

УДК 579.222

НОВІ ШТАМИ-ПРОДУЦЕНТИ БУТАНОЛУ. II. ФЕРМЕНТАЦІЯ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОЇ СИРОВИНИ

О. О. Тігунова
С. М. Шульга

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України», Київ

E-mail: Shulga5@i.ua

Отримано 07.02.2014

Мета роботи — дослідження родової та видової спорідненості вітчизняних штамів-продуцентів, здійснення порівняльного за продуктивністю скринінгу штамів-продуцентів бутанолу, проведення ферментації з використанням цукрів, які входять до складу відновлювальної лігноцелюлозної сировини, та визначення умов підвищення виходу бутанолу. Об'єктами дослідження були штами *Clostridium acetobutylicum* IMB B-7407 (IFBG C6H), IFBG C4B та IFBG C7P із «Колекції штамів мікроорганізмів і ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України. Вивчено вплив середовища на синтез бутанолу та визначено параметри культивування. Показано, що штами-продуценти бутанолу із зазначеної колекції більш продуктивні на середовищі ТГД порівняно з існуючими в інших колекціях і в подальшому їх можна використовувати для вдосконалення технології одержання бутанолу.

Ключові слова: біобутанол, лігноцелюлоза, штами-продуценти.

Виробництво рідких органічних продуктів і палива, передусім етанолу та бутанолу, з відновлювальної сировини (біомаси) в останні роки розвивається швидкими темпами [1–4]. Промислове виробництво розчинників відбувається з використанням запатентованих клостридіальних штамів-продуцентів [5–8]. Історично майже всі штами клостридій, що продукували розчинники, віднесено до *C. acetobutylicum*. Лише у декількох штамів *C. acetobutylicum* було детально вивчено біохімічні, генетичні та фізіологічні властивості й виявлено характерні відмінності між ними [9–11]. Найбільш універсальним і точним способом ідентифікації різних мікроорганізмів є аналіз нуклеотидної послідовності генів, що кодують рибосомальну РНК [10].

Найважливішим фактором одержання не тільки біобутанолу, але й виробництва біопалив загалом є використання дешевих субстратів. Одним із таких субстратів є рослинна біомаса. Для створення ефективної промислової (комерційної) технології виробництва біобутанолу з максимальним накопиченням кінцевого продукту потрібно мати високопродуктивні штами, знайти оптимальні умови культивування і використовувати дешеві субстрати з відновлювальної сировини. Окрім цих чинників накопичення бутанолу можна також збільшити, змінивши метаболічні шляхи синтезу.

Метою роботи було визначення родової та видової спорідненості вітчизняних штамів-продуцентів, здійснення порівняльного за продуктивністю скринінгу штамів-продуцентів бутанолу, проведення ферментації з використанням цукрів, які входять до складу відновлювальної лігноцелюлозної сировини, та визначення умов підвищення виходу бутанолу.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були штами IMB B-7407 (IFBG C6H), IFBG C4B та IFBG C7P із «Колекції штамів мікроорганізмів і ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» (далі — Колекція) Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України.

Як активаційне середовище використовували середовище Виноградського і скибки картоплі, натерті крейдою, як ферментаційне середовище — мелясу [1]. Для вивчення продуктивності штамів на різних джерелах вуглецю застосовували середовище P2 [12].

Для визначення біоконверсії лігноцелюлозної сировини культурами використовували середовище Омелянського такого складу (в г на 1 л водогінної води): NH_4Cl — 1,0; K_2HPO_4 — 0,5; CaCO_3 — 1,0; фільтрувальний папір — 10,0. Стерилізацію проводили протягом 30 хв (тиск 0,5 атм).

Чистоту культур визначали, використовуючи середовище МАВ [1].

«Живі» препарати забарвлювали розчином Люголя, а для вітального забарвлення використовували метиленовий синій. Мікроскопію проводили за допомогою мікроскопа Laboval (Німеччина). Знімки робили фотоапаратом Canon PowerShot A640 (Японія).

