 4(2), 894-917. doi: 10.3390/applmicrobiol4020061

153. Jones, S.W., Tracy, B.P., Gaida, S.M., & Papoutsakis E.T. (2011). Inactivation of sigma (F) in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 blocks sporulation prior to asymmetric division and abolishes sigma (E) and sigma (G) protein expression but does not block solvent formation. *Journal of Bacteriology*, 193 (10), 2429-2440. doi: 10.1128/JB.00088-11

154. Jones, D.T., van der Westhuizen, A., Long, S., Allcock, E.R., Reid, S.J., & Woods, D.R. (1982). Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environtal Microbiology*, 43 (6), 1434-1439. doi: 10.1128/aem.43.6.1434-1439.1982.

155. Jones, D.T., Schulz, F., Roux, S., & Brown, S.D. (2023). Solvent-producing clostridia revisited. *Microorganisms*, 11(9), 2253. doi: 10.3390/microorganisms11092253

156. Jonsson, J.L., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 6 (16). doi: 10.1186/1754-6834-6-16

157. Joseph, R.C., & Sandoval, N.R. (2023). Single and multiplexed gene repression in solventogenic *Clostridium* via Cas12a-based CRISPR interference. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8 (1), 148-156. doi: 10.1016/j.synbio.2022.12.005

158. Joshi, A., Verma, K.V., Rajput, V.D., Minkina, T., & Arora, J. (2022). Recent advances in metabolic engineering of microorganisms for advancing lignocellulose-derived biofuel. *Bioengineered*, 13(4), 8135-8163. doi: 10.1080/21655979.2022.20511856

159. Kansaye, A., Nebie, B., Kansaye, L., Nantoiallah, E., Dicko, G., & Niangaly, O. (2023). Characterization of new sugar sorghum varieties (Sorghum bicolor L. Moench) for grain and sugar yield under two growing conditions in the Sudano-Sahelian zone of Samanko, Mali. *IJSRM*, 11(1), 379-388. doi: 10.18535/ijsrm/v11i01.ah01

160. Karakas, E., Ferrante, P., Schafleitner, R., Giuliano, G., Fernie, A.R., & Alseekh, S. (2023). Plant sample collection and shipment for multi-omic analyses and phytosanitary evolution. *Current protocols*, 3 (12), e952. doi:10.1002/cpz1.952

161. Karayannis, D., Angelous, N., Vasilakis, G., Charisteidis, I., Litinas, A., & Papanikolaou, S. (2024). A non-aseptic bioprocess for production and recovery of 2,3-butanediol via conversion of crude glycerol and corn steep liquor

at pilot-scale. *Carbon resource conversion,* 100242. doi:10.1016/j.crcon.2024.100242

162. Karimi, M., Jenkins, B., & Stroeve, P. (2014). Ultrasound irradiation in the production of ethanol from biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviws,*40, 400-421. doi: 10.1016/j.rser. 2014.07.151

163. Karimi, K., Khoshnevisan, B., & Denayer, J.F.M. (2024). Critical impacts of energy targeting on the sustainability of advanced biobutanol separation. *Biofuel Research Journal,* 41, 1999-2012. doi: 10.18331/BRJ2024.11.1.2.

164. Karki, B., Lamsal, B.P., Jung, S., van Leeuwen, J., Pometto III, A.L., Grewell, D., & Khanal, S.K. (2010). Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. *Journal of Food Engineering*, 96 (2), 270-278. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2009.07.023

165. Karki, B., Maurer, D., & Jung, S. (2011). Efficiency of pretreatments for optimal enzymatic saccharification of soybean fiber. *Bioresource Technology*, 102 (11), 6522-6528. doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.014

166. Karthikeyan, K.P., Bandulasena, H.C.H., & Radu, T. (2024). A comparative analysis of pre-treatment technologies for enhanced biogas production from anaerobic digestion of lignocellulose waste. *Industrial crop and products,* 215, 118591. doi: 10.1016/j.indcrop.2024.118591

167. Kasprzak, J. (2024). *Development of process configurations and simulation of biobutanol production using DWSIM*. (Master's thesis). Royal Military College of Canada, Canada.

168. Katam, K., Saisriyoot, M., Roddecha, S., Pornwongthong, P., & Sriariyanum, M. (2023). Conversion of lignocellulose residue obtained from biorefinery steam to electricity by microbial fuel cell. *RFC,* 428, 01011. doi: 10.1051/e3sconf/202342801011

169. Khunnonkwao, P., Thitipraser, S., Jaiaue, P., Khumrangsee, K., Cheirsilp, B., & Thongchul, N. (2024). The outlooks and key challenges in renewable biomass feedstock utilization for value-added platform chemical via bioprocesses. *Heliyon*, 10(10), e30830. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e30830.

170. Kihara, T., Noguch, T., Tashiro, Y., Sakai, K., & Sonomoto, K. (2019). Highly efficient continuous acetone—butanol—ethanol production from mixed sugars without carbon catabolite repression. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100185. doi: 10.1016/j.biteb.2019.03.017

171. Kim, J.-H., Block, D.E., & Mills, D.A. (2010). Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulose biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88 (5), 1077-1085. doi: 10.1007/s00253-010-2839-1

172. Kim, S., Jang, Y.-S., Ha, S.-C., Ahn, J.-W., Kim, E.-J., Lim, J.H., Cho, C., Ryu, S.Y., Lee, K.S., Lee, S.Y., & Kim, K.-J. (2015). Redox-switch regulatory mechanism of thiolase from *Clostridium acetobutylicum*. *Nature Communications*,6 (22), 8410-8421. doi: 10.1038/ncomms9410

173. Kluczyk, M. (2024). Influence of butanol-diesel oil fuel blends on marine engine vibration characteristics. *Advances in Science and Technology Research Journal*, 18(5), 372-384. doi: 10.12913/22998624/190834

174. Knoot, C.J., Ungerer, J., Wangikar, P.P., & Pakrasi, H.B. (2018). Cyanobacteria: promising biocatalysts for sustainable chemical production. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 5044-5052. doi: 10.1074/jbc.R117.815886

175. Konovalov, S., Patrylak, L., Zubenko, S., Okhrimenko, M., Yakovenko, A., Levterov, A., & Avramenko, A. (2021). Alkali synthesis of fatty acid butyl and ethyl esters and comparative bench motor testing of blended fuels on their basis. *Chemistry & Chemical Technology*, 15 (1), 105-177. doi: 10.23939/chcht15.01.105

176. Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G., & Durre, P. (2010). *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *PNAS*, 107 (29), 13087-13092. doi: 10.1073/pnas. 1004716107

177. Kugedera, A.T., Nyamadzawo, G., Mandumbu, R., & Kokerai, L.K. (2023). Enhancing *Sorghum bicolor* (L.) grain yield with the use of field edge

rainwater harvesting and NPK fertiliser in a dry region of Zimbabwe. *J Sustain Agric Environ*, 2(1), 58-67. doi: 10.1002/sae2.12034

178. Kumar, S., Agyeman-Duah, E., Awaga-Cromwell, M.M., & Ujor, V.C. (2024). Transcriptomic characterization of recombinant *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 expressing methylglyoxal synthase and glyoxal reductase from *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. *Applied and Environmental Microbiology*, 90 (10), 1-18. doi: 10.1128/aem.01012-24

179. Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (8), 3713-3729. doi: 10.1021/ie801542g

180. Kumar, M., Gayen, K., & Saini, S. (2013). Role of extracellular cues to trigger the metabolic phase shifting from acidogenesis to solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Bioresource Technology,* 138, 55-62. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.159

181. Kumar, K., Jadhav, M.S., & Moholkar, V.S. (2024). Acetone-Butanol-Etanol (ABE) fermentation with Clostridial Co-cultures for Enhanced Biobutanol Production. *PSEP*, 185, 277-285 doi: 10.1016/j.psep.2024.03.027

182. Kumar, C.M., Mugunthan, M., Kapoor, C.R., & Pandalanghat, C.S. (2019). Speciation of fungi using real time PCR with molecular beacons: can we solve the enigma of diagnosis of invasive fungal disease. *Medical Journal Armed Forces India*, 75, 41-49. doi: 10.1016/j.mjaf.2017.12.003

183. Kusuma, A.B., Nouiouai, I., Klenk, H.-P., & Goodfellow, M. (2020). *Streptomyces harenosi* sp. nov., a home for a gifted strain isolated from Indonesian sand dune soil. *Int J Syst Evol Microbiol,* 70, 4874-4882. doi:10.1099/ijsem.0.004346

184. Lan, E.I., & Liao, J.C. (2011). Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. *Metabolic Engineering,* 13, 353-363. doi: 10.1016/j.ymben. 2011.04.004

185. Lan, E.I., Ro, S.Y., & Liao, J.C. (2013). Oxygen-tolerant coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase facilitates efficient photosynthetic n-butanol biosynthesis in cyanobacteria. *Energy & Environmental Science*, 6, 2672-2681. doi: 10.1039/c3ee41405a

186. Landlinger, C., Preuner, S., Baskova, L., van Grotel, M., Hartwig, N.G., Dworzak, M., Mann, G., Attarbaschi, A., Kager, L., Peters, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., van den Heuvel-Eibrik, M.M., & Lion, T. (2010). Diagnosis of invasive fungal infections by a realtime panfungal PCR assay in immunocompromised pediatric patients. *Leukemia*, 24 (12), 2032—2038. doi: 10.1038/leu.2010.20933

187. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thomposon, J.D., Gibson, T.J., & Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404

188. Laurencelle, L., & Cousineau, D. (2023). Analysis of proportions using arcsine transform with any experimental design. *Front Psychol*, 13, 1045436. doi: 10.3389/fpsyg.2022.1045436

189. Lee, J., & Blaschek, H.P. (2001). Glucose uptake in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the solvent-hyperproducing mutant BA101. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (11), 5025-5031. doi: 10.1128/AEM.67.11.5025-5031.2001

190. Lee, S.K., Chou, H., Ham, T.S., Lee, T.S., & Keasling, J.D. (2008). Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 556-563. doi: 10.1016/j.copbio.2008.10.014

191. Lee, J., Mitchell, W.J., Tangney, M., & Blaschek, H.P. (2005). Evidence for the presence of an alternative glucose transport system in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the solvent-hyperproducing mutant BA101.

