

ПОСИЛЕННЯ ПРОДУКЦІЇ БУТАНОЛУ КЛІТИНАМИ *CLOSTRIDIUM SP.* ПІД ВПЛИВОМ СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ

О.О. ТІГУНОВА¹, В.В. БРАТІШКО², С.М. ШУЛЬГА¹

¹ ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», вул. Байди Вишневецького 2а, Київ, 04123, Україна

² Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони 15, Київ, 03041 Україна

E-mail: Shulga5@i.ua

Біобутанол — один із видів біопалива, який одержують за допомогою мікробного синтезу (ацетон-бутанол-етанольна ферментація). Підвищити рівень накопичення цільового продукту можна за рахунок метаболічних змін у клітинах-продуцентах за умов впливу стресових факторів. З цією метою було досліджено вплив на функціонування клітин Clostridium sp. таких стресових чинників, як алопуринол, фурфурол, цинк, кисень, а також гліцеролу як неспецифічного субстрату. 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 культуральне середовище. Використання ZnSO₄ в концентрації 0,001 г/л підвищувало концентрацію бутанолу до 1,1 г/л, а найбільшу 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 підвищувалась до 0,8 г/л за умов додавання 0,025 г/л алопуринолу. Обґрунтовано можливість використання везьезданих стресових чинників для підвищення накопичення цільового продукту за рахунок впливу на метаболічні шляхи у клітинах мікроорганізмів.

Ключові слова: Clostridium, штам продуцент, бутанол, стресові фактори, алопуринол, фурфурол, цинк, кисень, гліцерол

Вступ. В останні роки все більше уваги приділяється виробництву альтернативних видів палива, і в першу чергу, етанолу та бутанолу із поновлювальної сировини — незернової біомаси рослин (Raiz, 2022), і мікробіологічний синтез є одним із методів отримання біобутанолу як палива (Тігунова, 2020). За своїми характеристиками бутанол може конкурувати з викопними видами палива за умов створення конкурентоспроможної технології з використанням дешевої сировини як субстрату і стійких промислових штамів-продуцентів з підвищеним накопиченням кінцевого продукту

(Guo, 2022). Для промислового виробництва біобутанолу за допомогою *Clostridium sp.* потрібно вирішити ряд проблем (Torres, 2022). Зокрема, мати штами-продуценти з підвищеним накопиченням бутанолу, використовувати дешеву та бажано поновлювальну сировину, як субстрат, оптимізувати умови їх культивування, зменшити інгібуючий вплив на ріст та розвиток культури компонентів культурального середовища в процесі культивування (Вар, 2022). Для успішного проведення культивування необхідно дослідити і визначити метаболічні шляхи та мати можливість регуляції ферментативних процесів. Також треба слідкувати за тим, щоб в складі середовища росту не було репресуючих речовин (Molognoni, 2023).

Для досягнення необхідної концентрації бутанолу, достатньої для комерціалізації промислового виробництва, використовують різні методичні підходи, серед яких метаболічна інженерія та індукція метаболічних змін у мікроорганізмах. Ці методи дозволяють підвищити використання субстрату, збільшити швидкість росту клітин і продуктивність продуцентів (Zhou, 2023). Лігноцелюлозна біомаса рослин стає відносно доступним і дешевим джерелом зброджуваних цукрів для виробництва альтернативного палива. Однак, використання цукрів, отриманих з біомаси рослин для виробництва бутанолу, створює певні проблеми головним чином через складні метаболічні переключення та вплив накопичення інгібуючих сполук на ріст мікроорганізмів (Mahalinga, 2022). Для послаблення цих негативних явищ і збільшення конверсії виникає необхідність використання нетрадиційних методів (Ujor, 2016), серед яких використання впливу стресових факторів на клітини мікроорганізмів.

Дія стресових факторів може призводити до збільшення накопичення бутанолу, зміни

метаболічного шляху цільового продукту та підвищення стійкості до сполук-інгібіторів, що пригнічують ріст клітин і утворення спиртів (Foulquier, 2022). Тому метою роботи було дослідження впливу таких стресових чинників, як алопуринол, фурфурол, цинк, кисень та неспецифічного субстрату гліцеролу на функціонування клітин *Clostridium sp.* UCM B-7570 та на накопичення бутанолу в культуральному середовищі.

