

О.О. Тігунова, С. М. Шульга

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України,  
Київ-123, вул. Осиповського. 2а, 04123, Україна, тел.:+38(044)434 45 77,  
e-mail: Shulga5@i.ua

## ВИКОРИСТАННЯ МУТАНТНИМ ШТАМОМ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОЇ СИРОВИНИ ЯК СУБСТРАТА

**Мета.** Отримати мутантний штам з підвищеним накопиченням бутанола за допомогою хімічного мутагенезу (мутаген – *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідин) для культивування на заторі біомаси дроговидного проса. **Методи.** Для отримання мутантного штаму використовували метод індукованого мутагенезу. Для визначення продукції спиртів застосовували газову хроматографію. **Результати.** Оброблення культури *C. acetobutylicum* IMB В-7407 (IFBG С6Н) за допомогою мутагену *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідину привело до загибелі 99 % клітин. Було отримано стійкий мутантний штам *C. acetobutylicum* IFBG С6Н 5М, який продукував на 45 % більше бутанола на лігноцелюлозній сировині (біомаса дроговидного проса *Panicum virgatum* L) в порівнянні з вихідним штамом. Показано, що штам не змінював властивості до підвищеного синтезу бутанола протягом 10 пересівів. Штам *C. acetobutylicum* IFBG С6Н 5М мав аналогічну до вихідного штаму морфологію, але набув здатності до використання трегалози та аскуліну як субстрату. Знайдено оптимальні параметри попередньої обробки сировини (ступінь подрібнення, концентрація у ензиматичному середовищі, температура та час розварювання) для культивування мутантного штаму. Показано, що оптимальна концентрація біомаси дроговидного проса у ензиматичному середовищі склала 60 г/л. Встановлено, що найбільша концентрація бутанола (2,6 г/л для мутантного, та 1,8 для вихідного штаму) накопичувалася у культуральній рідині за умови використання попередньо обробленої сировини (знаходження під тиском 2 атм. протягом 2 годин). **Висновки.** Використовуючи методи індукованого мутагенезу отримано перспективний штам, який в сукупності з оптимізацією параметрів культивування має підвищений вихід цільового продукту в порівнянні з вихідним штамом.

*Ключові слова:* лігноцелюлоза, бутанол, *C. acetobutylicum*, біосинтез.

У зв'язку з зменшенням запасів викопних ресурсів, з постійним коливанням їх вартості, екологічними проблемами і жорсткими нормами законодавства у сфері доквілля до виробництва хімічних речовин і палива з відновлювальної сировини зростає інтерес. Одним з прикладів такого виробництва є виробництво бутанола в процесі ацетон-бутанол-етанол (АБЕ) ферментації. Виробництво бутанола складається з декількох етапів. У біомасу для АБЕ бродіння, що складається або з крохмалю, або цукрів чи лігноцелюлозної сировини попередньо оброблюють і використовують як субстрат. Способи попередньої



обробки відрізняються залежно від типу біомаси. Після ферментації кінцевий продукт екстрагують і очищують. Економіка біотехнології значною мірою залежить від вартості процесу бродіння і вартості субстрату. Для бутанола, як альтернативного виду палива, суттєве значення має сировина біомаси, яка має бути широко доступною і низьковартісною.

Промислове виробництво бутанола шляхом АБЕ ферментації на даний час не економічне через низьку продукцію бутанола, низьку швидкість ферментації, складне виділення продукту і проблеми з виродженням штамів у процесі виробництва і фаговими інфекціями.