Applied and Environmental Microbiology, 71 (6), 3384-3387. doi: 10.1128/AEM.71.6.3384-3387.2005

192. Lei, Z., Leyn, S.A., Yang, G., Jiang, W., Rodionov, D.A., & Yang C. (2012). Ribulokinase and transcriptional regulation of arabinose metabolism in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology,* 194 (5), 1055-1064. doi: 10.1128/JB.06241-11.

193. Li, H., Chen, B., Kulachenko, A., Jurkjane, V., Mathew, A.P. & Sevastyanova, O. (2024). A comparative study of lignin-containing microfibrillated cellulose fibers produced from softwood and hardwood pulps. *Cellulose,* 31, 907-926. doi: 10.1007/s10570-023-05674-y

194. Li, Z., & Cheng, X. (2024). Progress in the preparation of biomass energy from steam-exploded lignocellulose. *Advances in Engineering Innovation,* 9, 47-56. doi: 10.54254/2977-3903/9/2024095

195. Li, H., Durbin, R., & Notes A. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrowa-Wheeler transform. *Bioiformatics*, 26 (5), 589-595. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698

196. Li, B., Gao, W., Pan, Y., Yao, Y., & Liu, G. (2024). Progress in 1,3-propanediol biosynthesis. *Front Bioeng Biotechnol,* 12, 1507680. doi: 10.3389/fbioe.2024.1507680

197. Li, F., Hinderberger, J., Seedorf, H., Zhang, J., Buckel, W., & Thauer, R.K. (2008). Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme a (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri. Journal of Bacteriology*, 190 (3), 843-850. doi: 10.1128/JB.01417-07

198. Li, S., Huang, L., Ke, Ch., Pang, Z., & Liu, L. (2020). Pathway dissection, regulation, engineering and application: lessons learned from biobutanol production by solventogenic clostridia. *Biotechnology for Biofuels,* 13(39). doi: 10.1186/s13068-020-01674-3

199. Li, W., O'Neill, K.R., Haft, D.H., DiCucco, M., Chetvernin, V., Badretdin, A., Coulouris, G., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Durkin, A.S.,

Gonzales, N.R., Gward, M., Lanczycki, C.J., Song, S.J., Thanki, N., Wang, J., Yamashita, R.A., Yang, M., Zheng, C., Marchler-Bauer, A., & Thibaud-Nissen, F. (2021). RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Research*, 49 (N D1), D1020-D1028. doi: 10.1093/nar/gkaa1105

200. Li, Z., Waghmare, R.P., Dijkhuizen, L., Meng, X., & Liu, W. (2024). Research advances on the consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass. *Eng Mic*, 4, 100139. doi: 10.1016/j.engmic.2024.100139

201. Li, T.G., Wu, Y.R., & He, Z.J. (2018). Heterologous expression, characterization and application of a new beta-xylosiadase indentified in solventogenic *Clostridium* sp. Strain BOH3. *Process Biochemistry*, 68, 99-104. doi: 10.1016/j.procbio.2018.02.003

202. Liang, Q., Zhang, F., Li, Y., Zhang, X., Li, J., Yang, P., & Qi, Q. (2015). Comparison of individual components deletions in a glucose-specific phosphotransferase system revealed their different application. *Scientific Reports*, 5, 13200. doi: 10.1038/srep13200

203. Liberato, V., Benevenuti, C., Coelho, F., Botelho, A., Amaral, P., Pereira Jr., N., & Ferreira, T. (2019). *Clostridium* sp. as Bio-Catalyst for Fuels and Chemicals Production in a Biorefinery Context. *Catalysts*, 9 (11), 1-37. doi: 10.3390/catal9110962

204. Liiv, J., Maeorg, U., Vaino, N., & Rikmann, E. (2024). Low-temperature and Low-pressure HydroThermal Liquefaction (L-HTL) of biomass using ultrasonic cavitation to achieve a local supercritical state in water. *STET*, 79, 3. doi: 10.2516/stet/2023043

205. Lin, Z., Conh, W., & Zhang, J. (2023). Biobutanol production from acetone-butanol-ethanol fermentation: developments and prospects. *Fermentation*, 9(9), 847. doi: 10.3390/fermentation9090847

206. Lin, P.P., Mi, L., Moriok, A.H., Yoshino, K.M., Konishi, S., Xu, S.C., Papanek, B.A., Riley, L.A., Guss, A.M., & Liao, C.J. (2015). Consolidated

bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*. *Metabolic Engineering*, 31, 44-52. doi: 10.1016/j. ymben.2015.07.001

207. Ling Y., & He, B. (1993). Entropic analysis of biological growth models. *IEEE Trans Biomed Eng*, 40(12), 1193-2000. doi: 10.1109/10.250574

208. Liu, H., Wang, X., Zhang, D., Dong, F., Liu, X., Yang, Y., Huang, H., Wang, Y., Wang, Q., & Zheng, Z. (2019). Investigation on Blending effects of glasoline fuel with N-butanol, DMF, and Ethanol on the Fuel Consumption and Harmful Emission in a GDI Vehicle. *Energies*, 12 (10), 1845. doi: 10.3390/en12101845

209. Liu, D., Yang, X., Zhang, L., Tang, Y., He, H., Liang, M., Tu, Z., & Zhu, H. (2022). Immobilization of biomass materials for removal of refractory organic pollutants from wastewater. *Int J Environ Res Public Health*, 19 (21), 13890. doi:10.3390/ijerph192113830

210. Lopez-Linares, J.C., Lucas, S., Garcia-Cubero, M.T., Jimenez, J.J., & Coca, M. (2020). A biorefinery based on brewer's spent grains: arabinoxylans recovery by microwave assisted pretreatment integrated with butanol production. *Industrial crops and products*, 158, 113044. doi:10.1016/j.indcrop.2020.113044

211. Luan, G., & Lu, X. (2018). Tailoring cyanobacterial cell factory for improved industrial properties. *Biotechnology Advances*, 36, 430-442. doi: 10. 1016/j.biotechadv.2018.01.005

212. Luo, H., Liu., Z., Xie F., Bilal, M., & Peng, F. (2021). Lignocellulose biomass to biobutanol: Toxic effects and response mechanism of the combined stress of lignin-derived phenolic acids and phenolic aldehydes to *Clostridium acetobutylicum*. *Ind Crops and Prod*, 170, 113722. doi: 10.1016/jindcrop.2021.113722

213. Luschini, A.C., Rego, E.E., & Montebello, N. (2024). How did the Russia-Ukraine war impact energy imports and electricity generation? A comparative analysis between Germany and United Kingdom. *The electricity Journal*, 37 (3), 107396. doi: 10.1016/j.tej.2024.107396

214. Lütke-Eversloh, T., & Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (5), 634-647. doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.11

215. Lynd, L.R., Liang, X., Biddy, M.J., Allee, A., Cai, H., Foust, T., Himmel, M.E., Laser, M.S., Wang, M. & Wyman, C.E. (2017). Cellulosic ethanol: Status and innovations. *Current Opinion in Biotechnology*, 45, 202-211. doi: 10.1016/j.copbio.2017.03.008

216. Ma, K., Hutchins, A., Sung, S.-J.S., & Adams, M.W. (1997). Pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*, functions as a CoA-dependent pyruvate decarboxylase. *PNAS*, 94 (18), 9608-9613. doi: 10.1073/pnas.94.18.9608

217. Ma, C., Kojima, K., Xu, N., Mobley, J., Zhou, L., Yang, S.-T., & Liu, X.M. (2015). Comparative proteomics analysis of high n-butanol producing metabolically engineered *Clostridium tyrobutyricum. Journal of Biotechnology*, 193, 108-119. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.10.036

218. Ma, C., Ni, L., Guo, Z., Zeng, H., Wu, M., Zhang, M., & Zheng, B. (2022). Principle and application of steam explosion technology in modification of food fiber. *Foods,* 11 (21), 3370. doi: 10.3390/foods11213370

219. Mainguet, S.E., Gronenberg, L.S., Wong, S.S., & Liao, J.C. (2013). A reverse glyoxylate shunt to build a non-native route from C-4 to C-2 in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 19, 116-127. doi: 10.1016/j.ymben.2013.06.004

220. Malgas, S., Kwanya Minghe, V.M., & Pletschke, B.I. (2020). The effect of hemicellulose on the binding and activity of cellobiohydrolase I, Cel7A, from *Trichoderma reesei* to cellulose. *Cellulose,* 27, 781-797. doi: 10.1007/s10570-019-02848-5.