Матеріали та методи. Для досліджень використовували *Clostridium sp.* UCM B-7570 з «Колекції штамів мікроорганізмів і ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології ДУ Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України» та незернову біомасу ріпаку *Brassica napus* з Національного наукового центру «Інститут механізації та електрифікації сільського господарства»: В роботі також використовували гліцерол («BASF», ФРН), $ZnSO_4$ («Merck», ФРН), фурфурол («Thermo Fisher Scientific», Литва), алопуринол («Сандоз», Україна).

Культивування проводили в колбах з рідким середовищем або на чашках Петрі в ексікаторі. Кришку ексікатора герметично притирали. Після притирання ексікатор тричі продували азотом та ставили до термостату нагрітого до 30 °C. 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 °C. Різні концентрації кисню в культуральному середовищі створювали за рахунок зміни швидкості перемішування в шейкері-інкубаторі («BIOSAN ES-20», Латвія).

Для приготування середовища з незернової біомаси ріпаку використовували наважки 5,0 г/л води та стерилізували під тиском 2 атм впродовж 2 год (Tigunova et al, 2019). Незернову біомасу ріпаку сушили при температурі 30 ± 1 °C впродовж 168 год. Суху біомасу подрібнювали за допомогою лабораторного млину «Циклон МШ 1» (Україна) до розміру 200 ± 10 меш. Вологість сировини визначали за допомогою вагового аналізатору вологості RADWAG MA 50/C/1 (Польща). Для вивчен-

ня 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 (Tigunova et al, 2019) 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 при 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).

Культивування проводили у 500 мл колбах з заповненням 250 мл середовища та гідрокислотними модулями. Колби зважували та термостатували при температурі 35 ± 1 °C. Після 72 год культивування клітини осаджували впродовж 10 хв з використанням ультрацентрифуги «Labofuge 400R» (Німеччина) за швидкості 13000 об/хв і вилучали продукти бродіння з культуральної рідини. Концентрацію бутанолу в культуральній рідині визначали за допомогою газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором. Використовували набивну колонку довжиною 3 м, фаза – карбовакс 1500 на хроматоні N-A-W-DMSC (0,20–0,25 мм). Температура колонки 60 ± 2 °C, випарювача – 160 ± 5 °C. Співвідношення потоків азот-водень-повітря – 1 : 1 : 10.

Статистична обробка даних була виконана за допомогою програми Microsoft Excel. Усі досліди проводили в трьох повторах. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при $p < 0,05$.

Результати досліджень і їх обговорення. Оптимізація умов культивування продуцентів при використанні різних субстратів є одним із етапів в процесі підвищення накопичення цільового продукту (Zbogowska, 2021). Для активізації внутрішніх процесів в клітинах створюють стресові умови для культури, які обумовлюються використанням лімітованого внесення в культивацийне середовища репресорів росту та розвитку (Luo, 2021). Фурфурол є од-