Культивування продуцента бутанолу здійснювали за методикою [1]. Вплив терміну ферментації на синтез бутанолу культурами вивчали за максимальним накопиченням бутанолу та визначенням інших продуктів бродіння в інтервалі від 1 до 9 діб. Після цього клітини осаджували за допомогою ультрацентрифуги Labofuge 400R (Німеччина), супернатант переганяли й визначали продукти бродіння.

Для виявлення масляної кислоти в культуральній рідині використовували реакцію утворення маслянокислого заліза [1]. Його кількість вираховували за допомогою фотокolorиметра КФК-5 ($\lambda = 540$ нм, вихідне середовище слугувало стандартом). У культуральній рідині виявляли етанол, бутанол та ацетон за допомогою методики [1].

З метою визначення природної стійкості до антибіотиків штамів-продуцентів бутанолу відбирали антибіотики з основних груп: макроліди — азитроміцин, еритроміцин; аміноглікозиди — гентаміцин; нітрофуранни — ніфуроксазид; ароматичні полікетидні антибіотики — тетрациклін; сульфаніламідни — гросептол, бісептол, сульфадиметоксин. Бактерії висівали на середовище, яке містило 20 мкг/мл відповідних антибіотиків [13]. Для визначення продукції рибофлавіну у молоці використовували коров'яче молоко 2,8% -ї жирності. Бактерії для виділення ДНК культивували на збагаченому м'ясопептонному бульйоні за температури 37 °С протягом доби (склад середовища: м'ясопептонний бульйон — 0,1 л; глюкоза — 0,1 г; дріжджовий екстракт — 0,5 г).

Виділення ДНК проводили згідно з [14]. Для ефективного лізису клітин додавали 1% -й розчин лізоциму (10 мг/мл). Електрофоретичне розділення виділеної ДНК здійснювали в трис-ацетатній буферній системі. Склад трис-ацетатного буфера (50x) на 1 л: трис-НСІ — 242 г, крижана оцтова кислота — 57 мл, 0,5 М ЕДТА — 100 мл.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) у пробірках з ультратонкими стінками. Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера із сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів (до

фрагмента 16S РНК з 27-го по 907-й нуклеотид), 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Таq-полімерази, 2,0 мМ хлориду магнію, 10–50 нг проби ДНК. Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 20 мкл. Умови ампліфікації: початкова денатурація: 94 °С — 3 хв; 95 °С — 30 с, 57 °С — 45 с, 72 °С — 30 с; кількість циклів — 32. Кінцева елонгація: 72 °С — 5 хв.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації здійснювали в трис-ацетатній буферній системі. Фрагмент виділяли з агарозного гелю за допомогою набору Macherey-Nagel NucleoSpin Extract згідно з інструкцією фірми-виробника.

Послідовності секвенували на автоматичному секвенаторі ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Результуючий контиг секвенування одержували, порівнюючи пряму та зворотно-комплементарну послідовності з використанням програми CLC Main Workbench (CLC bio). Аналіз сиквенсу проводили за допомогою програмного забезпечення MEGA5, включаючи алгоритм CRUSTAL V.

Статистичну обробку здійснювали із застосуванням програми Microsoft Excel. Досліди виконували в трьох повторях. Різницю між двома середніми величинами вважали вірогідною за $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Для порівняльного скринінгу *C. acetobutylicum* IFBG C6H серед споріднених штамів було визначено послідовність нуклеотидів із 16S рРНК.

З метою визначення родової спорідненості штамів виділили та секвенували фрагмент послідовності (рис. 1). На основі цих даних здійснено порівняльний аналіз визначеної нуклеотидної послідовності генів 16S

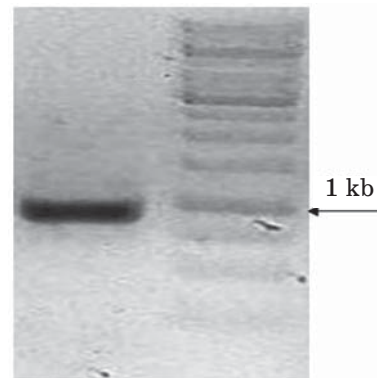


Рис. 1. Електрофореграма фрагмента 16S РНК *C. acetobutylicum* IFBG C6H

PHK із послідовностями бази даних GenBank. Результати аналізу показали, що гомологія з існуючими штамми (*C. acetobutylicum* 824, *C. acetobutylicum* 512, *C. acetobutylicum* DSM 1731, *C. saccharoperbutylacetonicum* N 1-4, *C. saccharolyticum* K 10) перевищує 90%.