При АБЕ ферментації бактерії *C. acetobutylicum* на першому етапі виробляють масляну, пропіонову, оцтову та молочну кислоти (стадія утворення кислот), потім рН знижується та починається стадія синтезу розчинників – бутанола, ацетона, етанолу та ізопропанолу [8]. Ця стадія пов'язана з підвищенням концентрації масляної кислоти та зниженням величини рН менше за п'ять. Виробництво бутанола лімітується (блокується ріст мікроорганізмів) за концентрації бутанола 1–2 % [9, 3, 5]. Для оптимізації процесу отримання метаболітів необхідно провести первинну селекцію штамів-продуцентів; змінити відповідним чином генетичні структури штаму-продуцента для збільшення накопичення бутанола і визначити оптимальні технологічні параметри (рН, температуру, потреби у поживних речовинах) та режими живлення і накопичення біомаси; вибрати спосіб іммобілізації клітин-продуцентів [2, 6, 7]. Одним із методів отримання високопродуктивних штамів є використання мутагенезу [3, 4, 14]. Мутагенез клостридій досліджувався в роботах [12, 14], де показано неефективність ультрафіолетового та радіаційного опромінення. Показано, що мутантні штами, які мали високу амолітичну активність та підвищену толерантність до бутанола мали високий вихід цільового продукту [10].

Таким чином, виходячи із необхідності вдосконалення біотехнологій, що існують, та розробки нових біотехнологій отримання біобутанола, поставлена мета отримати мутантний штам з підвищеним накопиченням бутанола за допомогою хімічного мутагенезу для культивування на заторі біомаси дроговидного проса.

### Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були культура *C. acetobutylicum* ІМВ В-7407 (ІФВГ СБН) з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інституту харчової біотехнології та геноміки» НАН України, яка була виділена з ґрунтів і мулів озер міста Києва, та її мутанти; біомаса дроговидного проса *Panicum virgatum L.*, отримана з Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка.

Для активації культур використовували середовище Виноградського та скибки картоплі натерті крейдою [6]. Як ензиматичне середовище використовували затор із дроговидного проса з різною концентрацією сухої рослинної біомаси (від 20 до 100 г/л). Для визначення чистоти культур використовували



модифіковане середовище Виноградського (ВМА) [7]. Для забарвлення живих препаратів використовували розчин Люголю, а для вітального – метиленового синього. Мікроскопіювання проводили за допомогою мікроскопу «Laboval» (Німеччина). Знімки робили за допомогою фотоапарату «Canon PowerShot A640» (Японія).

Для отримання мутантів методом хімічного мутагенезу добову культуру *C. acetobutylicum* IFBG С6Н на збагаченому м'ясо-пептонному бульйоні (ЗМПБ) було відцентрифуговано (7000 г) протягом 20 хв при 2 °С. Осаджені клітини промивали за допомогою пептонного буферу (ПБ) (0,1 г пептону, 8,5 г хлориду натрію на літр). При досягненні оптичної густини суспензії рівної 1 при 600 нм, клітини переносили на свіже ЗМПБ, яке містило 50 мкг N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин (НТГ). Після інкубації протягом 15 хв клітини відмивали за допомогою ПБ для видалення залишків НТГ. Отримані клони були перенесені на свіже ЗМПБ для культивування протягом 7 год. Після культивування культуру ще раз промивали за допомогою ПБ для видалення залишків глюкози. Отримані клони переносили на агаризовані затори із дротовидного проса (60 г/л біомаси дротовидного проса, 30 г/л агару). Через три доби колонії, навколо яких була найбільша зона просвітлення (культури з найбільшою амілолітичною активністю), було перенесено на затори із дротовидного проса для культивування. Для аналізу культуральної рідини використовували газову хроматографію (ГХ) [7].

Культивування мікроорганізмів на щільних середовищах проводили у анаеростаті «АЭ-01» (Росія) в атмосфері азоту. Анаеростат поміщали у термостат за температури 35 °С. Для забарвлення джгутиків використовували метод Лефлера з модифікацією наведеною в роботі [3]. Середовища Гіса з індикатором Андреде використовували для встановлення зброджування цукрів. Для ідентифікації місця положення спор у клітинах було застосовано метод забарвлення спор [3].

Сушу біомасу (вологість 5–7 %) дротовидного проса подрібнювали за допомогою млина лабораторного «Циклон МШ 1» (Україна). Вологість визначали за допомогою аналізатора вологості RADWAG MA 50/C/1 (Польща).