221. Maliha, A., & Abu-Hijleh, B. (2023). A review on the current status and post-pandemic prospects of third-generation biofuels. *Energy System*, 14, 1185-1216. doi: 10.1007/s12667-022-00514-7

222. Malik, K., Capareda, S.C., Kamboj, B.R., Malik, S., Singh, K., Arya, S., & Bishnoi, D.K. (2024). Biofuels production: a review on sustainable alternatives to traditional fuels and energy sources. *Fuels,* 5 (2), 157-175. doi: 10.3390/fuels5020010

223. Malleck, T., Fekraoui, F., Bornard, I., Henry, C., Haudebourg, E., Planchon, S., & Broussolle, V. (2022). Insights into the Structure and Protein Composition of Moorella thermoacetica Spores Formed at Different Temperatures. *Int J Mol Sci*, 23, 550. doi: 10.3390/ijms23010550

224. Marouani, I., Guesmi, T., Alshammari, B.M., Alqunun, K., Alzamil, A., Alturki, M., & Abdallah, H.H. (2023). Integration of renewable-energy-based green hydrogen into the energy future. *Processes,* 11 (9), 2685. doi: 10.3390/pr11092685

225. Medina, J.D.C., Bolanos, F., Magalhaes Jr., A.I., Woiciechowski, A.L., de Carvalho, J., & Soccol, C.R. (2024). Sustainable production of biofuels using different microbial consortia: the state of the art. *Biofpr,* 18 (5), 1690-1710. doi: 10.1002/bbb.2613

226. Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., Valkonen, S., Korhonen, O., Fernandes, F.M., & Yliperttula, M. (2021). Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm. *Journal of Controlled Release,* 336, 480-498. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.06.042

227. Menzel, P., Ng, K., & Krogh, A. (2016). Fast and sensitive taxonomic classifcation for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 7, 11257. doi: 10.1038/ncomms11257

228. Michaelides, E.E. (2012). *Biomass. Alternative energy sources.* Berline, H: Springer-Verlag. doi: 10.1007/987-3-642-20951-2-10

229. Mignogna, D., Szado, M., Ceci, P., & Avino, P. (2024). Biomass energy and biofuels: perspective, potentials, and challenges in the energy transition. *Sustainability,* 16 (16), 7036. doi: 10.3390/su16167036

230. Millon, L., Larosa, F., Lepiller, Q., Legrad, F., Rocchi, S., Daguindau, E., Scherer, E., Bellanger, A.-P., Leroy, J., & Grenouillet, F. (2013). Quantitative

polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clinical Infectious Diseases*, 56 (10), 95-101. doi: 10.1093/cid/cit094

231. Minor M.C., Takayesu, A., Ha, M.S., Salwinski, L., Sawaya, R.M., Pellegrini, M., & Clubb, R.T. (2024). A genomic analysis reveals the diversity of cellulosome displaying bacteria. *Front Microbiol*, 15. doi: 10.3389/fmicb.2024.1473396

232. Mittermeier, F., Baumler, M., Arulrajah, P., Lima, G.J.J., Hauke, S., Stock, A., & Weuster-Botz, D. (2022). Artificial microbial consortia for bioproduction processes. *Eng Life Sci*, 23, e2100152 doi: 10.1002/elsc.202100152

233. Mohan, P., Mohd Yusof, N.S., Thomas, S., & Abd Rahman, N.M.M. (2024). Ultrasound-alkali-assisted isolation of cellulose from coconut shells. *BioResources*, 19(4), 7870-7885. doi:10.15376/biores.19.4.7870-7885

234. Molnar-Nagy, V., Tso, K.-H., Hall, J.W., Tellez-Isaias, G., Hernandez-Velasco, X., Layton, S., & Bata, Z. (2022). Effect of different nutritional zinc forms on the proliferation of beneficial commensal microorganisms. *Microbiol Res*, 13, 500-513. doi:10.3390/microbiolres13030034

235. Mudryk, K., Jewiarz, M., Wróbel, M., Niemiec, M., & Dyjakon, A. (2021). Evaluation of Urban Tree Leaf Biomass-Potential, Physico-Mechanical and Chemical Parameters of Raw Material and Solid Biofuel. *Energies*,14 (4), 818. doi:10.3390/en14040818

236. Mujtaba, M., Fraceto, L.F., Fazeli, M., Mukherjee, S., Savassa, S.M., de Medeiros, G.A., Pereira, A.E.S., Mancini, S.D., Lipponen, J., & Vilaplana, F. (2023). Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. *Journal of Cleaner Production*, 402, 136815. doi: 10.1016/j.clepro.2023.136815

237. Mukherjee, M., Sarkar, P., Goswami, G., & Das, D. (2019). Regulation of butanol biosynthesis in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 under the influence of zinc supplementation and magnesium starvation. *Enzyme Microb*

Technol, 129, 109352. doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.05.009

238. Muller, V. (2019). New horizons in acetogenic conversion of one-carbon substrates and biological hydrogen storage. *Trends in Biotechnology*, 37 (12), 1344-1354. doi: 10.1016/j.tibtech. 2019.05.008

239. Munoz-Munoz, D., & Lopez-Galan, J.-E. (2024). Butanol production draw from lignocellulosic residues under the biorefinery approach: Bibliometrical analysis. *Biotechnologia en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 22 (1), 87-104, doi: 10.18684

240. Mussatto, S.I., & Roberto, I.C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. *Bioresource Technology*, 93 (1), 1-10. doi: 10.1016/j.biortech.2003.10.005

241. Nabila, D.S., Chan, R., Syamsuri, P.R.R., Nurlilasari, P., Wan-Mohtar, W.A.A.Q.I., Ozturk, A.B., Rossiana, N., & Doni, F. (2024). Biobutanol production from underutilized substrates using *Clostridium:* unlocking untapped potential for sustainable energy development. *Curr Res Microb Sci*, 7, 100250. doi: 10.1016/j.crmicr.2024.100250

242. Nair, V.R., Green, E.M., Watson, D.E., Bennett, G.N., & Papoutsakis, E.T. (1999). Regulation of the sol locus ganes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor. *Journal of Bacteriology*, 181 (1), 319-330. doi: 10.1128/JB.181.1.319-330.1999

243. Najim, A.A., Radeef, A.Y., al-Doori, I., & Jaabar, Z.H. (2024). Immobilization: the promising technique to protect and increase the efficiency of microorganisms to remove contaminants. *Chem Techn Biotechn*, 99 (8), 1707-1733. doi: 10.1002/jctb.7638

244. Nakayama, S., Kiyoshi, K., Kadokura, T., & Nakazato, A. (2011). Butanol production from crystalline cellulose by cocultured *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N 1-4. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (18), 6470-6475. doi: 10.1128/AEM.00706-11

245. Nanadal, P., Sharma, S., & Arora, A. (2020). Bioprospecting non-conversional yeasts for ethanol production from rice straw hydrolysate and their inhibitor tolerance. *Renewble Energy*, 147 (1), 1694-1703. doi: 10.1016/j.renene.2019.09.067

246. Nawab, S., Wang, N., Ma, X., & Huo, Y.-X. (2020). Genetic engineering of non-native hosts for 1-butanol production and its challenges: a review. *Microbial Cell Factories*, 19, 79. doi: 10.1186/s12934-020-01337-w

247. Nawan, & Handayani, S. (2021). Molecular identification of *Streptomyces* sp. isolated from peat land of Palangka Raya, Kalimantan Tengah using 16 S rRNA gene sequences analysis. *RJPT*, 14(12), 6639-6644 doi: 10.52711/0974-360X.2021.01147

248. Nazli, R. I., Aslankaciran, C., Yang, D., Liaqat, W., Polat, M., Cavdar, A. S., Tansi, V., & Baloch, F. S. (2024). Assessment of sweet sorghum genotypes for bioethanol production potential and bagasse combustion characteristics in a Semi-Arid Mediterranean Climate. *Agronomy*, 14(11), 2626. doi: 10.3390/agronomy14112626

249. Nederbragt, A.J. (2014). On the middle ground between open source and commercial software — the case of the Newbler program. *Genome Biology*, 15, 113. doi: 10.1186/gb4173

250. Nguyen, T. (2024). *Development of genome editing method for metabolic engineering of Clostridium pasteurianum reveals new features of metabolism*. (Doctoral Thesis). Technische Universitat Hamburg, Hamburg.

251. Ni, Y., Xia, Z., Wang, Y., & Sun, Z. (2013). Continious butanol fermentation from inexpressive sugar-bfsed feedstocks by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864. *Bioresource Technology*, 129, 680-685. doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.142

252. Nielsen, D.R., Leonard, E., Yoon, S.-H., Tseng, H.-C., Yuan, C., & Prater, J.K.L. (2009). Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metabolic Engineering*, 11 (4-5), 262-273. doi: 10.1016/j.ymben.2009.05.003

253. Nolling, J., Breton, G., Omelchenko, M.V., Makarova, K.S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H.M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Sabathe, F., Doucette-Stamm, L., Soucaille, P., Daly M.J., Bennett, G.N., Koonin, E.V., & Smith, D.R. (2001). Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology,* 183 (16), 4823-4838. doi: 10.1128/JB.183.16.4823-4838.2001

254. Ofremu, O.G., Raimi, Y.B., Yusuf, S.O., Dziwornu, A.B., Nnabuife, G.S., Eze, A.M., & Nnajiofo, C.A. (2024). Exploring the relationship between climate change, air pollutants and human health: impacts, adaptation, and mitigation strategies. *Green energy and resources,* 100074. doi: 10.1016/j.gerr.2024.100074

255. Ohmiya, K., Sakka, K., Kimura, T., & Morimoto, K. (2003). Application of microbial genes to recalcitrant biomass utilization and environmental conservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 95 (6), 549-561. doi: 10.1016/s1389-1723(03)80161-5

256. Ojo, A.O. (2023). An overview of lignocellulose and its biotechnological importance in high-value product production. *Fermentation,* 9(11), 990. doi: 10.3390/fermentation9110990