Видову спорідненість штамів із Колекції визначали, застосовуючи фенотиповий прийом — синтез штамми рибофлавіну в молочному середовищі (рис. 2).



Рис. 2. Скважування молока штамми *C. butylicum* IFBG C7P та *C. acetobutylicum* IFBG C6H (P та H на фото, відповідно)

Культури IFBG C6H та IFBG C7P сквашували молоко після 56 та 48 год культивування, відповідно. Обидві культури упродовж 10 діб культивування за температури 4 °C не змінювали забарвлення середовища (рис. 2), що свідчило про низьку концентрацію рибофлавіну. Порівнюючи результати з даними літератури [10], можна зробити висновок про спорідненість штамів з культурою *C. saccharoperbutylacetonicum*.

Окрім синтезу рибофлавіну в молочному середовищі, застосовували й інший фенотиповий прийом — визначення рівня продукції бутанолу на середовищі ТГД (рис. 3).

Обидві культури — *C. butylicum* IFBG C7P та *C. acetobutylicum* IFBG C6H — на середовищі ТГД продукували бутанол у концентрації 1 г/л та 1,5 г/л, відповідно. Порівнюючи результати з даними літератури [10], дійшли висновку, що штамми IFBG C7P та IFBG C6H більш продуктивні на середовищі ТГД, ніж усі види роду *C. acetobutylicum*.

Було також проведено видову ідентифікацію штамів-продуцентів бутанолу з Колекції за такою фенотиповою ознакою, як стійкість бактерій до антибіотиків. Дані про резистентність мікроорганізмів до антибіотиків є важливими для їх генетичного аналізу та, зокрема, у разі отримання мутантів. В експе-

риментах з генної інженерії часто використовують рекомбінантні ДНК, які містять маркерні гени резистентності до антибіотиків, хоча для виділення резистентних мутантів можна застосовувати і пряму селекцію [13]. Для виявлення природної стійкості штамів-продуцентів бутанолу з Колекції було досліджено їхню чутливість до антибіотиків (табл. 1).

Із наведених даних випливає, що обидва штамми-продуценти є чутливими до гентаміцину, штаму IFBG C7P — до еритроміцину та тетрацикліну, а IFBG C6H — до бісептолу. Результати дослідження підтверджують належність культур до різних видів однієї родини. У подальшому для культивування *C. acetobutylicum* IFBG C6H використовували середовища з тетрацикліном, а для культивування *C. butylicum* IFBG C7P — з бісептолом.

Для визначення впливу різних джерел вуглецю на синтез бутанолу було досліджено процес зброджування компонентів біомаси — цукрів, які входять до складу геміцелюлоз [5].

Таблиця 1. Чутливість штамів-продуцентів бутанолу до антибіотиків

Антибіотик	<i>C. acetobutylicum</i> IFBG C6H	<i>C. butylicum</i> IFBG C7P
Гросептол	–	–
Азитроміцин	–	–
Тетрациклін	–	+
Бісептол	+	–
Сульфадиметоксин	–	–
Ніфуроксазид	–	–
Гентаміцин	+	+
Еритроміцин	–	+

Примітка: «–» — культура не чутлива, «+» — культура чутлива.