Усі досліді проводили в 3-х повторях. Статистична обробка експериментальних даних була зроблена за допомогою програми Microsoft Excel. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Для отримання мутантного штаму з підвищеним синтезом бутанолу добову культуру *C. acetobutylicum* ІМВ В-7407 (IFBG С6Н) оброблювали мутагеном та висаджували на агаризоване середовище. Оброблення культури за допомогою НТГ спричинило загибель 99% клітин. Було відібрано вісім колоній з найбільшою зоною просвітлення та амілолітичною активністю. Накопичення бутанолу при культивуванні на лігноцелюлозній сировині було різним (рис. 1), деякі з штамів втратили властивість до утворення розчинників, у тому числі і бутанолу. Більшість штамів продукували бутанол у такій самій концентрації, що і вихідний штам і тільки один накопичував його у культуральній рідині на



45 % більше ніж вихідний штам. Цей штам було ідентифіковано як мутантний *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M за геном *bdh*. Отриманий штам не змінював властивості до підвищеного синтезу бутанолу протягом 10 пересівів. Штам *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M мав аналогічну до вихідного штаму морфологію та забарвлення за Грамом, але набув здатності до використання трегалози та аскуліну як субстрату.

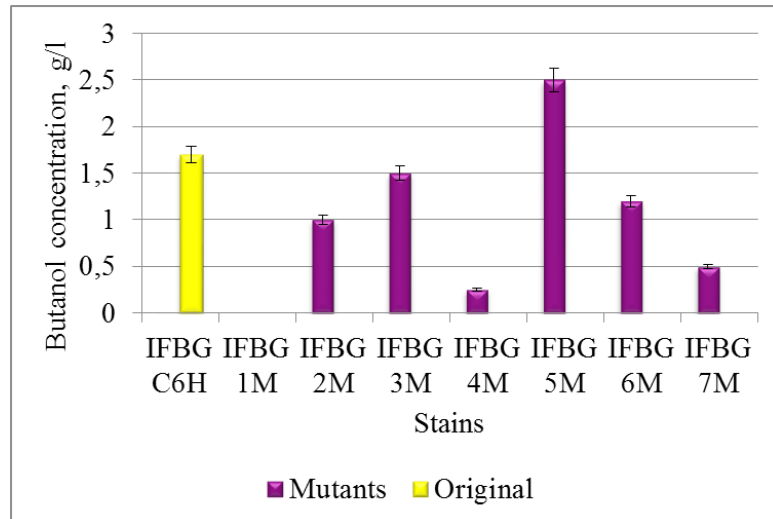


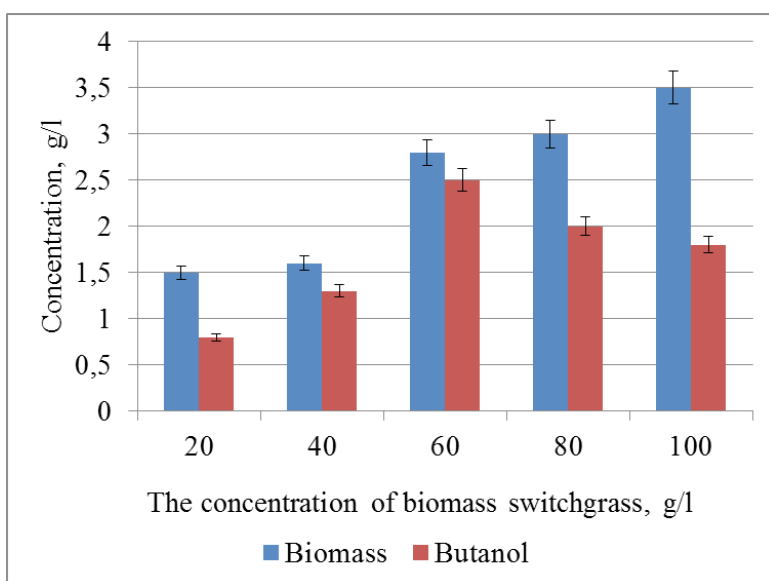
Рис. 1. Концентрація бутанолу вихідного та мутантних штамів при культивуванні на заторі із дроговидного проса

Fig. 1. Butanol concentration of original and mutant strains cultured on swithgrass

Одним із факторів, що ускладнюють виробництво бутанолу з лігноцелюлозної сировини є молекули целюлози та геміцелюлози, пронизані лігніновою оболонкою з великою кількістю перехресних зв'язків, мало доступних як для мікроорганізмів так і ферментів. У зв'язку з цим для *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M було проведено дослідження впливу концентрації біомаси дроговидного проса (субстрату) на накопичення бутанолу (рис. 2).