257. Olorunsogbon, T., Adesanya, Y., Atiyeh, K.H., Okonkwo, C.C., Ujor, V.C., & Ezeji T.C. (2022). Effect of Clostridium beijerinckii and medium modification on acetone-butanol-ethanol production from switchgrass. *Front Bioeng Biotechnol,* 10. doi: 10.3389/fbioe.2022.942701

258. Olorunsogbon, T., Okonkwo, C.C., & Ezeji, T.C. (2024). Molecular markers and regulatory network in solventogenic *Clostridium* species: metabolic engineering conundrum. *Fermentation,* 10 (6), 297. doi: 10.3390/fermentation10060297

259. Olson, D.G., McBrid, E.J., Shaw, A.J., & Lynd, L.R. (2012). Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology,* 23 (3), 396-405. doi: 10.1016/j.copbio.2011.11.026

260. Olson, A.L., Tuner, M., & Verhelst, S. (2023). A review of isobutanol as a fuel for internal combustion engines. *Energies,* 16 (22), 7470. doi: 10.3390/en16227470

261. Ondov, B.D., Bergman, N.H., & Phillippy, A.M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a web browser. *BMC Bioinformatics*, 12, 385. doi: 10.1186/1471-2105-12-385

262. Orakzai, K.S., Subhan, F., Khan, K., Shah, S.Q., & Yaseen, M. (2024). Unveiling the potential of agriculture waste in fine chemicals production: from by-products to breakthrough. *ACS Symposium Series,* 1480 (3), 137-165. doi: 10.1021/bk-2024-1480.ch007

263. Osman, A.I., Lai, Y.Z., Farghali, M., Yiin, C.L., Elgarahy, A.M., Hammad, A., Ihara, I., Al-Fatesh, A.S., Roney, W.D., & Yap, P.-S. (2023). Optimizing biomass pathways to bioenergy and biochar application in electricity generation, biodiesel production, and biohydrogen production. *Environ Chem Lett,* 21, 2639-2705. doi: 10.1007/s10311-023-01613-2

264. Ou, J., Xu, N., Ernst, P., Ma, C., Bush, M., Goh, K., Zhao, J., Zhou, L., Yang, S.-T., & Liu, X (M). (2017). Process engineering of cellulosic n-butanol production from corn-based biomass using *Clostridium cellulovorans*. *Process Biochemistry*, 62, 144-150. doi: 10.1016/j.procbio.2017.07.009

265. Palaniswamy, S., Ashoor, S., Eskasalam, R.S., & Jang, Y.-S. (2023). Harnessing lignocellulosic biomass for butanol production through clostridia for sustainable waste management: recent advances and perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,* 11. doi: 10.3389/fbioe.2023.1272429

266. Panoutsou, C., Germer, S., Karka, P., Papadokostantakis, S., Kroyan, Y., Wojcieszyk, M., Maniatis, K., Marchand, P., & Landalv, I. (2021). Advanced biofuels to decarbonize European transport by 2030: Markets, challenges, and policies that impact their successful market uptake. *Energy Strategy Reviews*, 34, 100633 doi: 10.1016/j.esr.2021.100633

267. Parisutham, V., Kim, T.H., & Lee, S.K. (2014). Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresource Technology,* 161, 431-440. doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.114

268. Pasad, R.K., Sharma, A., Mazumder, P.B., & Dhussa, A. (2024). A comprehensive pre-treatment strategy evaluation of ligno-hemicellulosic biomass to enhance biogas potential in the anaerobic digestion process. *RSC Sustain,* 2, 2444-2467. doi: 10.1039/D4SU00099D

269. Pascoalino, L.A., Barros, L., Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P. & Reis, F.S. (2025). Closing the loop: exploring apple pomace as a source of bioactive compounds in the framework of circular economy. *Sustainable Food Technol.* doi: 10.1039/D4FB00172A

270. Pascoalino, L.A., Finimundy, T.C., Pires, T.C.S.P., Pereira, C., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., Oliveira, P.P.B.M., Barreira, J.C.M., & Reis, F.S. (2025). Investigating bioactive compounds in apple pomace: potential to develop high added-value products from an industrial surplus. *Food Bioscience*, 63, 105664. doi: 10.1016/j.fbio.2024.105664

271. Peabody, G.L., & Kao, K.C. (2016). Recent progress in biobutanol tolerance in microbial systems with an emphasis on *Clostridium*. *FEMS Microbiology Letters*, 363 (5). fnw017. doi: 10.1093/femsle/fnw017

272. Pinko, T., Flores-Alicha, X., Gernaey, K.V., & Junicke H. (2021). Alone or together? A review on pure and mixed microbial cultures for butanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviwes*, 147, 111244. doi: 10.1016/j.rser.2021.111244

273. Poehlein, A., Grosse-Honebrink, A., Zhang, Y., Minton, N.P., & Daniel, R. (2015). Complete genome sequence of the nitrogen-fixing and solvent-producing *Clostridium pasteurianum* DSM 525. *Genome Announc* 3, e01591-e01514. doi: 10. 1128/ genomeA.01591- 14

274. Poehlein, A., Hartwich, K., Krabben, P., Ehrenreich, A., Liebl, W., Durre, P., Gottschalk, G., & Daniel, R. (2013). Complete genome sequence of the

solvent producer *Clostridium saccharobutylicum* NCP262 (DSM 13864). *Genome Announcements*,1 (6). e00997-13. doi: 10.1128/genomea.00997-13

275. Poehlein, A., Solano, J.D.M., Flitsch, S.K., Krabben, P., Winzer, K., Reid, S.J., Jones, T.D., Green, E., Minton, N.P., Daniel, R., & Durre, P. (2017). Microbial solvent formation revisited by comparative genome analysis. *Biotechnology for Biofuels*,10, 58. doi: 10.1186/s13068-017-0742-z

276. Ponsetto, P., Sasal, E.M., Mazzoli, R., Valetti, F., & Gilardi, G. (2024). The potential of native and engineered *Clostridia* for biomass biorefining. *Front Bioeng Biotechnol,* 12, 1423935. doi: 10.3389/fbioe.2024.1423935

277. Potschka, A., & Bock, H.G. (2021). Correction to: a sequential homotopy method for mathematical programming problems. *Mathematical Programming*, 190, 843-844. doi: 10.1007/ s10107-021-01668-5

278. Poveda-Giraldo, J.A., & Cardona Alzate, C.A. (2024). Valorization of lignocellulosic platform products based on biorefinery schemes through sequential pretreatments. *Biomass Conv Bioref*. doi: 10.1007/s13399-023-05140-6

279. Prado, C.A., Shibukawa, V.P., Arruda, G.L., Cruz-Santos, M.M., Jofre, F.M., Antunes, F.A.F., dos Santos, B.C., da Silva, S.S., & Santos, J.C. (2024). Recent Advancements and Prospects of Using Cavitation-Assisted Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Production of Biofuels. In: Bisaria, V. (eds) *Handbook of Biorefinery Research and Technology: Biomass Logistics to Saccharification* (pp. 355-377). Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-007-6308-1_63

280. Puyo, M.D., Panton, J.A., Sridhar, T., Stuermer, M., Ungerer, C., & Zhang, A.T. (2024). Key Challenges faced by fossil fuel exporters during the energy transition. *IMF,* 001. doi: 10.5089/9798400270147.066

281. Pyne, M.E., Liu, X., Moo-Young, M., Chung, D.A., & Chou, P. (2016). Genome-directed analysis of prophage excision, host defence systems, and central fermentative metabolism in *Clostridium pasteurianum*. *Sci Rep,* 6, 26228. doi: 10.1038/srep26228

282. Pyne, M.E., Moo-Young, M., Chung, D.A., & Chou, C.P. (2013). Development of an electrotransformation protocol for genetic manipulation of *Clostridium pasteurianum*. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 1-20. doi: 10. 1186/ 1754- 6834-6- 50

283. Quevedo-Amador, R.A., Escalera-Velasco, B.P., Arias, A.M.R., Reynel-Avila, H.E., Moreno-Pirajan, J.C., Girado, L., & Bonilla-Petriciolet, A. (2024). Application of waste biomass for the production of biofuels and catalysts: a review. *Clean technologies and environmental policy*, 26, 943-977. doi: 10.1007/s10098-0023-02728-4

284. Quintero-Diaz, J.C., Mendoza, F.D., & Avignone-Rossa, C. (2023). NADH-based kinetic model for acetone-butanol-ethanol production by *Clostridium*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 129435. doi: 10.3389/fbioe.2023.1294355

285. Qureshi, N., Bowmana, M.J., Sahaa, B.C., Hector, R., Berhow, M.A., & Cotta, M.A. (2012). Effect of cellulosic sugar degradation products (furfural and hydroxymethyl furfural) on acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation using *Clostridium beijerinckii* P260. *Food Bioprod Bioprocess*, 90, 533-540. doi: 10.1016/j.fbp.2011.09.002

286. Qureshi, N., Ezeji, T.C., Ebener, J., Dien, B.S., Cotta, M.A., & Blaschek, H.P. (2008). Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresource Technology*, 99(13), 5915-5922. doi: 10.1016/j.biortech.2007.09.087

287. Rafieyan, S., Boojari, A.M., Setayeshnia, A., Fakhroleslam, M., Sanchez-Ramirez, E., Bay, M.S., & Segovia-Hernandez, J.G. (2024). Acetone-butanol-ethanol fermentation products recover: challenges and opportunities. *Chemical engineering research and design*, 205, 640-664. doi: 10.1016/j.cherd.2024.04.021