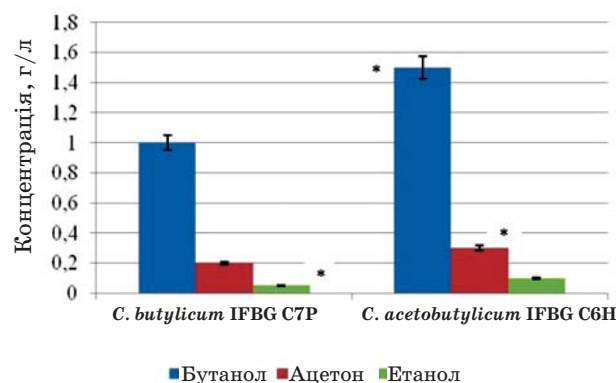


Рис. 3. Синтез розчинників культурами *C. butylicum* IFBG C7P та *C. acetobutylicum* IFBG C6H на середовищі ТГД (Тут і далі: * — $P < 0,05$; за контроль приймали найнижчий рівень синтезу)

Культури IFBG C6H та IFBG C7P культивували на синтетичних середовищах, які містили як одне із джерел вуглецю ксилозу, арабінозу, манозу та целюлозу.

Штами зброджували всі цукри, які входять до складу геміцелюлоз (рис. 4). Максимальний вихід бутанолу (1,9 г/л) для штаму IFBG C6H фіксували у разі використання ксилози, а для штаму IFBG C7P (1,3 г/л) – целюлози. Отже, штами-продуценти бутанолу з Колекції зброджували всі види цукрів, які входять до складу лігноцелюлозної сировини, хоча й з різною ефективністю.

Для продуктивного культивування мікроорганізмів мають значення склад середовища і технологічні умови, які забезпечуватимуть високу продуктивність накопичення біомаси і вміст необхідних метаболітів, у даному разі — бутанолу.

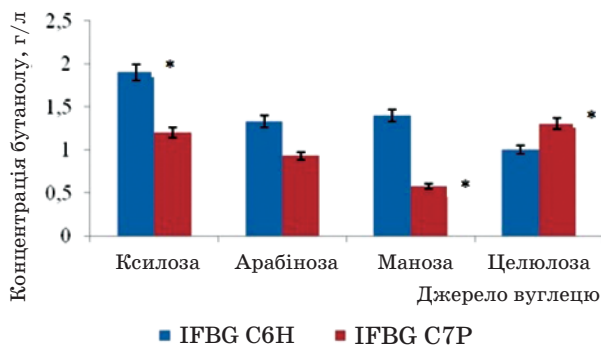


Рис. 4. Вплив джерела вуглецю на синтез бутанолу культурами IFBG C6H та IFBG C7P

Досліджували також вплив підготовки ензиматичного середовища для синтезу бутанолу та оптимізації параметрів культивування. Одним із чинників, що впливають на ріст мікроорганізмів та їхню фізіологічну активність, є температура культивування. Вивчено процес накопичення бутанолу для штамів IFBG C6H та IFBG C7P зі зміною температури культивування. Показано, що підвищення температури з 28 до 36 °C сприяло збільшенню накопичення бутанолу для обох штамів, тимчасом як підвищення температури до 38 °C зменшувало вміст розчинника в культуральній рідині (рис. 5). Подальші дослідження проводили за температури 36 °C.

Суттєвий вплив на накопичення бутанолу має рН середовища. Досліджено вплив зміни рН середовища на синтез бутанолу штамми IFBG C6H та IFBG C7P.

Встановлено, що максимальне накопичення бутанолу (3,5 г/л) штамом IFBG C6H у культуральній рідині відбувалося за рН 7,0, а штамом IFBG C7P — 2,5 г/л за рН 6,0. Коливання рН від 5,0 до 7,0 суттєво не впли-

вало на накопичення бутанолу штамом IFBG C7P (рис. 6).

Вплив на продуктивність культивування справляє його тривалість. Було досліджено вплив терміну ферментації на синтез бутанолу культурами IFBG C6H та IFBG C7P.

Показано, що максимальне накопичення бутанолу для штамів IFBG C6H та IFBG C7P на синтетичному середовищі за визначених раніше оптимальних умов спостерігалось на 72-гу год культивування. За подальшого культивування кількість розчинника не збільшувалась (рис. 7).