Показано, що оптимальна концентрація біомаси дроговидного проса у середовищі для ферментації склала 60 г/л. При збільшенні концентрації біомаси дроговидного проса концентрація бутанолу зменшувалася, а накопичення біомаси продовжувалося. Подальші дослідження проводили з використанням для ферментації концентрації 60 г/л дроговидного проса.

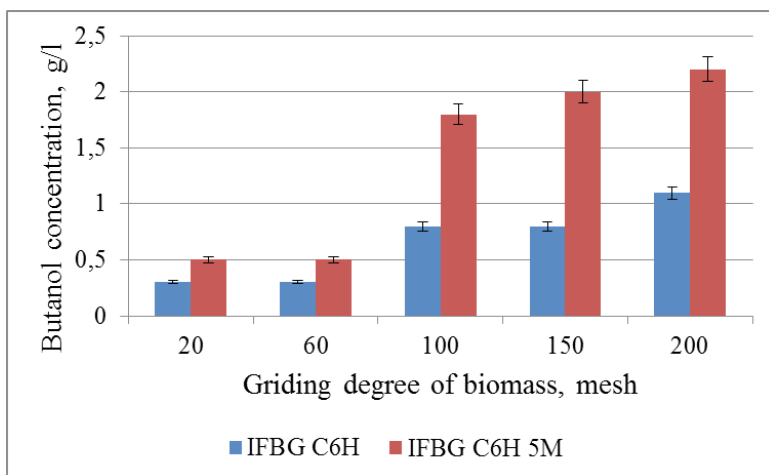
Важливим фактором, який впливає на процес культивування є попередня підготовка лігноцелюлозного субстрату і особливо ступінь його подрібнення. Клітинну структуру біомаси руйнують для розірвання зв'язків целюлози та геміцелюлози з лігніном. Було проведено дослідження впливу ступеня подрібнення сухої біомаси дроговидного проса на концентрацію бутанолу (рис. 3).



**Рис. 2.** Вплив концентрації дроговидного проса на накопичення біомаси і бутанолу мутантним штамом

**Fig. 2.** Effect of biomass concentration of switchgrass on biomass and butanol concentration of mutant strain

Показано, що із збільшенням ступеня подрібнення дроговидного проса до 200 меш. концентрація бутанолу у культуральній рідині зростала як для мутантного, так і для вихідного штамів – 2,5 г/л та 1,2 г/л, відповідно.



**Рис. 3.** Залежність концентрації бутанолу від ступеня подрібненості субстрату

**Fig. 3.** Dependence of butanol concentration on grinding degree of biomass

Ще одним етапом попередньої підготовки субстрату для збільшення кількості вільних моно- та поліцукрів є термічна обробка. Було досліджено вплив режимів попередньої термічної обробки дротовидного проса на концентрацію бутанола у культуральній рідині (рис. 4).

Показано, що найбільша концентрація бутанола (2,6 г/л для мутантного і 1,8 г/л для вихідного штамів) накопичувалася у культуральній рідині за використання попередньо обробленої сировини (за температури 133 °С, тиску 2 атм., протягом 2 годин). Подальше збільшення часу обробки або тиску суттєво не впливало на накопичення бутанола як мутантним, так і вихідним штамми.