288. Rakhmetova, S.O., Yemets, A.I., Vergun, O.M., Bondarchuk, O.P., Shymanska, O.V., Blume, R.Ya., Tsygankov, S.P., Blume, Ya.B., & Rakhmetov, D.B. (2020). Ethanol production potential of sweet sorghum in

North and Central Ukraine. *Open Agric J*, 14, 321-338. doi:10.2174/1874331502014010321

289. Ramachandran, R.P., Nadimi, M., Cenkowski, S., & Paliwal, J. (2024). Advancement and innovations in drying of biopharmaceuticals, nutraceuticals, and functional foods. *Food Engineering reviews,* 16, 540-566. doi: 10.1007/s12393-024-09381-7

290. Ranjan, A., & Moholkar, V.S. (2012). Biobutanol: science, energineering, and economics. *International journal of energy research*, 36, 277-323. doi: 10.1002/er.1948

291. Rappert, S., Song, L., Sabra, W., Wang, W., Zeng, A.-P. (2013). Draft genome sequence of type strain *Clostridium pasteurianum* DSM 525(ATCC 6013), a promising producer of chemicals and fuels. *Genome Announc*, 1, e00232–e00212. doi: 10.1128/genomeA.00232- 12

292. Rastegari, A.A., Yadav, N.A., & Gupta, A. (2019). *Prospects of renewable bioprocessing in future energy systems*. Springer Cham. doi: 10.1007/978-3-03-14463-0

293. Raut, M.P., Pham, T.K., Gomez, L.D., Dimitriou, I., & Wright, P.C. (2019). Alcoholic fermentation of thermochemical and biological hydrolysates derived from *Miscanthus* biomass by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biom Bioen*, 130, 105382. doi: 10.1016/j.biombioe.2019.105382

294. Re, A., & Mazzoli, R. (2022). Current progress on engineering microbial strains and consortia for production of cellulose butanol through consolidated bioprocessing. *Microb Biotechnol*, 16 (2), 238-261. doi: 10.1111/1751-7915.14148

295. Rebolledo-Leiva, R., Estevez, S., Hernandez, D., Feijoo, G., Moreira, M.T., & Gonzalez-Garcia, S. (2024). Apple pomace integrated biorefinery for biofuel production: a techno-economic and environmental sustainability analysis. *Resources,* 13 (11), 156. doi: 10.3390/resources13110156

296. Ren, H., Hu, H., & Zeng, Z. (2021). Sequential probabilistic ratio test for the scale parameter of the ρ-norm distribution. *Discrete Dynamics in Nature and Society*, 2021 (7), 1-7. doi: 10.1155/2021/ 9922435

297. Rodriguez, A., Hirakawa, M.P., Geiselman, G.M., Tran-Gyamfi, M.B., Light, Y.K., George, A., & Sale, L.K. (2023). Prospects for utilizing microbial consortia for lignin conversion. *Front Chem Eng*, 5, 1086881. doi: 10.3389/fceng.2023.1086881

298. Rotta, C., Poehlein, A., Schwarz, K., McClure, P., Daniel, R., & Minton, N.P. (2015) Closed genome sequence of *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. *Genome Announc*, 3, e01596–e01514. doi: 10. 1128/ genom eA. 01596- 14

299. Rozina, Emmanuel, O., & Ezeji, T.C. (2024). Exploring the synergy of nanomaterials and microbial cell factories during biohydrogen and biobutanol production from different carbon sources. *Sustainable chemistry for the environment*, 6, 100098. doi: 10.1016/j.scenv.2024.100098

300. Ruperao, P., Gandham, P., Odeny, D.A., Mayes, S., Selvanayagam, S., Thirunavukkarasu, N., Das, R.R., Skikanda, M., Gandhi, H., Habyarimana, E., Manyasa, E., Nebie, B., Deshpande, S.P., & Rathore, A. (2023). Exploring the sorghum race level diversity utilizing 272 sorghum accessions genomic resources. *Front Plant Sci*, 14, 1143512. doi: 10.3389/fpls.2023.1143512

301. Sahoo, D., Ummalyma, B.S., Okram, A.K., Pandey, A., Sankar, M., & Sukumaran, R.K. (2018). Effect of dilute acid pretreatment of wild rice straw (*Zizania latifolia*) from Loktak Lake for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 253, 252-255. doi: 10.1016/j.biortech.2018.01.048

302. Salimi, F., & Mahadevan, R. (2013). Characterizing metabolic interactions in a clostridial co-culture for consolidated bioprocessing. *BMC Biotechnology*, 3, 95. doi: 10.1186/1472-6750-13-95

303. Samadi, S., Fischer, A., & Lechtenbohmer, S. (2023). The renewables pull effect: How regional differences in renewable energy costs could influence where industrial production is located in future. *Energy research & Social science*, 104, 103257. doi: 10.1016/j.erss.2023.103257

304. Sampaio, F.C.I., Silva, F.N., de Moura, I.V.L., Goncalves, M.C., Franko, M., & de Almeidam, P.F. (2024). Sustainable Horizons: Navigating challenges in butanol production from lignocellulosic by-products. In: Taft, C.A., de Lazaro, S.R. (eds) *Progress in Hydrogen Energy, Fuel Cells, Nano-Biotechnology and Advanced, Bioactive Compounds. Engineering Materials*. (pp. 401-415). Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-031-75984-0_17

305. Sanchez, A., Magana, G., Gomez, D., & Solis, M. (2014). Banares-Alcantara R. Bidimensional sustainability analysis of lignocellulosic ethanol production processes. Method and case study. *Biofuels, Bioproducts and Biorefinery*, 8 (5), 670-685. doi: 10.1002/bbb.1512

306. Sandoval, N.R., Venkataramanan, K.P., Groth, T.S., & Papoutsakis, E.T. (2015). Whole-genome sequence of an evolved *Clostridium pasteurianum* strain reveals Spo0A deficiency responsible for increased butanol production and superior growth. *Biotechnol Biofuels*, 8, 227. doi: 10. 1186/ s13068- 015- 0408-7

307. Sanghvi, A.H., Manjoo, A., Rajput P., Mahajan, N., Rajamohan, N., & Abrar, I. (2024). Advancements in biohydrogen production – a comprehensive review of technologies, lifecycle analysis, and future scope. *RSC Adv*, 14, 36868-36885. doi: 10.1039/D4RA06214K

308. Sapireddy, V., Katuri, K.P., Muhammad, A., Saikaly, P.E. (2021). Competition of two highly specialized and efficient acetoclastic electroactive bacteria for acetate in biofilm anode of microbial electrolysis cell. *npj Biofilms Microbiomes,* **7** (47). doi: 10.1038/s41522-021-00218-3

309. Saqr, A.A., Aldawsari, F.M., Khafagy, E.-S., Shaldam, M.A., Hegazy, W.A.H., & Abbas, H.A. (2021). A novel use of allopurinol as a quorum-sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, 10 (11), 1385. doi: 10.3390/antibiotics10111385

310. Satheesh, S., Cherian, T., Varghese, T., Eranhottu, S., & Shahulhameed, P.P.F. (2024). Bioprospecting of microorganisms for biofuel production:

metabolic engineering, application, and challenges. *ACS Symposium Series*, 1480 (3), 91-107. doi: 10.1021/bk-2024-1480.ch005

311. Schmitz, R., Sabra, W., Arbter, P., Hong, Y., Utesch, T., & Zeng, A.-P. (2019). Improved electrocompetence and metabolic engineering of Clostridium pasteurianum reveals a new regulation pattern of glycerol fermentation. *Eng Life Sci,* 19, 412-422. doi: 10.1002/elsc.201800118

312. Schwarz, K.M., Grosse-Honebrink, A., Derecka, K., Rotta, C., Zhang, Y., Minton, N.P. (2017). Towards improved butanol production through targeted genetic modification of *Clostridium pasteurianum*. *Metab Eng,* 40, 124-137. doi: 10. 1016/j. ymben. 2017. 01. 009

313. Seaver, S.M.D., Liu, F., Zhang, Q., Jeffryes, J., Faria, J.P., Edirisinghe, J.N., Mundy, M., Chia, N., Noor, E., Beber, M.E., Best, A.A., DeJongh, M., Kimbler, J.A., D'haeseleer, P., McCorkle, S.R., Bolton, J.R., Pearson, E., Canon, S., Wood-Charlson, E.M., Cottingham, R.W., Arkin, A.P., & Henry, C.S. (2021). The ModelSEED Biochemistry Database for the integration of metabolic annotations and the reconstruction, comparison and analysis of metabolic models for plants, fungi and microbes. *Nucleic acid research,* 49 (D1), D575-D588. doi: 10.1093/nar/gkaa749

314. Seedorf, H., Fricke, W.F., Veith, B., Bruggemann, H., Liesegang, H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J., Li, F., Hagemeier C., Thauer, R.K., & Gottschalk, G. (2008). The genome of Clostridium kluyveri, a strict anaerobe with unique metabolic features. *PNAS,* 105 (6), 2128-2133. doi: 10.1073/ pnas.0711093105

315. Segers, B., Nimmegeers, P., Spiller, M., Tofati G., Jasiukaityte-Grojzdek, E., Dace, E., Kikas, T., Marchetti, J.M., Rajic, M., Yildiz, G., & Billen, P. (2024). Lignocellulose biomass valorization: a review of feedstocks, processes and potential value chains and their implications for the decision-making process. *RSC Sustain,* 2, 3730-3749. doi: 10.1039/D4SU00342J

