

ВІДГУК

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

Актуальність теми дисертації. Потреба людства в енергії невпинно зростає і, якщо в ХХ столітті викопні джерела цілком забезпечували енергетичні потреби, на даний час традиційні ресурси стрімко вичерпуються. Проблема самозабезпечення України енергією з поновлювальної сировини є пріоритетним напрямком розвитку. Подвійний тиск міжнародної енергетичної безпеки та зміни клімату заохочує пошук альтернативних джерел для створення біопалива. Основою дисертаційного дослідження є розробка економічно конкурентних технологій біологічної трансформації рослинної сировини в біопаливо.

Країни з розвиненим промисловим виробництвом потребують значної кількості енергоресурсів. Водночас забезпеченість ними у кожній країні різна. Більшість країн, зокрема й Україна, імпортують енергоносії. З метою зменшення залежності від імпортних енергоносіїв здійснюється пошук відновлюваних джерел енергії. Сьогодні більш як 50 країн законодавчо підтримують розвиток відновлюваних джерел енергії, шукаючи альтернативи традиційному паливу серед біологічних видів палива, отриманих шляхом переробки органічної сировини. Це, зокрема біогаз, біоетанол, біобутанол та дизельне біопаливо. Загалом Україна має досить високий потенціал для виробництва альтернативних видів рідкого палива. Основу сировинної бази для біоенергетики в Україні становлять органічна біомаса рослинного й тваринного походження та різні види відходів, придатні для переробки.

Ферментація цукрів, крохмалевмісної та целюлозовмісної сировини може бути здійснена за допомогою ацетонобутилового бродіння. Серед продуцентів

процесу: спорові бактерії роду *Clostridium*, в процесі життєдіяльності яких в анаеробних умовах утворюються метаболічні речовини – джерела енергії, зокрема ацетон, бутанол, етанол, оцтова, масляна й молочна кислоти, діоксид карбону, гідроген. Субстратами для ацетобутилового бродіння можуть бути вуглеводи (крохмаль, патока або меляса, гідролізати целюлози, сульфідні луги). Альтернативною нехарчовою сировиною, яка володіє значним потенціалом для отримання біопалива, в т.ч. і бутанолу, є лігноцелюлоза (суха рослинна біомаса), зокрема культури швидкоростучих рослин, залишки сільського господарства та деревообробної промисловості, побутові відходи. Проте, процес перетворення лігноцелюлозної біомаси до бутанолу є значно складнішим порівняно з процесом отримання з крохмалю або сахарози. Вибір вихідної сировини як субстрату є важливим кроком у виробництві біобутанолу. Лігноцелюлозна біомаса (сільськогосподарські, комунальні відходи і залишки) може використовуватись для виробництва біобутанолу, але потребує попередньої підготовки. Спеціальна попередня обробка сировини, стратегії бродіння, конструювання та кінетика біореакторів, а також математичне моделювання можуть підвищити ефективність виробництва біобутанолу. Для комерційного промислового виробництва продуценти повинні мати здатність надсинтезу бутанолу. Сучасні методи генної інженерії введення, нокауту та надмірної експресії генів для зміни метаболічних шляхів можуть збільшити виробництво біобутанолу.

Однією з причин нерентабельності виробництва біопалива з лігноцелюлози є низький вихід бутанолу, внаслідок неефективної мікробної ферментації цукрів-пентоз, ефективність цього процесу в ідентифікованих штаммах є недостатньою для налагодження промислового виробництва. Крім того, їх ріст в значній мірі пригнічується токсичними компонентами кислотного гідролізу (фурфурол, леткі органічні кислоти тощо). Ефективна ферментація цукрів, що входять до складу геміцелюлози, дозволила би зменшити собівартість процесу виробництва бутанолу з лігноцелюлози на 25 %. Даний факт стимулює пошук природних та створення рекомбінантних штамів

мікроорганізмів, здатних одночасно зброджувати усі гексози та пентози у складі целюлозної та геміцелюлозної фракцій гідролізатів лігноцелюлози.

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, що підтверджує актуальність даної роботи.