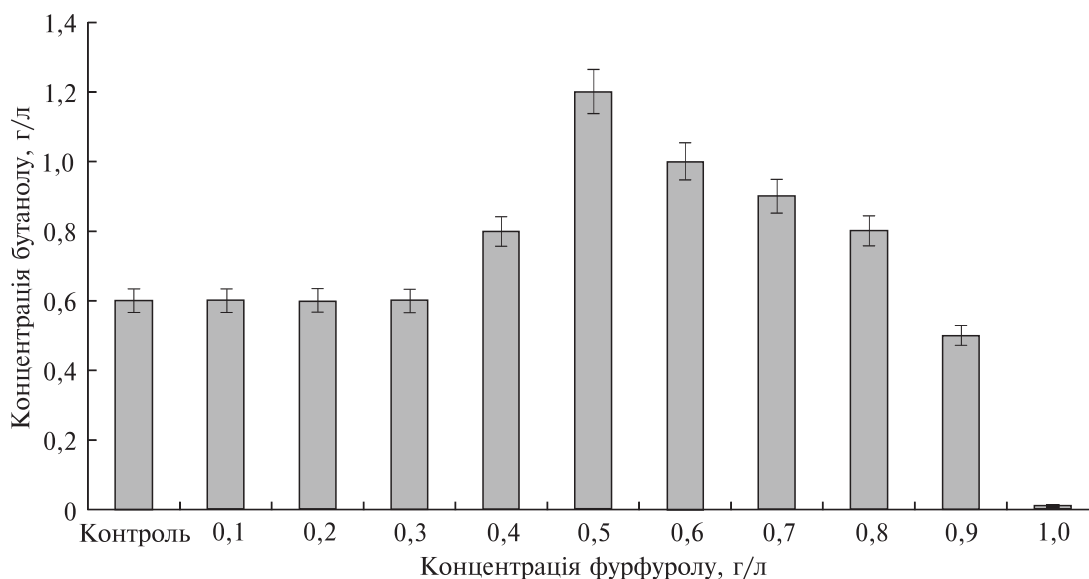


Рис. 1. Вплив концентрації фурфуролу на накопичення бутанолу продуцентом *Clostridium sp.* UCM B-7570

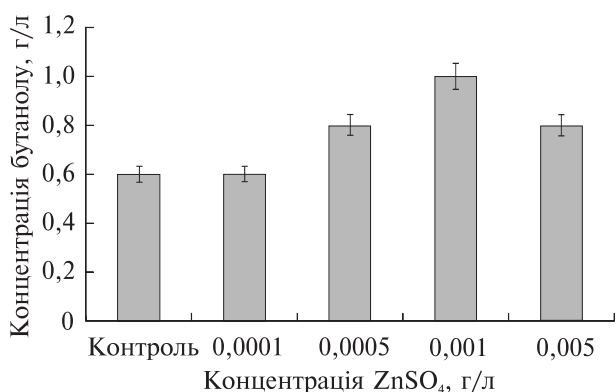


Рис. 2. Вплив концентрації ZnSO₄ на накопичення бутанолу культурою *Clostridium sp.* UCM B-7570

нією з таких речовин, яка має інгібуючий вплив в процесі АБЕ ферментації (Gong, 2023). Нами було вивчено вплив фурфуролу на накопичення бутанолу продуцентом *Clostridium sp.* UCM B-7570 за використання біомаси ріпаку як субстрату (рис. 1.)

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. Стимулюючий вплив фурфуролу на ріст клітин та солвентогенез по-

в'язаний з підсиленою регенерацією нікотинамідиноклєотиду (НАД⁺), що прискорює окисну стадію (від гліцеральдегід-3-фосфат до 1,3-бісфосфогліцерату) гліколітичного шляху і, в кінцевому рахунку, збільшує гліколіз (Ujor, 2016). За такою ж схемою фурфурол впливає на нікотинамідиноклєотидфосфат (НАДФН), який відіграє ключову роль в переході від ацето- до солвентогенезу (Тігунова, 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, 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, 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, 2022). Досліджено вплив різної концентрації ZnSO₄ на накопичення бутанолу (рис. 2).

Показано, що ZnSO₄ 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. В роботі (Wu, 2019) було показано, що використання низьких концентрацій цинку приводило до підвищення накопичення біомаси, помірного збільшення накопичення розчинників та продуктивності культури. Використання таких концентрацій цинку приводило до раннього початку солвентогенеза, який можна пояснити наявністю у клостридій Zn -залежних доменів активації ферментів, наприклад, алкогольдегідрогенази (Cho, 2019). Ці домени відіграють ключову роль в регуляції внутрішньоклітинного метаболізму, що опосередковано змінює гліколітичний потік, який стабілізує бутанолдегідрогеназу та ініціює переключення ацидогенезу до накопичення розчинників (Li, 2018). Підвищення кінцевої концентрації бутанолу завдяки додавання солей цинку було показано в роботі (Mukherjee et al, 2019) за рахунок посилення його біосинтезу, пов'язаного з підвищеним використанням глюкози, зниженням продукції етанолу та ранньою індукцією розчинника. 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 розчинників; підвищенням активності бутирільальдегіддегідрогенази 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 композиції (Capilla, 2022). Гліцерол, як стресовий фактор і нетрадиційний субстрат, опосередковано впливає на спиртову та альдегіддегідрогеназну активності *Clostridium sp.* Вплив гліцеролу на швидкість росту