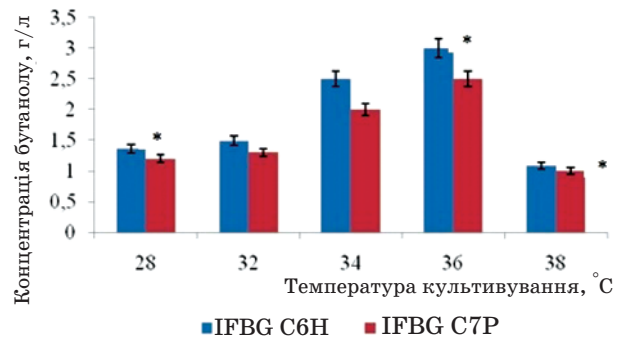


Рис. 5. Вплив температури культивування на продукування бутанолу штамми IFBG C6H та IFBG C7P

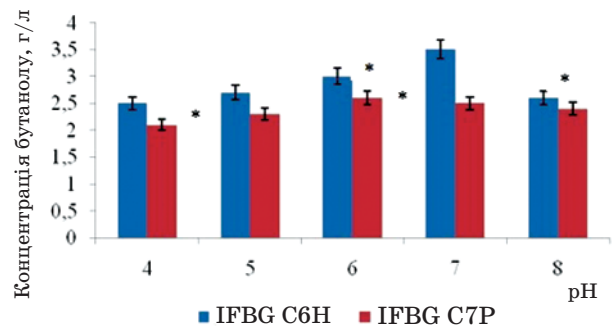


Рис. 6. Вплив рН середовища на синтез бутанолу штамми IFBG C6H та IFBG C7P

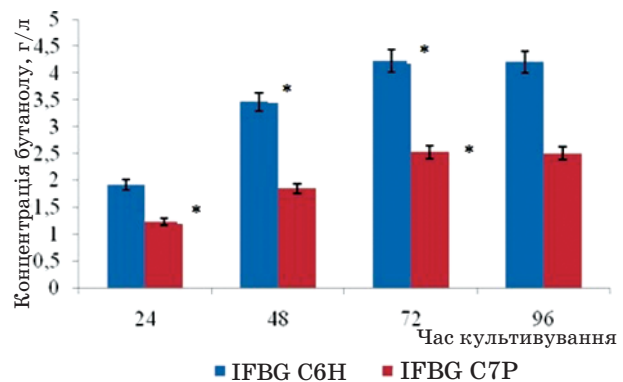


Рис. 7. Вплив терміну культивування на накопичення бутанолу штамми IFBG C6H та IFBG C7P

У процесі дослідження продуктивності штамів IFBG C7P та IFBG C6H було визначено концентрацію бутанолу в культуральній рідині та проведено її порівняння з концентрацією за використання гомологічно-споріднених штамів (табл. 2).

З даних табл. 2 випливає, що штам-продуценти бутанолу IFBG C7P та IFBG C6H є продуктивними і перспективними з метою використання як основи для вдосконалення технології одержання бутанолу.

Для вивчення ступеня біоконверсії лігноцелюлозної сировини було проведено ферментацію з використанням як субстрату фільтрувального паперу (рис. 8).

Дослідження показали, що біоконверсія цієї лігноцелюлозної сировини для штамів IFBG C6H становила близько 90%, для IFBG C7P — 60%, а для IFBG C4B — 30%. У процесі культивування всі штам-продуценти оцтову та масляну кислоти в сумарній концентрації 4 г/л і не продукували розчинників. Культуральну рідину після біоконверсії лігноцелюлозної сировини використовували як додатковий субстрат до ензиматичного

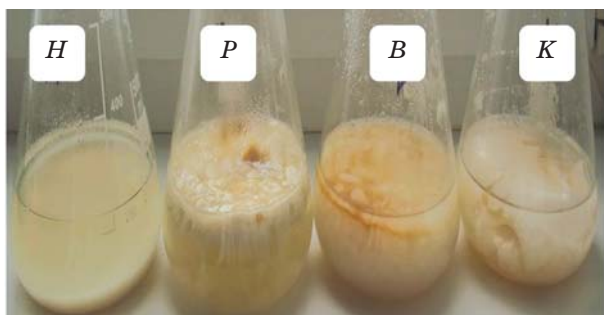


Рис. 8. Біоконверсія фільтрувального паперу: (H — *C. acetobutylicum* IFBG C6H; P — *C. butylicum* IFBG C7P; B — *C. tyrobutyricum* IFBG C4B; K — контроль)