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

Дисертаційна робота виконана в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» у рамках взаємопов'язаних цільової комплексної науково-технічної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії» (2013-2017 рр.) і цільової програми наукових досліджень НАН України «Біопаливні ресурси і біоенергетика» (2018-2022 рр.) та відомчих тематик лабораторії промислової та харчової біотехнології «Удосконалення технології біобутанолу з використанням альтернативних субстратів та вітчизняних штамів-продуцентів» (2013-2017 рр., № державної реєстрації 0113U005527); «Удосконалення технології отримання бутанолу на основі біомаси ріпаку з використанням вітчизняних штамів-продуцентів бактерій» (2018-2019 рр., № державної реєстрації 0118U005353), «Оцінка продуктивного потенціалу та біохімічного складу рослин і відбір цінних генотипів як вихідних форм для подальших селекційних робіт. Кількісна оцінка виходу компонентів рідких палив при переробленні соку та лігноцелюлозної частини зразків рослин. Удосконалення відібраних штамів-продуцентів біобутанолу з подальшим підвищенням біоконверсії субстрату» (2018-2022 рр., № державної реєстрації 0220U000419), «Створення штамів надпродуцентів вторинних метаболітів (амінокислот,

спиртів, вітамінів)» (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U101489), «Інтенсифікація накопичення бутанолу з використанням різного виду рослинної сировини як субстрату та вітчизняних штамів-продуцентів» (2020-2022 рр., № державної реєстрації 0120U101706), «Розроблення технології ультразвукової дезінтеграції рослинної біомаси незернової частини врожаю сільськогосподарських культур» (2020-2022 рр., № державної реєстрації 0223U002212), «Кавітаційне оброблення лігноцелюлозної біосировини в отриманні біопалив другого покоління», яка виконувалась на замовлення Міністерства освіти і науки України (2023-2024 рр., № державної реєстрації 0123U102837) та фінансувалася за рахунок зовнішнього інструменту допомоги Європейського Союзу для виконання зобов'язань України у Рамковій програмі Європейського Союзу з наукових досліджень та інновацій «Горизонт 2020».

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

Перший розділ містить аналітичний огляд літературних джерел за темою дисертаційної роботи. Присвячений ацетон-бутанол-етанольній ферментації як способу отримання біопалива та його продуцентів, а також метаболічній інженерії солвентогених штамів-продуцентів бутанолу *Clostridium* sp. як способу підвищення накопичення цільового продукту. Особлива увага приділена характеристикам незернової рослинної біомаси як субстрату для культивування мікроорганізмів та стратегії вдосконалення виробництва біобутанолу з лігноцелюлозної сировини.

Другий розділ присвячено опису методології дослідження. На початку розділу наведено інформацію про застосовувані у роботі штами мікроорганізмів-продуцентів бутанолу, види вищих та нижчих грибів та лігноцелюлозну рослинну сировину. Розділ містить перелік методик використаних в роботі відповідно до поставлених завдань роботи. Для

виконання мікробіологічних методів досліджень описано умови та методологію культивування різних штамів бактерій-продуцентів бутанолу. Наведено покроковий протокол виділення, очищення та ідентифікації нових лігнолітичних штамів бактерій. Детально описані методи попередньої підготовки незернової рослинної біомаси як субстрату для культивування та гідролізу відновлювальної лігноцелюлозної сировини. Наведені схеми розробленого устаткування, на яких проводили попередню обробку. Запропоновано методику ліофільного висушування та вивчення впливу захисного середовища на мікроорганізми. Надано методи газової хроматографії, які застосовувались для визначення накопичення розчинників у культуральній рідині. Застосовані біоінформатичні методи досліджень - аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, анотація генів, пошук та характеристика кластерів генів біосинтетичних шляхів, моделювання біосинтетичних шляхів *in silico*, філогенетичний аналіз амінокислотних та нуклеотидних послідовностей та конструювання рекомбінантного штаму-продуценту бутанолу.

Статистична обробка та математичний аналіз отриманих результатів проведені з використанням сучасних методів, адекватних поставленим завданням. Застосування комплексу методів дозволило отримати достовірні результати.