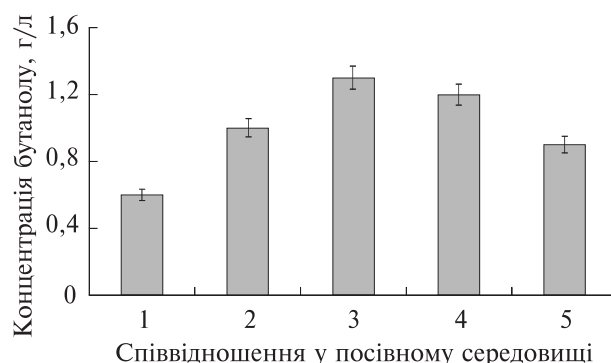


Рис. 3. Вплив співвідношення глюкози та гліцеролу на накопичення бутанолу культурою *Clostridium sp.* UCM В-7570 в ензиматичному середовищі. 1 – контроль, глюкоза 20 г/л; 2 – глюкоза : гліцерол 1 : 1; 3 – глюкоза : гліцерол 1 : 2; 4 – глюкоза : гліцерол 1 : 3; 5 – гліцерол 20 г/л

клітин і АБЕ процес можна простежити, в основному, в біохімії катаболізму гліцеролу (Agu, 2019). Присутність гліцеролу в інокуляційному середовищі підвищує внутрішньоклітинне надходження АТФ та зменшує еквіваленти НАДФН, які є критичними для росту та розвитку культури (Agyeman-Duah, 2022). Нами було досліджено вплив різного співвідношення гліцеролу та глюкози у інокуляційному середовищі на накопичення бутанолу в ензиматичному середовищі (рис. 3).

На рис. 3 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. В роботі (Jiang, 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

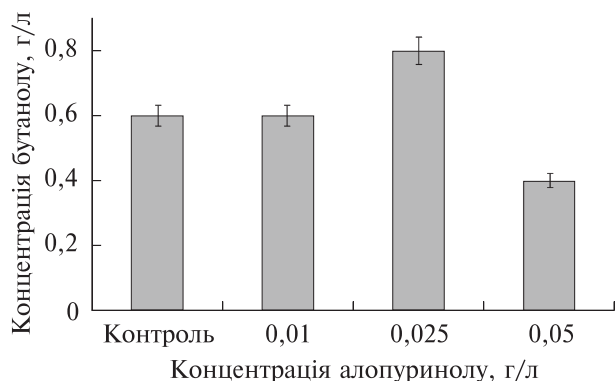


Рис. 4. Вплив концентрації алопуринолу на накопичення бутанолу культурою *Clostridium sp.* UCM B-7570

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, 2021).

Алопуринол (4-гідроксипіразоло-(3,4-D)-піримідин), аналог гіпоксантину та інгібітор НАДФН-генеруючої ксантиндегідрогенази, використовували як стресовий фактор в роботі (Saqr, 2021). *In vivo* алопуринол метаболізується до оксипуринолу (4,6-дигідроксипіразоло-(3,4-D)-піримідину), який конкурентно пригнічує ксантиндегідрогеназу (Agu, 2018).

Нами було проведено дослідження впливу різних концентрацій алопуринолу на накопичення бутанолу культурою *Clostridium sp.* UCM B-7570 (рис. 4). На рис. 4 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, 2016) в яких додавання алопуринолу до середовища під час АВЕ ферментації призводило до помітного збільшення продукування бутанолу з відповідним збільшенням швидкості росту клітин. Додавання алопуринолу в середовище росту пом'яшувало ток-

сичну 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, 2022), що обумовлено активністю НАДН-оксидази та НАДФН-оксидази. 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). З даних рис. 5 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. В роботі (Li, 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 розчинників. Це свідчить про те, що *in vivo* не відбувається окисного пошкодження, пов'язаного з відновленням кисню.

Нами було проведено цитологічні дослідження, як культури контролю, так і культури після впливу стресових факторів (рис. 6). Показано, що за порівняння характеристик культури контролю та після впливу будь-якого зі стресових факторів видно вкорочення довжини клітин, збільшення накопичення всередині гранулози (має темне забарвлення на рисунку) та зниження кількості паличок в полі зору (рис. 6).