Таблиця 2. Синтез розчинників штам-продуцентами бутанолу

Штам-продуценти	Вихід АБЕ- (ацетону-бутанолу-етанолу) продуктів (г/л) на середовищі P2 з різними джерелами вуглецю			
	Глюкоза	Ксилоза	Арабіноза	Целюлоза
<i>C. acetobutylicum</i> 824	5,7:10:1,1 [14,15]	0,2:1,9:0,2 [16,17]	0,2:1,9:0,2 [18]	0,1:2,4:0,2 [19]
<i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	1,7:5,1:4,59 [20]	0,89:2,7:2,4 [21]	0,89:2,6:2,4 [22]	1,4:4,2:3,78 [22]
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1731	0,5:11:2 [23]	Немає даних	Немає даних	Немає даних
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N 1-4	0,56:4,86:0,85 [12]	0,84:1,23:0,15 [12]	0,84:1,23:0,15 [12]	0,11:0,25:0,04 [12]
<i>C. acetobutylicum</i> IFBG C6H	0,7:8*:0,05	0,019:1,9*:-**	0,02:1,5:0,01*	0,013:1,1:0,01*
<i>C. butylicum</i> IFBG C7P	0,2:6*:0,03	0,015:1,3:0,02*	0,018:0,8:-**	0,02*:1,3:-**

Примітка: * — за контроль приймали найнижчий рівень синтезу; ** — не продукують.

мелясного середовища, рН стабілізували, додаючи крейду. Результати культивування IFBG C7P та IFBG C6H на ензиматичному середовищі (К) з додаванням культуральної рідини подано на рис. 9.

Результати культивування свідчать, що використання культуральної рідини після біоконверсії як додаткового субстрату до ензиматичного середовища лігноцелюлозної сировини збільшувало вихід бутанолу для IFBG C6H на 20%, а для IFBG C7P — майже на 35%.

Одержані дані дали змогу в подальшому використовувати культуральну рідину після біоконверсії лігноцелюлозної сировини для підвищення продуктивності штамів.

Таким чином, у результаті досліджень встановлено, що гомологія штам-продуцентів бутанолу з Колекції з існуючими штам-продуцентами інших колекцій становила більше 90%. За допомогою фенотипових прийомів показано найбільше споріднення штамів із Колекції зі штам-продуцентами

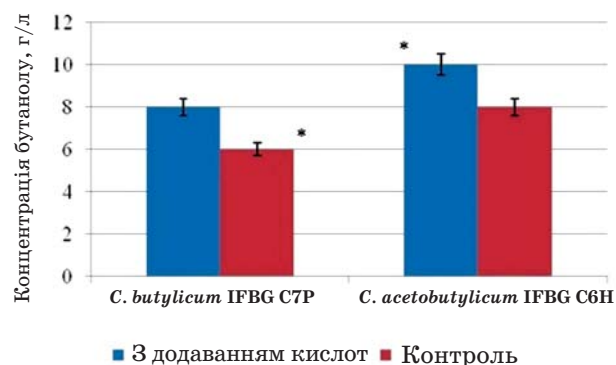


Рис. 9. Культивування *C. butylicum* IFBG C7P та *C. acetobutylicum* IFBG C6H на ензиматичному середовищі (К) з додаванням культуральної рідини після біоконверсії лігноцелюлози

C. saccharoperbutylacetonicum. Природна стійкість до антибіотиків подібна до стійкості клостридіальних штамів відповідних видів, що є також одним із підтверджень належності цих штамів до клостридій. Результати свідчать, що штами із Колекції продукують більше бутанолу на середовищі ТГД, ніж інші види *C. acetobutylicum*. Показано, що штами IFBG С7Р та IFBG С6Н у разі культивування окремих складових лігноцелюлозних субстратів зброджували усі цукри, які входять до складу геміцелюлоз. У результаті порів-