Третій розділ роботи присвячено створенню моделі рекомбінантного штаму-продуценту з підвищеним накопиченням бутанолу. Автором проведено філогенетичний аналіз нового вітчизняного штаму-продуценту *Clostridium* sp. UCM B-7570 та показано його спорідненість з аналогічними штамми, відомими у світі. У даному дослідженні проведено секвенування геному нового штаму та ідентифікацію кластерів генів, залучених до АБЕ-ферментації. Порівняльний аналіз виявлених послідовностей ферментів виявив високий рівень подібності: 91,4 - 100 % до штаму *C. pasteurianum* DSM 525.

Отримано нові штами-продуценти лігнолітичних бактерій роду *Streptomyces*, один з яких мав найбільшу амолітичну зону. Його виділено та ідентифіковано. У

результаті секвенування 16S рПНК *Streptomyces* sp. Ave 1 виявлено 99 % схожість із типовим штамом *Streptomyces graminifolii* JL-22. Дендрограма, побудована на основі послідовностей генів 16S рПНК аналізованого штаму та інших штамів роду *Streptomyces*, показала, що *Streptomyces* sp. Ave 1 та *Streptomyces graminifolii* JL-22 були об'єднані в одну групу, яка значно відрізнялася від інших штамів *Streptomyces*.

Сконструйовано модель рекомбінантного штаму-продуценту з підвищеним накопиченням бутанолу. Показано, що видалення великої субодиниці гліцеролдегідратази (*dhaB*) за допомогою адаптованої ніказної системи *S. pyogenes* типу II CRISPR/Cas9 призвело до отримання 1,3-пропандіол-дефіцитного мутанта, що виробляє бутанол як основний продукт. Незважаючи на зниження росту, вихід бутанолу значно збільшився. Проведений автором аналіз метаболічного потоку виявив важливу роль нещодавно ідентифікованого шляху біфуркації електрона для перетворення коензиму кротоніл-КоА в бутирил-КоА у регуляції окисно-відновного балансу. Порівняно з вихідним штамом, потік шляху біфуркації електронів мутанта з видаленою великою субодиницею гліцеролдегідратази (*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*.

Четвертий розділ присвячено використанню лігноцелюлозної сировини як субстрату. Охарактеризовано компонентний склад лігноцелюлозної сировини. Наведені розрахунки щодо складу незернової рослинної біомаси, зелених деревних насаджень та трав'яної (газонної та придорожньої) сировини міста Києва 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. Показано, що незернова рослинна біомаса містить компоненти, які можуть зброджуватись, а саме целюлозу, геміцелюлозу,

водорозчинні речовини та лігнін, що не конвертується мікроорганізмами, який складається з фенілпропанових ланок, пов'язаних різними типами міждодиничних зв'язків, які грають цементуючу роль для з'єднання клітин і збільшення властивостей механічної міцності, що робить лігноцелюлозу стійкою до біорозкладання мікроорганізмами. Проведені автором дослідження показали, що нетрадиційні субстрати (подрібнена незернова біомаса сої, ріпаку, дроговидного проса, пшениці; яблучні вичавки, сік топінамбура, технічний гліцерин, гліцерин-сирець) конвертуються штамми-продуцентами *Clostridium* sp. UCM B-7570 та *C. acetobutylicum* UCM B-7407 до біобутанолу.

Накопичення бутанолу штамом *C. acetobutylicum* UCM B-7407 за культивування на гліцерині-сирці відбувалось за його використання у концентрації в межах від 10 до 20 г/л. Найбільше накопичення бутанолу (2 г/л) відбувалось 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 *Clostridium acetobutylicum* UCM B-7407 від'ємно-доливним методом. У процесі культивування накопичення бутанолу штамом *Clostridium 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.

Скринінг штамів продуцентів бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570, *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *C. tyrobutylicum* IFBG C4B виявив, що найбільше накопичення бутанолу відбувалось у культуральній рідині за використання *Clostridium* sp. штаму UCM B-7570 та штаму *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та подрібненої біомаси цукрового сорго (1,5 г/л), а також соку (8,2 г/л) як субстрату. Автором визначено, що біомаса, сік та багаса сорго цукрового конвертувалась штамми-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. У роботі

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 штаммами-продуцентами. За умов використання сорту Energodar та hybrid AMBR-1, штам-продуцент *Clostridium* sp. UCM B-7570 накопичував найбільше бутанолу (5 г/л), за використання hybrid-720, hybrid ST-207 бутанол накопичувався у меншій кількості (1,5 г/л в обох випадках). 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.