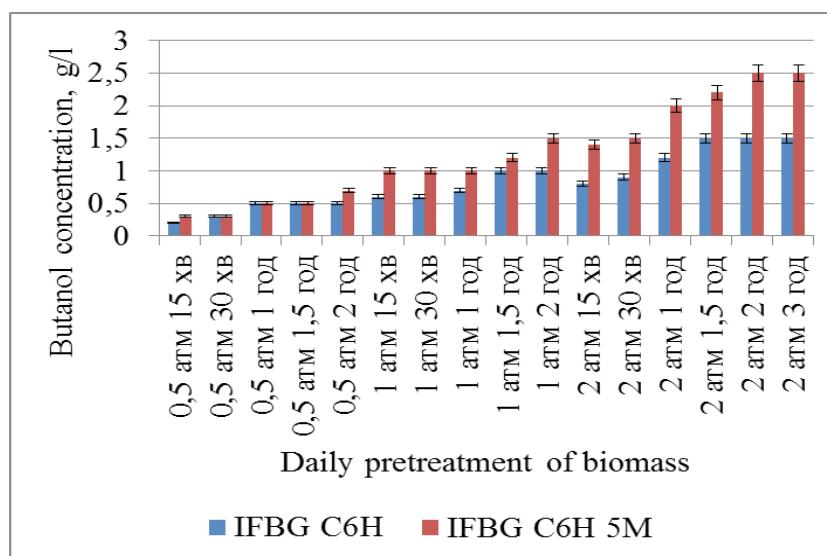


Рис. 4. Залежність концентрації бутанола від попередньої обробки сировини

Fig. 4. Dependence of butanol concentration on daily biomass pretreatment

Таким чином, за результатами досліджень отримано мутантний штам *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M, який продукував на 45% більше бутанола на лігноцелюлозній сировині (біомаса дротовидного проса *Panicum virgatum* L) порівняно з вихідним штамом. Знайдено оптимальні параметри попередньої обробки сировини (ступінь подрібнення 200 меш., концентрація дротовидного проса у ензиматичному середовищі 60 г/л, тиск 2 атм. та час розварювання протягом 2 год.) для культивування мутантного штаму.

Е.А. Тигунова, С.М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики» НАН Украины,  
ул. Осиповского, 2а, Киев-123, 04123, Украина, тел.: +38 (044) 434 45 77, e-mail: Shulga5@i.ua

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУТАНТНЫМ ШТАМОМ *C. ACETOBUTYLICUM* ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ КАК СУБСТРАТА

### Реферат

**Цель.** Создать мутантный штамм с повышенным накоплением бутанола с помощью химического мутагенеза (мутаген *N*-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанидин) при культивировании на заторе из биомассы стеблевидного проса. **Методы.** Для получения мутантного штамма использовали метод индуцированного мутагенеза. Для определения продукции спиртов использовали газовую хроматографию. **Результаты.** Обработка культуры *C. acetobutylicum* IMB B-7407 (IFBG С6Н) с помощью мутагена *N*-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанидина привела к гибели 99% клеток. Был получен стойкий мутантный штамм *C. acetobutylicum* IFBG С6Н 5М, который продуцировал на 45% больше бутанола на лигноцеллюлозном сырье (биомассе стеблевидного проса *Rapicium virgatum* L) по сравнению с исходным штаммом. Было показано, что штамм не изменял свою особенность к повышенному синтезу бутанола на протяжении 10 пассажей. Штамм *C. acetobutylicum* IFBG С6Н 5М имел аналогичную с исходным штаммом морфологию, но приобрёл способность к использованию трегалозы и аскулина, как субстрата. Найдены оптимальные параметры предварительной обработки сырья (степень измельчения, концентрация в ферментационной среде, температура и время разваривания) для культивирования мутантного штамма. Показано, что оптимальная концентрация биомассы стеблевидного проса в ферментационной среде составила 60 г/л. Установлено, что наибольшая концентрация бутанола (2,6 г/л для мутантного и 1,8 для исходного) накапливалась в культуральной жидкости с использованием сырья, предварительного обработанного при 2 атм. на протяжении 2 часов. **Выводы.** Используя методы индуцированного мутагенеза получены перспективные штаммы, которые в совокупности с оптимизацией параметров культивирования имеют повышенный выход целевого продукта по сравнению с исходным штаммом.

*Ключевые слова:* лигноцеллюлоза, бутанол, *C. acetobutylicum*, биосинтез.