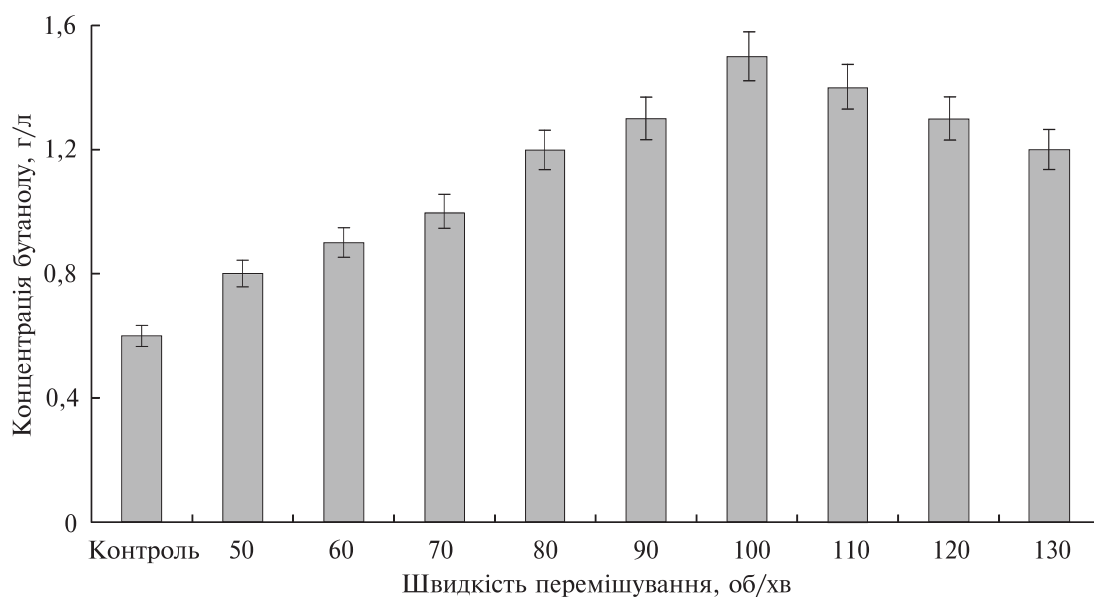
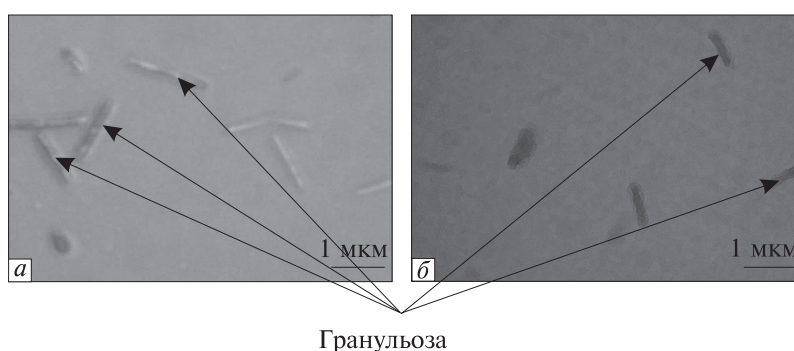


Рис. 5. Вплив швидкості перемішування на концентрацію бутанолу культурою *Clostridium sp.* UCM B-7570



Гранульоза

Рис. 6. Характеристики культури *Clostridium sp.* UCM B-7570 (а – контроль, б – за стресових факторів), збільшення 1800

Отримані результати можна пояснити цитоекологічними змінами, що опосередковано підтверджуються зміною концентрації бутанолу (як механізм відповіді) в культуральному середовищі.

Таким чином, в роботі досліджено вплив стресових факторів – алопуринолу, фурфуролу, цинку та кисню у низьких концентраціях та гліцеролу, як неспецифічного субстрату на накопичення бутанолу в процесі культивування. 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 як 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 мікроор-

ганізмів, 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 розчинників можливе за використання внутрішньої здатності мікроорганізмів адаптуватися до стресових умов.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить досліджень за участю людей або тварин у виконанні будь-якого з авторів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Дослідження було профінансовано за рахунок відомчої тематики «Створення штамів надпродуцентів вторинних метаболітів (амінокислот, спиртів, вітамінів)». Державний реєстраційний номер 0119U101489.