Дослідження накопичення бутанолу штамми *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *Clostridium* sp. UCM B-7570 за використання субстрату – біомаси дрітвидного проса, попередньо обробленого вибуховим автогідролізом, показало, що найбільша концентрація бутанолу (2,8 г/л) отримана за використання штаму IFBG C6H 5M на біомасі дрітвидного проса після автогідролізу та «відгонки» фурфуролу. 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.

Проведено дослідження різних видів попередньої обробки (за використання лужного, кислотного, лужно-ензиматичного та кислотно-ензиматичного гідролізів, ультразвукової дезінтеграції (УЗД) та нативної обробки) біомаси рослинної сировини (соя, пшениця, ячмінь, соняшник, кукурудза, ріпак) для культивування штаму-продуценту бутанолу *Clostridium* sp. UCM 7570. Встановлено, що за умов лужного гідролізу біомаси сої та соняшника накопичення цільового продукту зросло 2,8 та в 3 рази, відповідно. Найбільший показник акумуляції бутанолу на біомасі пшениці

отримано за умов обробки УЗД, який зростав в 3 рази. Найбільш перспективним для біомаси ячменю та кукурудзи виявився кислотно-ензиматичний гідроліз, який збільшував вихід бутанолу в 4 та 5 разів, відповідно. Найбільше накопичення бутанолу на біомасі ріпаку 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 також отримано за використання УЗД як методу попередньої підготовки ріпаку (4,1 г/л).

Проведено культивування штамів *C. acetobutylicum* UCM B-7407 та *Clostridium* sp. UCM B-7570 на середовищі з різною підготовкою субстрата – скопу. Встановлено, що штами *Clostridium* sp. UCM B-7570 та *C. acetobutylicum* UCM B-7407 конвертували навіть необроблений скоп до бутанолу, однак накопичення цільового продукту було 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. При використанні скопу, обробленого вибуховим автогідролізом, накопичення бутанолу у культуральній рідині становило 1,6 та 1,1 г/л, відповідно.

Дослідження накопичення розчинників (етанолу та бутанолу) після ферментації штамом *Clostridium* sp UCM 7570 як нативної так і УЗД підробленої сировини із зелених деревних насаджень та трав'яної сировини показало, що 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, тоді як для більш цукровмісної сировини такої як газон оптимальною попередньою підготовкою є кавітування, яке дозволяє м'яко обробити субстрат з максимальним збереженням, що сприяє найбільшому накопиченню бутанолу.

Таким чином, отримані автором результати показали можливість використання лігноцелюлозної сировини як субстрату для біопалива.

П'ятий розділ присвячено особливостям культивування штамів-продуцентів *Clostridium*. Проведена іммобілізація клітин культури на кільцях Рашига, смужках бельтингу та феритових кільцях як носіях показала, що усі носії мали високу адгезивну активність щодо культури. Автором визначено, що за використання кілець Рашига, як носія для іммобілізації клітин культури, накопичення бутанолу збільшувалось в 2 рази (з 5,8 до 11 г/л, відповідно). Показано перспективу використання спільного культивування клостридій із бактеріями інших видів як методу зі збільшення продукції бутанолу. Показано можливість створення і використання штучних мікробних консорціумів: *Clostridium* sp. UCM B-7570 з *S. graminifolii* або з нижчими грибами *A. awamori* UCM F-100017, *A. niger* IFBG 4, *A. orizae* IFBG 49-B 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 продуцентом *Clostridium* sp. UCM B-7570 за рахунок зміни метаболічних шляхів у клітинах мікроорганізмів, опосередковано через дію стресових факторів: фурфуролу, $ZnSO_4$, гліцеролу, алопуринолу. 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. На основі отриманих даних, зроблено висновок, що підвищення накопичення продуктів АБЕ ферментації можливе за використання внутрішньої здатності мікроорганізмів адаптуватися до стресових умов, що дозволяє 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 роботі автора

оптимізовано склад захисного середовища, що дає можливість зберігати штами з мінімальною деградацією.