316. Seid, N., Weibner, L., Aliyu, H., & Neumann, A. (2024). Stirring the hydrogen and butanol production from Enset fiber via simultaneous

saccharification and fermentation (SSF) process. *Bioresour Bioprocess*, 11, 96. doi: 10.1186/s40643-024-00809-w

317. Seifollahi, M., & Amiri, M. (2019). Enhanced production of cellulosic butanol by simultaneous co-saccharification and fermentation of water-soluble cellulose oligomers obtained by chemical hydrolysis. *Fuel*, 263 (2823), 116759. doi: 10.1016/j.fuel.2019.116759

318. Serrano, V.A., Fajardo, C.A.G., & Castro, K.T. (2024). A review on biobutanol: eco-friendly fuel on the future, history, current advances, and trends. *Preprints.* doi: 10.20944/preprints202409.2094.v1

319. Shang, Z., Yu, X., Ren, L., Li, Z., Wang, H., Li, Y., & Wang, Y. (2024). Synergic effect of hydrogen and n-butanol on combustion and emission characteristics of a hydrogen direct injection SI engine fueled with n-butanol/gasoline. *International Journal of Hydrogen Energy*, 49 (B), 945-956. doi: 10.1016/j.ijhydene.2023.09.213

320. Sharma, S., Tsai, M.-L., Sharma, V., Sun, P.-P., Nargotra, P., Bajaj, B.K., Chen, C.-W., & Dong, C.D. (2023). Environment friendly pretreatment approaches for the bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value-added products. *Environmental*, 10(10), 6. doi: 10.3390/environments10010006

321. Shekelyan, M., & Cormode, G. (2021). Sequential random sampling revisited: hidden shufe method. *PMLR*, 130, 3628-3636.

322. Shen, S.H., Gu, Y., Chai, C., Jiang, W., Zhuang, Y., & Wang, Y. (2017). et al. Enhanced alcohol titre and ratio in carbon monoxide-rich off-gas fermentation of Clostridium carboxidivorans through combination of trace metals optimization with variable-temperature cultivation. *Bioresource Technology*, 239, 236-243. doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.099

323. Silva, C.A.A.T., Adorno, M.A.T., Ferreira, F.V., & Peixoto, G. (2024). Effect of mixed culture and organic loading rate over butanol production from biodiesel waste in an upflow packed-bed bioreactor. *Fermentation,* 10(11), 586. doi: 10.3390/fermentation10110586

324. Sirangelo, T.M., Ludlow, R.A., Chenet, T., Pasti, L., & Spadafora, N.D. (2023). Multi-omics and genome editing studies on plant cell walls to improve biomass quality. *Agriculture*, 13(4), 752. doi: 10.3390/agriculture13040752

325. Srivastava, N., Singh, R., Singh, P., Ahmad, I., Singh, R.P., Rai, A.K., Asiri, M., & Gupta, V.K. (2023). Recent advances on lignocellulosic bioresources and their valorization in biofuel production: challenges and viability assessment. *et&I*, 29, 103037 doi: 10.1016/j.eti.2023.103037

326. Steen, E.J., Chan, R., Prasad, N., Myers, S., Petzold, C.J., Redding, A., Ouellet, M., & Keasling, D.J. (2008). Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for the production of n-butanol. *Microbial Cell Factories*, 7 (36), 1-8. doi: 10.1186/1475-2859-7-36

327. Su, C., Cai, D., Zhang, H., Wu, Y., Jiang, Y., Liu, Y., Zhang, C., Li, C., Qin, P., & Tan, T. (2024). Pilot-scale acetone-butanol-ethanol fermentation from corn stover. *Green Carbon,* 2 (1), 81-93. doi: 10.1016/j.greenca.2024.02.004

328. Tao, W., Dong, H., Zhang, Y. Cai, Z., & Li, Y. (2015). Introducing transglutaminase with its precursor region into *Clostridium acetobutylicum* improves its tolerance to oxidative stress and solvent production. *Process Biochemistry*, 50 (1), 111-118. doi: 10.1016/j.procbio.2014.10.016

329. Tapias, C., Paula, A., Rubiano, M., Karoll, M., Barreiro, P., Juan, C., Castrillon, N.M., Jose, M., Bernal, M., & Riascos, C.A.M. (2024). A two-phase model for ABE fermentation with a modified *Clostridium acetobutylicum* strain. *AIDIC,* 110, 121-126. doi: 10.3303/CET24110021

330. Thanaporsin, T., Laopaiboon, L., & Laopaiboon, P. (2024). Novel Batch and Repeated-Batch butanol fermentation from sweet sorghum stem juice by co-culture of *Arthrobacter* and immobilized *Clostridium* in scales-up bioreactors. *Energies*, 17 (5), 1009. doi: 10.3390/en17051009

331. Therien, J.B., Artz, J.H., Poudel, S., Hamilton, T.L., Liu, Zh., Noone, S.M., Adams, M.W.W., King, P. W., Bryant, D.A., Boyd, E.S., & Peters, J.W. (2017). The Physiological Functions and Structural Determinants of Catalytic

Bias in the [FeFe]-Hydrogenases CpI and CpII of *Clostridium pasteurianum* Strain W5. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2017.01305

332. Thomas, S. (2020). An engraved surface induces weak adherence and high proliferation of nonadherent cells and microorganisms during culture. *BioTechniques*, 69(2), 113-125. doi: 10.2144/btn-2020-0022

333. Tian, L., Conway, P.M., Cervenka, N.D., Cui, J., Maloney, M., Olson, D.G., & Lynd, L.R. (2019). Metabolic engineering of Clostridium thermocellum for n-butanol production for cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 186. doi: 10.1186/s13068-019-1524-6

334. Tigunova, O.O., Beiko, N.E., Andriiash, A.S., & Shulga, S.M. (2019). Metabolic engineering of solventogenic *Clostridia*. *Biotechnology Acta*, 12 (5), 29-41. doi: 10.15407/biotech12.05.029

335. Tigunova, O., Shulga, S., & Blume, Ya. (2013). Butanol as an alternative type of fuel. *Cytology and Genetics*, 47(6), 366-382. doi:10.3103/s0095452713060042

336. Tirumalai, R. S. (2022). Microbiological procedures for absence of specified microorganisms – nutritional and dietary supplements. *MSA05*, 29(1), 283-287.

337. Tomatis, M., Jeswani, H.K., & Azapagic, A. (2024). Environmental impacts of valorization of crude glycerol from biodiesel production – A life cycle perspective. *Waste management*, 179, 55-65. doi:10.1016/j.wasman.2024.03.005

338. Trypolska, G. (2024). Unlocking the potential: key factors shaping the liquid biofuels market in Ukraine. *Heliyon*, 10 (22), e40420. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e40420

339. Valles, A., Alvarez-Hornos, J., Capilla, M., San-Valero, P., & Gabaldon, C. (2021). Fed-batch simultaneous saccharification and fermentation including in situ recovery for enhanced butanol production from rice straw. *Bioresource Technology*, 342, 126020. doi:10.1016/j.biortech.2021.126020

340. Vardar-Schara, G., Maeda, T., & Wood, T.K. (2008). Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microbial Biotechnology*, 1 (2), 107-125. doi: 10.1111/j.1751-7915.2007.00009.x

341. Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., McEwen, J.E., Olsson, L., & Nielsen, J. (2007). Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae. PNAS,* 104 (7), 2402-2407. doi: 10.1073/pnas.0607469104

342. Ventura, J.-R.S., Hu, H., & Jahng, D. (2013). Enhanced butanol production in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by double overexpression of 6-phosphofructokinase and pyruvate kinase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (16), 7505-7516. doi: 10.1007/s00253-013-5075-7

343. Wang, W.K., Kruus, K., & Wu, J.H.D. (1993). Cloning and DNA Sequencing of the gene coding for *Clostridium termocellum* cellulase S_s (CelS) a major cellulosome component. *J Bacteriol,* 175 (5), 1293-1302. doi: 10.1128/jb.175.5.1293-1302.1993

344. Wang, F., Shi, D., Han, J., Zhang, G., Jiang, X., Yang, M., Wu, Z., Fu, C., Li, Z., Xian, M., & Zhang, H. (2020). Comparative study on pretreatment processes for different utilization purposes of switchgrass. *ACS Omega,* 5(35), 21999-22007 doi: 10.1021/acsomega.0c01047

345. Tyszak, A., & Rehmann, L. (2024). Metabolic oscillation phenomena in *Clostridia* species – a review. *Fermentation*, 10, 156. doi: 10.3390/fermentation10030

346. Wang, X., Yomano, L.P., Lee, J.Y., & Ingram, O.L. (2013). Engineering furfural tolerance in *Escherichia coli* improves the fermentation of lignocellulosic sugars into renewable chemicals. *PNAS,* 110 (10), 4021-4026. doi: 10.1073/pnas.1217958110

347. Wang, Y., Zhang, Y., Cui, Q., Feng, Y., & Xuan, J. (2024). Composition of Lignocellulose Hydrolysate in Different Biorefinery Strategies: Nutrients and Inhibitors. *Molecules*, 29(10), 2275. doi: 10.3390/molecules29102275

348. Wang, S., Zhang, Y., Dong, H., Mao, S., Zhu, Y., Wang, R., Luan, G., & Li, Y. (2011). Formic acid triggers the «Acid Crash» of acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (5), 1674-1680. doi: 10.1128/AEM.01835-10

349. Wen, Z., Chen, J., Yang, Y., Zhang, Y., Jiang, Y., & Yang, S. (2023). Pilot-scale fermentation of 300 t/a total solvents from sweet sorghum stalk juice. *Chem Eng J*, 454(4), 140534. doi:10.1016/j.cej.2022.140534