THE EFFECT OF ADAPTIVE STRESS FACTORS ON THE FUNCTIONING OF *CLOSTRIDIUM SP.* CELLS – PRODUCERS OF BIOBUTANOL

O.O. Tigunova, V.V. Bratishko, S.M. Shulga

SE «Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine», 2a, Baidy Vyshnevetskoho str., Kyiv, Ukraine, 04123 National University of Life and Environmental science of Ukraine, 15, Heroiv Oborony str., Kiev, Ukraine, 03041 E-mail: Shulga5@i.ua

Biobutanol is one of the types of biofuel obtained by microbial synthesis (acetone-butanol-ethanol fermentation). Using adaptive cell changes, it is possible to increase the level of accumulation of the target product due to the effect of stress factors. For this aim, the effect of the following stress factors: allopurinol, furfural, zinc, oxygen and glycerol as a non-specific substrate on the functioning of *Clostridium sp* cells was investigated. Stress factors were added to the medium in adapting doses. It was found that the concentration of butanol was the greatest (1.2 g/l) when 0.5 g/l of furfural was added to the medium compared to the control (0.6 g/l). It was shown that the use of adaptive dose (0.001 g/l) of ZnSO₄ resulted in the greatest concentration of butanol (1.0 g/l), and the highest concentration of butanol (1.3 g/l) was obtained when using glucose and glycerol in the ratio of 1 : 3 as a carbon source. It was demonstrated that the concentration of butanol in the culture medium increa-

sed (0.8 g/l) at a concentration of allopurinol in the medium of 0.025 g/l. 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 due to the action of stress factors, is substantiated.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Agu VCh, Ujor V, Ezeji TC (2018) Allopurinol supplementation of the growth medium enhances the fermentation of lignocellulose hydrolysates to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biocatal Agric Biotechnol* 14:151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.001>.
- Agu VCh, Ujor V, Ezeji TC (2019) Metabolic engineering of *Clostridium beijerinckii* to improve glycerol methabolism and furfural tolerance, *Biotechnol Biofuels* 12(50). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1388-9>.
- 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). <https://doi.org/10.3390/fermentation8070339>.
- Arbter Ph, Sabra W, Utesch T et al (2021) Metabolic and kinetic investigations on the electricity-aided production of butanol by *Clostridium pasteurianum* strains. *Eng Life Sci* 21:181–195. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000035>.
- Bao T, Jiang W, Ahmad Q-A, Yang S-T (2022) 13-Consolidated bioprocessing for ethanol and butanol production from lignocellulosic biomass: resent advances in strain and process engineering. *A-Z of Biorefinery* 473–506 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819248-1.00009-9>.
- Capilla M, Valles A, San-Valero P et al (2022) Solvent production from rice straw by a co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae*: effect of pH control. *Biomass Con Bioref*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02750-4>.
- Cho Ch, Hong S, Moon GH et al (2019) Engineering clostridial aldehyde/alcohol dehydrogenase for selective butanol productions. *mBio* 10(1):e02683-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02683-18>.
- Foulquier C, Riviere A, Heulot N et al (2022) Molecular characterization for butanol synthesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Nat Com* 13:4691. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32269-1>.
- Gong Ch, Meng X, Jin C et al (2023) Green synthesis of cellulose formate and its efficient conversion into 5-hydroxymethylfurfural. *Ind Crops Prod* 192:115985. <https://doi.org/10.1016/j.jindcrop.2022.115985>.
- Guo Y, Liu Y, Guan M et al (2022) Production of bu-