Представлені у дисертаційній роботі результати мають вагоме практичне та теоретичне значення, направлені на вирішення цілей сталого розвитку в галузі відновлюваної енергетики, зокрема, запровадження екологічно чистих джерел енергії, сприяють збереженню навколишнього середовища та переходу до більш ресурсоефективної економіки.

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

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

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

Вперше проведено іммобілізацію культури 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.

Практичне значення одержаних результатів. У ході виконання роботи автором секвеновано штам-продуцент бутанолу *Clostridium* sp. UCM B-7570 та

отримано лігнолітичний штам *Streptomyces graminifolii*. Штами поповнили «Колекцію штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України». Штам *Clostridium* sp. UCM B-7570 депоновано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

У роботі 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 ультразвукової обробки 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 з створенням інноваційних джерел енергії.

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

Ступінь обґрунтованості і вірогідності наукових досліджень та висновків дисертаційної роботи. Метою дисертаційної роботи О.О. Тігунової

було схарактеризувати штами-продуценти *Clostridium* sp. та дослідити процес АБЕ ферментації за використання лігноцелюлозних субстратів. Мета відображається в розробці сучасних біотехнологій та застосування для цього відновлювальних джерел сировини, що обґрунтовано необхідністю виробництва екологічно чистого біопалива та збереження природних ресурсів. Використання різноманітних сучасних методів і підходів, які базуються на вивченні літературних джерел, відтворюваність протоколів і експериментального матеріалу, їх відповідність з аналізом отриманих даних дозволяє підтвердити обґрунтованість і достовірність наукових положень і висновків, які сформульовані в дисертації.

У дисертаційній роботі використані сучасні 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).

Одержані результати всебічно проаналізовані. Комплексне використання сучасних методів, статистична обробка дозволяють підтвердити достовірність отриманих даних.

Повнота викладення основних наукових результатів роботи та апробація дисертації в опублікованих працях. 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 **Q2-Q3**, дві **Q4**); два патенти на винахід, розділи у монографіях, 32 тези доповідей на наукових конференціях. Це засвідчує визнання результатів дисертаційного дослідження вітчизняною та міжнародною фаховою науковою спільнотою.

Ідентичність реферату та основних положень дисертації. Дисертацію та реферат оформлено відповідно до вимог МОН України. Реферат викладено у науковому стилі літературною мовою. Він повною мірою відображає зміст дисертації, структуру та основні положення. Зміст реферату ідентичний основним положенням дисертації та стисло відображає її зміст.

Запитання і зауваження. У цілому матеріали у дисертаційній роботі викладено логічно, послідовно і з необхідним ступенем деталізації. Разом з тим, під час ознайомлення з дисертаційною роботою виникли окремі зауваження та запитання для наукової дискусії, які жодним чином не впливають на позитивну оцінку роботи і не знижують її теоретичну та практичну значність, але потребують уточнення.

1. Ряд зауважень стосуються розділу 2. «Матеріали та методи», зокрема:

- методи визначення вмісту речовин (вологи, сирію золи, целюлози, лігніну, водорозчинних пектинів та поліцукрів, геміцелюлоз, смол та жирів, калорійності зразків, залишкового метанолу в гліцерині, вільного і загального гліцерину в метилових ефірах біодизельного палива В-100), наведені на стор. 98–108, не містять посилань на ці методи, автору слід було б їх додати;

- у розділі 2.2 «Умови культивування та поживні середовища» автору слід було б додати посилання на першоджерела, згідно яких було застосовано складові компоненти цих середовищ та пояснити, який саме «посівний матеріал» або «посівну культуру» додавали до «посівного середовища»; також у цьому розділі слід було б зазначити, який саме тип середовища використовували для вивчення впливу стресових факторів для визначення накопичення бутанолу, надати на нього посилання та зазначити склад контрольного середовища;

- назва розділу 2.3. «Попередня підготовка сировини» не повністю відображує зміст цього розділу, тому, автору бажано її розширити відповідно змісту розділу, наприклад: «Попередня підготовка рослинної сировини для проведення гідролізу та конвертації мікроорганізмами з отриманням біобутанолу». Виникає також питання: чи застосовувались методи попередньої підготовки та гідролізу для незернової рослинної біомаси, перелік якої зазначено (дротовидного проса, сої, ріпаку, сорго, скопу та пшениці) як субстрату для конвертації мікроорганізмами з отриманням біобутанолу до сировини з інших джерел (кукурудзи, міскантусу, опалого листя та гілок різних порід дерев, різнотрав'я)?