няльного скринінгу зі штамми інших колекцій було встановлено, що штами IFBG С7Р та IFBG С6Н є продуктивними і в подальшому їх можна використовувати для вдосконалення технології виробництва бутанолу. Оптимізовано умови культивування штамів (Т = 36 °С, рН 5–7, термін культивування 3 доби) і знайдено технологічний прийом (використання культуральної рідини після біоконверсії лігноцелюлозної сировини як додаткового субстрату до ензиматичного середовища) для підвищення виходу бутанолу.

REFERENCES

1. Tigunova O. O., Shulga S. M. New producer strains of biobutanol. I. Isolation and identification. *Biotechnologia Acta*. 2013, 6(1), 97–104. (In Ukrainian).
2. Olyynichuk S., Kizun G., Shiyani P., Sosnitskiy V. Modern and perspective technologies of biological fuel in the world market. *Kharchovata pererobna promyslovist*. 2009, 6(358), 11–13. (In Ukrainian).
3. Pletnev I. Y. Waste as a source of biodiesel products with high added value. *Biotechnologiya*. 2009, V. 1, P. 3–10. (In Russian).
4. Tigunova O. O., Shulga S. M., Blume Y. B. Biobutanol as an Alternative Type of Fuel. *Cytologia i Genetica*. 2013, 47 (6), 51–71.
5. Tigunova O. O., Shulga S. M. Obtaining of new butanol producers. *Abstracts of the 15th European Congress of Biotechnology, Istanbul, Turkey*, 23–29 September 2012.
6. Shulga S. M., Tigunova O. O., Blume Y. B. Lignocellulose as an alternative source for obtaining of butanol. *Biotechnologia Acta*. 2013, 6(2), 9–21. (In Ukrainian).
7. Tigunova E. A., Shulga S. M. Synthesis butanol strains *C. acetobutylicum* on alternative substrates. *Proceedings of the 7th International Congress Biotechnology: State and Prospects for Development, Russia, Moscow*, 19–22 March 2013. (In Russian).
8. Ablaev A. P. Big oil and biofuels. *Biotechnologiya*. 2011, V. 3, P. 8–14. (In Russian).
9. Wilkinson S. R., Young M., Goodacre R., Morris J. G., Farrow J. A. E., Collins M. D. Phenotypic and genotypic differences between certain strains of *C. acetobutylicum*. *FEMS Microbiology letters*. 1995, 125(1-2), 199–204.
10. Jonson L. J., Toth J., Santiwatanakul S., Chen J. S. Cultures of “*Clostridium acetobutylicum*” from Various Collections Comprise *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, and two other Distinct Types Based on DNA-DNA Reassociation. *Int. J. System. Bact.* 1997, 47(2), 420–424.
11. Keis S., Bennett C. F., Ward K. V., Jones D. T. Taxonomy and Phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *Int. J. System. Bacteriol.* 1995, 45(4), 693–705.
12. Al-Shorgani N. K. N., Kalil N. S., Yusoff W. M. W. The effect of different carbone sources on biobutanol production using *C. saccharoperbutylacetonicum* N 1–4. *Biotechnology*. 2011, 10(3), 280–285.
13. Fedorenko V., Ostash B., Rebets Y., Gonchar M. Large workshop on genetics, genetic engineering and biotechnology analysis of microorganisms. *Lviv*. 2007. 279 p. (In Ukrainian).
14. Linggang S., Phang L. Y., Wasoh H., Abd-Aziz S. Acetone–Butanol–Ethanol Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Using Sago Pith Residues Hydrolysate. *BioEnergy Research*. 2013, 6(1), 321–328.
15. Colass F., Kuit W., Clement B., Marchal R., Lopez-Contreras A. M., Monot F. Simultaneous production of isopropanol, butanol, ethanol and 2,3-butanediol by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 engineered strains. *AMB Express*. 2012, 2(45), 1–10.
16. Xiao H., Gu Y., Ning Y., Yang Y., Mitchell W. J., Jiang W., Yang S. Confirmation and elimination of xylose metabolism bottlenecks in glucose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system-deficient *Clostridium acetobutylicum* for simultaneous utilization of glucose, xylose, and arabinose. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77(22), 7886–7895.
17. Yong C., Tao Z., Dong L., An L., Songbo X., Qingguo L., Bingbing L., Hanjie Y. Production of butanol from glucose and xylose with immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology & Bioprocess Engineerin.* 2013, 18(2), 234–241.
18. Sivagnanam K., Raghavan V. G. S., Shah M. Characterization of *Clostridium acetobutylicum* Protein Interaction Network from Butanol Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70(9), 5238–5243.
19. López-Contreras A. M., Gabor K., Martens A. A., Renckens B. A., Claassen P. A., Van Der Oost J., De Vos W. M. Substrate-Induced