350. Wen, Z., Ledesma-Amaro, R., Lu, M., Jin, M., & Yang, S. (2020). Metabolic engineering of Clostridium cellulovorans to improve butanol production by consolidated bioprocessing. *ACS Synthetic Biology*, 9 (2), 304-314. doi: 10.1021/acssynbio.9b00331

351. Wery, N., Cambon-Bonavita, M.-A., Lesongeur, F., & Barbier, G. (2002). Diversity of anaerobic heterotrophic thermophiles isolated from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge, *FEMS Microbiology Ecology*, 41 (2), 105–114, doi: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00971.x

352. Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocols in Molecular Biology*, 2.4.1-2.4.5. doi: 10.1002/0471142727.mb0204s56

353. Wójcik, W., & Pawłowska, M. (Eds.). (2021). Biomass as Raw Material for the Production of Biofuels and Chemicals (1st ed.). CRC press, London, doi: 10.1201/9781003177593

354. Wqdrzyk, M., Plata, M., Korzeniowski, L., Janus, R., & Lewandowski, M. (2025). Towards sustainable valorization of blackcurrant pomace: Investigation of hot-water extraction combined with hydrothermal liquefaction. *Renewable Energy*, 240, 122117. doi: 10.1016/j.renene.2024.122117

355. Wu, Y., Bai, Y., Zhang, D., Cheng, C., Chen, L., Bai, F., & Xue, C. (2019). Pleiotropic regulation of a glucose-specific PTS in *Clostridium acetobutylicum* for high-efficient butanol production from corn stover without detoxification. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 12, 264. doi: 10.1186/s13068-019-1604-7

356. Wu, Y.-R., Li, Y., Yang, K.-L., & He J. (2012). Draft genome sequence of butanol-acetone-producing *Clostridium beijerinckii* strain G117. *Journal of Bacteriology,* 194 (19), 5470-5471. doi: 10.1128/JB.01139-12

357. Wu, Y.D., Wang, Z., Ma, X., & Xue, C. (2021). High temperature simultaneous saccharification and fermentation of corn stover for efficient butanol production by a thermotolerant Clostridium acetobutylicum. *Process Biochemistry,* 100, 20-25. doi: 10.1016/j.procbio.2020.09.026

358. Xiao, H., Gu, Y., Ning, Y., Yang, Y., Mitchell, W.J., Jang, W., & Yang, S. (2011). Confirmation and elimination of xylose metabolism bottlenecks in glucose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system-deficient *Clostridium acetobutylicum* for simultaneous utilization of glucose, xylose, and arabinose. *Applied and Environtal Microbiology*, 77, 7886-7895. doi: 10.1128/AEM.00644-11

359. Xin, F., Wu, Y.-R., & He, J. (2014). Simultanes Fermentation of Glucose and Xylose to Butanol by *Clostridium* sp. strain BOH3. *Applied and Environmental Microbiology,* 80 (15), 4771-4778. doi: 10.1128/AEM.00337-14

360. Xin, F., Yan, W., Zhou, J., Wu, H., Dong, W., Ma, J., Zhang, W., & Jiang, M. (2018). Exploitation of novel wild type solventogenic strains for butanol production. *Biotechnol Biofuels,* 11(252), 1-8. doi: 10.1186/s13068-018-1252-3

361. Xu, P., Cheng, S., Han, Y., Zhao, D., Li, H., Wang, Y., Zhang, G., & Chen, C. (2020). Natural Variation of lignocellulosic components in miscanthus biomass in China. *Front Chem*, 8, 595143 doi: 10.3389/fchem.2020.595143

362. Xu, Y., Wang, L.M., Devlet, A., Han, L., Tang, C., Tan, T., & Xie, G.H. (2024). A comprehensive method to select energy sorghum hybrids for bioethanol production. *Biomass and bioenergy*, 191, 107436. doi: 10.1016/j.biombioe.2024.107436

363. Xue, C., Zhang, X., Wang, J., Xiao, M., Chen, L., & Bai, F. (2017). The advanced strategy for enhancing biobutanol production and high-efficient product recovery with reduced wastewater generation. *Biotechnology for biofuels*, 1, 148. doi: 10.1186/s13068-017-0836-7

364. Yahyazadeh, A., Bot, A., Nanda, S., & Dalai A.K. (2023). Technological insights on glycerol valorization into propanediol through thermocatalytic and synthetic biology approach. *Fermentation,* 9 (10), 894. doi: 10.3390/fermentation9100894

365. Yang, M., Kuittinen, S., Zhang, J., Vepsalainen, J., Keinanen, M., & Pappinen, A. (2015). Co-fermentation of hemicellulose and starch from barley straw and grain for efficient pentoses utilization in acetone-butanol-ethanol production. *Bioresource Technology*, 179, 128-135. doi: 10.1016/j.biortech.2014.12.005

366. Yao, X., Zhang, Q., Fan, Y., Xu, X., & Liu, Z. (2022). Butanol-isopropanol fermentation with oxygen-tolerant *Clostridium beijerinckii* XN 29. *AMB Express*, 12 (57). doi: 10.1186/s13568-022-01399-6

367. Ye, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Wei, W., Cheng, D., Bui, T.X., Hoang, N.B., & Zhang, H. (2024). Biofuel production for circular bioeconomy: Present scenario and future scope. *Science of the Total Environment*, 935, 172863. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.172863

368. Yu, J., Zhang, J., He, J., Liu, Z., & Yu, Z. (2009). Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource Technology*, 100 (2), 903-908. doi: 10.1016/j.biortech.2008.07.025

369. Zamani, R., Rahpeyma, S.S., Aliakbari, M., Naderi, M., Yazdanei, M., Aminzadeh, S., Khezri, J., Haghbeen, K., & Karkhane, A.A. (2023). Enhancing the thermostability of cellulase from Clostridium termocellum via salt bridge interactions. *Biotech Bioproc Eng,* 28, 684-694. doi: 10.1007/s12257-023-0049-9

370. Zarkovic, M., Lakic, S., Cetkovic, J., Pejovic, B., Redzepagic, S., Vodenska, I., & Vujadinovic, R. (2022). Effect of renewable and non-renewable energy consumption, GHG, ICT on sustainable economic growth: evidence from old and new EU countries. *Sustainability,* 14(15), 9662. doi: 10.3390/su14159662

371. Zborowska, H., Waliszewska, B., Waliszewska, S., Borysiak, S., Brozdowski, J., & Stachowiak-Wencek, A. (2021). Conversion of carbohydrates in lignocellulosic biomass after chemical pretreatment, *Energies*, 15 (1), 254, 1-14. doi: 10.3390/en15010254

372. Yang F., Shi, H., Mao, X., Qi, L., Zhu, M., Tan, W., & Zhang, X. (2024). Mechanism of $ZnFe_2O_4$ NPs on biohydrogen production by *Clostridium pasteurianum. International Journal of Hydrogen Energy*, 70, 557-567. doi: 10.1016/j.ijhydene.2024.05.111

373. Zhang, J. (2024). Energy access challenge and the role of fossil fuels in meeting electricity demanded: Promoting renewable energy capacity for sustainable development. *Geoscience Frontiers*, 15 (5), 101873. doi: 10.1016/j.gsf.2024.101873

374. Zhang, Y. (2024). *Expanding the genetic toolbox for engineering commensal clostridia as live biotherapeutics*. (Doctoral Thesis, Maastricht University]). Maastricht University. doi: 10.26481/dis.20241031yz

375. Zhang, Y., Han, B., & Ezeji, T.C. (2012). Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. *New Biotechnology*, 29, 345-351. doi: 10.1016/j.nbt.2011.09.001

376. Zhang, Y., Xia, C., Lu, M., & Tu, M. (2018). Effect of overliming and activated carbone detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 178. doi: 10.1186/s13068-018-1182-0

377. Zhang, H., Yang, P., Wang, Z., Li, M., Zhang, J., Liu, D., Chen, Y., & Ying, H. (2021). Clostridium acetobutylicum Biofilm: Advances in Understanding the Basis. *Frontiers in Bioenginering and Biotechnology*, 9, 658568. doi: 10.3389/fbioe.2021.658568

378. Zhang, Y., Zhu, Y., Zhu, Y., & Li, Y. (2009). The importance of engineering physiological functionality into microbes. *Trends in Biotechnology*, 27 (12), 664-672. doi: 10.1016/j.tibtech. 2009.08.006

379. Zhao, Y.S., Tomas, C.A., Rudolph, F.B., Papoutsakis, T.E., & Bennett, N.G. (2005). Intracellular butyryl phosphate and acetyl phosphate concentrations in *Clostridium acetobutylicum* and their implications for solvent formation. *Applied and Environmental Microbiology,* 71 (1), 530-537. doi: 10.1128/AEM.71. 1.530-537.2005

380. Zhao, C., Zhang, Y., & Li, Y. (2020). Metabolic engineering for the production of butanol, a potential advanced biofuel, from renewable resources. *Biochemical Society Transactions*, 48 (5), 2283-2293. doi: 10.1042/BST20200603

381. Zhao, T., Yasuda, K., Tashiro, Y., Darmayanti, F.R., Sakai, K., & Sonomoto, K. (2019). Semi-hydrolysate of paper pulp without pretreatment enables a consolidated fermentation system with in situ product recovery for the production of butanol. *Bioresource Technology,* 278, 57-65. doi: 10.1016/j.biortech.2019.01.043

382. Zheng, J., Tashiro, Y., Wang, Q., & Sonomoto, K. (2015). Recent advances to improve fermentative butanol production: Genetic engineering and fermentation technology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (1), 1-9. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.05.023

383. Zhou, Z., Jing, Y., Wei, S., Zhang, Q., Peng, S., An, X., & Li, H. (2023). Enhancement of butanol production in *Clostridium acetobutylicum* SE25 through oxidation-reduced potential regulation and analysis of its metabolic mechanisms. *Fuel*, 331 (1), 125708. doi: 10.1016/j.fuel.2022/125708

384. Zhang, Y., Zheng, S., Hao, Q., Wang, O., & Liu, F. (2023). Respiratory electrogen *Geobacter* boosts hydrogen production efficiency of fermentative electrotroph *Clostridium pasteurianum. CEJ,* 456, 141069. doi: 10.1016/j.cej.2022.141069

385. Zhu, Y., Luan, Y., Zhao, Y., Liu, J., Duan, Z., & Ruan, R. (2023). Current Technologies and uses for fruit and vegetable wastes in a sustainable system: a review. *Foods,* 12 (10), 1949. doi: 10.3390/foods12101949

386. Zou, L., Jin, X., Tao, Y., Zheng, Z., & Ouyang, J. (2023). Recent advances in the exploitation and application of coculture systems for the the bioconversion of lignocellulosic feedstocks. *Industrial Crops and Products*, 203, 117117. doi: 10.1016/j.indcrop.2023.117117

ДОДАТОК А

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

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 *Sorgum saccharatum* as substrate. *Open Agriculture Journal*, 18, e18743315284161. doi: 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 **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 **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 **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 **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.