- в розділі 2.7 автору доцільно було б додати посилання на метод ампліфікації гена 16S рРНК штаму *Clostridium* sp. IMB B-7570 та на метод максимальної правдоподібності, за допомогою якого здійснено молекулярно-філогенетичний аналіз;

- в розділі 2.8 автору доцільно було б надати опис методу конструювання рекомбінантного штаму-продуценту бутанолу, який більш детально викладено у розділі 3.5 експериментальної частини дисертаційної роботи;

- в розділі 2.9 автору доцільно було б додати склад ензиматичних середовищ для спільного культивування вищих грибів та штаму-продуценту *C. acetobutylicum* UCM B-7407, а також ензиматичних середовищ для спільного культивування *Clostridium* sp. UCM B-7570 з нижчими грибами *A. awamori* UCM F-100017, *A. niger* IFBG 4, *A. orizae* IFBG 49-B для накопичення бутанолу з рослинної сировини;

- автору доцільно було б перенести до розділу 2 «Матеріали та методи» методичний опис, який зустрічається в експериментальній частині дисертаційної роботи на стор. 217-224: «Встановлено нейтральне рН середовища за допомогою додавання крейди та HCl», при цьому слід було б замінити термін «крейда» на більш коректну назву хімічної сполуки «карбонат кальцію», або на хімічну формулу сполуки - CaCO_3 і зазначити концентрацію хімічної сполуки HCl;

- виникає питання щодо методів попередньої обробки, випробуваних для лігноцелюлозної біомаси, а саме, як були визначені критерії оптимізації, характерні для виробництва біобутанолу, і якими були основні показники ефективності попередньої обробки з точки зору підвищення виходу бутанолу; чи можуть ці показники істотно відрізнятися залежно від типу або складу біомаси, і якщо так, то як?

2. Базуючись на результатах науково-дослідної роботи автором доцільно було б відобразити практичний вихід бутанолу у вигляді науково-практичних рекомендацій, технологічних регламентів для промислового виробництва.

3. В експериментах було продемонстровано спільне культивування з аеробними організмами-партнерами як стратегію оптимізації накопичення бутанолу. Автору бажано було б надати більш детальну інформацію про процес відбору для цих партнерів, про конкретні механізми, за допомогою яких вони впливають на анаеробне виробництво бутанолу, і про будь-які спостережувані зміни в динаміці мікробного співтовариства під час бродіння.

4. У дослідженнях було виділено новий вітчизняний лігнолітичний штам бактерій для посилення ферментативного гідролізу. Автору бажано було б надати додаткові відомості про профіль ферментативної активності цього штаму та пояснити його порівняння з існуючими штамми з точки зору гідролітичної ефективності, специфічності субстрату та потенціалу для промислового масштабування.

5. По тексту дисертаційної роботи зустрічаються дрібні граматичні, стилістичні та друкарські помилки.

Загальний висновок і оцінка дисертації щодо її відповідності чинним вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. За своєю актуальністю, новизною, обґрунтованими науковими результатами, визначенням перспективних практичних напрямів і повнотою викладення основних наукових результатів роботи та апробації дисертації в опублікованих працях, дисертаційна робота Тігунової Олени Олександрівни «Характеристика нових штамів *Clostridium* sp. – продуцентів біобутанолу та їх

використання для АБЕ ферментації лігноцелюлозних субстратів», подана на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20. – біотехнологія відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» та вимогам пунктів 7–9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 року та МОН України щодо докторських дисертацій, а її автор Тігунова О.О. заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент

доктор біологічних наук,

старший науковий співробітник,

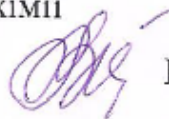
провідний науковий співробітник

відділу хімії біоактивних азотовмісних

гетероциклічних сполук

Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії

ім. В. П. Кухаря НАН України



Вікторія ЦИГАНКОВА