- tanol from lignocellulosic biomass: recent advances, challenges, and prospects. *RSC Adv* 12:18848–18863. <https://doi.org/10.1039/D1RA09396G>.
- Jiang Y, Wu R, Lu J et al (2021) Quantitative proteomic analysis to reveal expression difference for butanol production from glycerol and glucose by *Clostridium sp.* stain CT7. *Microb Cell Fact* 20(12). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01508-3>.
- Li D, Meng Ch, Wu G et al (2018) Effect of zinc on the production of alcohol by *Clostridium carboxidivorans* P7 using model syngas. *J Ind Microbiol Biotechnol* 45:61–69. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1992-2>.
- Li J, Shen H, Zhao Z et al (2020) Protective effect of *Clostridium butyricum* against oxidative stress induced by food processing and lipid-derived aldehydes in Caco-2 cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:9343–9361. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10896-2>.
- Luo H, Liu Z, Xie F et al (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 Prod* 170:113722. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113722>.
- Mahalingam L, Abdulla R, Sani AS et al (2022) Lignocellulosic biomass – a sustainable feedstock for acetone-butanol-ethanol fermentation. *Period Polytech Chem Eng* 66(2):279–296. <https://doi.org/10.3311/PPch.18574>.
- Molognoni D, Vega M, de Vrije T et al (2023) Enhancing butanol production by *Clostridium beijerinckii* through cathodic electrofermentation approach. *J Chem Technol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1002/jctb.7324>.
- Molnar-Nagy V, Tso K-H, Hall JW et al (2022) Effect of different nutritional zinc forms on the proliferation of beneficial commensal microorganisms. *Microbiol Res* 13:500–513. <https://doi.org/10.1016/>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.05.009>.
- Qureshi N, Bowmana MJ, Sahaa BC et al (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. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.09.002>.
- Riaz S, Mazhar S, Abidi SH et al (2022) Biobutanol production from sustainable biomass process of anaerobic ABE fermentation for industrial applications. *Arch Microbiol* 204(11). <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03284-z>.
- Saqr AA, Aldawsari FM, Khafagy E-S et al (2021) A novel use of allopurinol as a quorum-sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* 10(11):1385. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111385>.
- Tigunova O, Shulga S, Blume YB (2013) Biobutanol as an alternative type of fuel. *Cytol Genet* 47(6):366–382. <https://doi.org/10.3103/s0095452713060042>.
- Tigunova O, Andrijash G, Beyko N et al (2019) Rape biomass (*Brassica napus*) as raw materials for biobutanol production. *Biotechnol Acta* 12(1):75–80. <https://doi.org/10.15407/biotech12.01.075>.
- Tigunova OO, Kamenskyh DS, Tkachenko TV et al (2020) Biobutanol production from plant biomass. *Open Agric J* 14:187–197. <https://doi.org/10.2174/1874331502014010187>.
- Torres LGF, Nunes EV, Guerrero CEM (2022) Technoeconomic analysis of broccoli biofineries for polyphenol extraction and biobutanol production. *REB&S* 4(1):23–37. <https://doi.org/10.56845/rebs.v4i1.70>.
- Yao X, Zhang Q, Fan Y et al (2022) Butanol-isopropanol fermentation with oxygen-tolerant *Clostridium beijerinckii* XN 29. *AMB Express* 12(57). <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01399-6>.
- Ujor V, Okonkwo Ch, Ezeji ThCh (2016) Unorthodox methods for enhancing solvent production in solventogenic *Clostridium* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:1089–1099. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7166-0>.
- Wu Y, Bai Y, Zhang D et al (2019) Pleiotropic regulation of a glucose-specific PTS in *Clostridium acetobutylicum* for high-efficient butanol production from corn stover without detoxification. *Biotech For Biofuels* 12(264). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1604-7>.
- Zborowska H, Waliszewska B, Waliszewska S et al (2021) Conversion of carbohydrates in lignocellulosic biomass after chemical pretreatment. *Energies* 15(1):1–14. <https://doi.org/10.3390/en15010254>.
- Zhang Y, Han B, Ezeji TC (2012) Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. *New Biotechnol* 29:345–351 <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.09.001>.
- Zhou Z, Jing Y, Wei S et al (2023) Enhancement of butanol production in *Clostridium acetobutylicum* SE 25 through oxidation-reduction potential regulation and analysis of its metabolic mechanisms. *Fuel* 331(1):125708. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125708>.

Надійшла в редакцію 06.12.22
Після доопрацювання 12.01.23
Прийнята до друку 18.05.23