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 (*45 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті).*

3. **Tigunova, O.O.,** Umansikiy, 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 (*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., Pryiomov, 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 (*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 (*60 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті)*.

6. **Tigunova, O.O.,** Beiko, N. E., Andriash, H.S., Pryiomov, 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 (*45 % авторства: ідея дослідження, проведення дослідження, аналіз отриманих даних, формулювання висновків, написання статті).*

Патенти або авторські свідоцтва

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 (Sorgum 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. *(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

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

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-практичною 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

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 плазміди 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

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

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 XXII міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI 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 XXII міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI 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–практичній 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 XXII міжнародної науково-практичної конференції «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI столітті». Київ. 913-915.

16. Захарова, О.Г., Андріяш, Г.С., та **Тігунова, О.О.** (2020). *Виділення стрептоміцетів з ґрунтів різних регіонів України.* Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI 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 XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра

Володимировича Палладіна Київ. 161.

18. Братишко, В.В., Ребенко, В.И., Софиенко, В.С., Шульга, С.М., и **Тигунова, Е.А.** (2020). *Пути повышения кормовой и энергетической ценности незерновой части урожая сельскохозяйственных культур.* Сборник научных статей по материалам xxiii международной научно-практической конференции «Современные технологии сельскохозяйственного производства», Гродно, Белорусь. 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 Міждународна науково-практична інтернет-конференція. «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації». Київ: НУХТ, 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 Міждународна науково-практична інтернет-конференція. «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації». Київ: НУХТ, 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 дротовидного проса вищіми 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.

ДОДАТОК Б

АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ІХБГ НАН України
академік НАН України

_____ Я.Б. Блюм
«____» грудня 2022 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ІМА АПВ НААН
академік НААН України

_____ В.В. Адамчук
«____» грудня 2022 р.

АКТ
про використання результатів науково-дослідної роботи

Ми, що підписалися нижче, склали цей акт в тому, що за результатами виконання Інститутом харчової біотехнології та геноміки НАН України науково-дослідної роботи «Інтенсифікація накопичення бутанолу з використанням різного виду рослинної сировини як субстрату та вітчизняних штамів-продуцентів» отримано бутанол за використання рослинних субстратів агропромислового виробництва.

Інститут механіки та автоматики агропромислового виробництва НААН України вважає, що отримані результати комплексного дослідження мають високий методологічний та теоретичний рівень, практичну значимість, є актуальними, науково обгрунтованими та можуть бути використані при розробленні відповідної технології та обладнання для виробництва бутанолу на основі використання рослинної сировини, а також при подальшому спільному використанні розробленого технологічного обладнання. Ефективність застосування одержаного бутанолу буде визначатися на основі виробничих випробувань мобільної сільськогосподарської техніки шляхом порівняльного аналізу відповідних техніко-експлуатаційних показників.

Від ІХБГ НАН України:

_____ С.М. Шульга

_____ О.О. Тігунова

Від ІМА АПВ НААН України:

Завідувач відділу механіко-енергетичних проблем МТА

_____ С.П. Погорілий

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор ІХБГ НАН України,
акад. НАН України

_____ Ярослав Блюм
грудня 2021

ЗАТВЕРДЖУЮ
Генеральний директор
ПрАТ «РЕАГЕНТ»

_____ Ігор Глух
13 грудня 2021

АКТ
використання результатів науково-дослідної роботи

Ми, що підписалися, склали цей акт в тому, що за результатами виконання науково-дослідної роботи «Інтенсифікація накопичення бутанолу з використанням різного виду рослинної сировини як субстрату та вітчизняних штамів-продуцентів» отримано бутанол за використання рослинних субстратів.

Вважаємо, що отримані результати комплексного дослідження мають необхідний методологічний та теоретичний рівень, практичну значимість, є актуальними, науково обґрунтованими та можуть бути використані в створенні технології бутанолу та пілотної установки з його виробництва з використанням рослинної сировини на базі ПрАТ «РЕАГЕНТ».

Одержаний бутанол буде використаний для виробничої перевірки техніко-експлуатаційних показників мобільної техніки.

Виконавці:
О Тігунова _____
С Шульга _____
Г Андріяш _____

Виконавці:
Сергій Протащук _____
Світлана Рамус _____

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ІХБГ НАН України,
акад. НАН України

Я.Б.Блюм
“ ” грудня 2020 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ІБОНХ ім В.П. Кухаря
НАН України, член-кор. НАН України

Вовк А.І.
“ ” грудня 2020 р.

АКТ
використання результатів науково-дослідної роботи

Ми, що підписалися, склали цей акт в тому, що за результатами виконання науково-дослідної роботи «Інтенсифікація накопичення бутанолу з використанням різного виду рослиної сировини як субстрату та вітчизняних штамів-продуцентів» отримано бутанол за використання рослинних субстратів.

ІБОНХ ім В.П. Кухаря НАН України вважає, що отримані результати комплексного дослідження мають необхідний методологічний та теоретичний рівень, практичну значимість, є актуальними, науково обгрунтованими та можуть бути використані при створенні технології одержання бутанолу та пілотної установки з виробництва бутанолу з використанням рослинної сировини. Компонентний склад біобутилових естерів жирних кислот буде порівняно з бутиловими естерами хімічного походження та визначено ефективність застосування біобутанолу.

Виконавці:
Тігунова О.О.
Шульга С.М.
Андріяш Г.С.

Виконавці:
Кашковський В.І.
Патриляк Л.К.
Зубенко С.О.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ІХБГ НАН України
академік НАН України
_____ Я.Б. Блюм
«___» грудня 2019 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ННЦ «ІМЕСГ»
академік НААН України
_____ В.В. Адамчук
«___» грудня 2019 р.

АКТ
про використання результатів науково-дослідної роботи

Ми, що підписалися нижче, склали цей акт в тому, що за результатами виконання Інститутом харчової біотехнології та геноміки НАН України науково-дослідної роботи «Удосконалення технології отримання біобутанолу на основі біомаси ріпаку з використанням вітчизняних штамів-продуцентів бактерій» отримано бутанол за використання рослинних субстратів агропромислового виробництва.

Національний науковий центр «Інститут механізації та електрифікації сільського господарства» вважає, що отримані результати комплексного дослідження мають високий методологічний та теоретичний рівень, практичну значимість, є актуальними, науково обґрунтованими та можуть бути використані при розробленні відповідної технології та обладнання для виробництва бутанолу на основі використання рослинної сировини, а також при подальшому спільному використанні розробленого технологічного обладнання. Ефективність застосування одержаного бутанолу буде визначатися на основі виробничих випробувань мобільної сільськогосподарської техніки шляхом порівняльного аналізу відповідних техніко-експлуатаційних показників.

Виконавці

від ІХБГ НАН України:

_____ О.О. Тігунова

_____ С.М. Шульга

_____ Г.С. Андріяш

від ННЦ «ІМЕСГ»:

Завідувач відділу мобільних енергетичних засобів та біоенергетики

_____ В.М. Третяк

ДОДАТОК В

СВІДОЦТВО ПРО ПЕРВІСНЕ ДЕПОНУВАННЯ ШТАМУ

С В І Д О Ц Т В О

про первісне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Кому видано: ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України,
(прізвище, ім'я, по батькові автора (авторів) і(або)

04124,м. Київ, вул. Осиповського, 2а. Автори: Шульга С.М., Тігунова О.О.
повна назва організації-депозитора та її адреса

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму: _____
(назва і позначення

Clostridium sp. IFBG C6H 5M
(номер, символ тощо), надане штаму мікроорганізму депозитором)

первісно депонований в:

Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України
(повна назва Депозитарію)

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм:

Clostridium sp. IMB B-7570

Супроводжувальна документація від депозитора одержана:

Паспорт, заключення про дослідження патогенності штаму, договір 46-2016
(паспорт, довідка про непатогенність тощо)

Дата первісного депонування: **2 серпня 2016 року**

Заступник директора Інституту мікробіології
і вірусології НАН України Тутинська Г.О.

М.П.

Адреса: 03143, Київ, вул.Заболотного, 154
www.imv.kiev.ua;

2 серпня 2016 року

Головня Т.М. *(адреса@ukr.net)*