- Production and Secretion of Cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70(9), 5238–5243.
20. López-Contreras A. M., Smidt H., van der Oost J., Claassen P. A., Mooibroek H., De Vos W. M. *Clostridium beijerinckii* Cells Expressing *Neocallimastix patriciarum* Glycoside Hydrolases Show Enhanced Lichenan Utilization and Solvent Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67(11), 5127–5133.
21. Xiao H., Li Z., Jiang Y., Yang Y., Jiang W., Gu Y., Yang S. Metabolic engineering of D-xylose pathway in *Clostridium beijerinckii* to optimize solvent production from xylose mother liquid. *Metab. Eng.* 2012, 14(5), 569–578.
22. Watsom J. E. Pentose Sugar Utilisation in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 for Biobutanol Production: Genetic and Physiological Studies. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements of Edinburgh Napier University, for award of Doctor of Philosophy, 2012. 229 p.
23. Lutke-Eversloh T., Bahl H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Cur. Opin. Biotechnol.* 2011, 22(5), 1–146 DOI: 10.1016/j.copbio.2011.01.011.

НОВЫЕ ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ БУТАНОЛА. II. ФЕРМЕНТАЦИЯ ЛИГНИНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ

Е. А. Тигунова
С. М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии
и геномики» НАН Украины, Киев

E-mail: Shulga5@i.ua

Цель работы — исследование родового и видового родства отечественных штаммов-продуцентов, осуществление сравнительного по производительности скрининга штаммов-продуцентов бутанола, проведения ферментации с использованием сахаров, входящих в состав восстановительного лигноцеллюлозного сырья и определение условий повышения выхода бутанола. Объектами исследования были штаммы *Clostridium acetobutylicum* IMB B-7407 (IFBG C6H), IFBG C4B и IFBG C7P из «Коллекции штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» Института пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины. Изучено влияние среды на синтез бутанола и определены оптимальные параметры культивирования. Показано, что штаммы-продуценты бутанола из этой коллекции являются более продуктивными по сравнению с существующими в других коллекциях и в дальнейшем могут использоваться для усовершенствования технологии получения бутанола.

Ключевые слова: биобутанол, лигноцеллюлоза, штаммы-продуценты.

NEW STRAINS PRODUCER OF BUTANOL. II. RENEWABLE LIGNOCELLULOSE FERMENTATION

O. O. Tigunova
S. M. Shulga

State Organization «Institute of Food
Biotechnology and Genomics»
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: Shulga5@i.ua

The purpose of our work was to study generic and specific affinity of domestic strains-producers, comparative productivity butanol strains-producers screening, fermentation of sugars being a part of renewable lignocellulose raw materials and to determine the conditions for the butanol yield increasing. The objects of research were strains *Clostridium acetobutylicum* IMB B-7407 (IFBG C6H), IFBG C4B and IFBG C7P from «Collection microorganism's stains and plants line for food and agriculture biotechnology» of Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine. It was determined that domestic butanol-producing strains were relatively more productive and might be promising for improvement technology of butanol production.

Key words: biobutanol, lignocellulose, strains producer.