О. Tigunova, S. Shulga

SI «Institute of Food Biotechnology and Genomics», NAS of Ukraine,  
2a, st. Osipovskii, Kyiv-123, 04123, Ukraine, tel.: +38 (044) 434 45 77, e-mail: Shulga5@i.ua

## USING BY MUTANT STRAINS *C. ACETOBUTYLICUM* LIGNO-CELLULOSIC MATERIAL AS A SUBSTRATE

### Summary

**Aim.** To create a mutant strain with increased accumulation of butanol by chemical mutagenesis (mutating agent *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) cultured on



switchgrass biomass mash. **Methods.** To obtain the mutant strain there were used the method of induced mutagenesis. To determine the production of alcohols there were used gas chromatography. **Results.** Processing *C. acetobutylicum* IMB culture B-7407 (IFBG C6H) via the mutagen *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, led to 99% cell death. There were obtained a mutant resistant strain *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M which produced 45% more butanol on lignocellulosic materials (switchgrass biomass *Panicum virgatum* L) compared with the parent strain. It has been shown that the strain does not change its feature to increased synthesis of butanol over 10 passages. The strain of *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M had a similar morphology to the original strain, but gained the ability to use askulin and trehalose as a substrate. The optimal parameters of the pretreatment of raw materials (crushing ratio, the concentration in the fermentation medium, the temperature and time of cooking) for the cultivation of a mutant strain have been found. It is shown that the optimal concentration of switchgrass biomass in fermentation medium was 60 g/l. It has been shown that the highest concentration of butanol (2.6 g/l and 1.8 g/l to mutant and original strain) accumulated in the culture liquid using raw material pretreated at 2 atm. for 2 hours. **Conclusions.** Using the methods of induced mutagenesis promising strains can be obtained, which together with optimizations cultivation parameters have an increased yield of the desired product as compared to the parent strain.

*Key words:* lignocellulose, butanol, *C. acetobutylicum*, biosynthesis.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пирог Т.П. Біологічні основи мікробіологічного синтезу. – В кн.: Основи біотехнології. – К.:2010. –127 с.
2. Слюсаренко П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. Издательство третье переработанное и дополненное. – М. «Легкая и пищевая промышленность» – 1984. – 208 с.
3. Тігунова Е.А., Шульга С.М. Синтез бутанола штамом *C. acetobutylicum* на альтернативних субстратах // Матеріали 7-го Міжнародного конгреса «Біотехнологія: состояние и перспективы развития», Москва, 19–22 марта 2013. – С. 272.
4. Федоренко В.О., Остап Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. – Львів, 2007. – С. 279.
5. Шульга С.М., Тігунова О.О, Блюм Я.Б. Лігноцелюлоза як альтернативна сировина для одержання біобутанола // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – V. 6, N 2. – С. 9–21.
6. Шульга С.М., Тігунова О.О. Нові штами-продуценти біобутанола. I. Виділення та ідентифікація // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – V. 6, N 1. – С. 97–104.
7. Шульга С.М., Тігунова О.О. Нові штами-продуценти біобутанола. II. Ферментація лігноцелюлозної сировини // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – V. 7, N 4. – С. 54–60.





8. *Tigunova O., Shulga S., and Blume Y.* Biobutanol as an Alternative Type of Fuel // *Cytology and Genetics*. – 2013. – V. 47, N 6. – P. 51–71.

9. *Tigunova O., Shulga S.* Obtaining of new butanol producers // *Abst. 15<sup>th</sup> Eur. Congr. Biotechnol., Istanbul, Turkey, 23-29 September 2012*. – V. 29, Issue S. – P. S 43.

10. *Annous B.A., Blaschek H.P.* Isolation and characterization of *Clostridium acetobutylicum* mutants with enhanced amyolytic activity // *Appl. and Env. Microb.* – 1991. – V. 57, N 9. – P. 2544–2548

11. *Blaschek H., Annous B., Formanek J., Chen C. K.* Method of producing butanol using a mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101. – 2002. – US patent 6,358,717.

12. *Liu X.B., Gu Q.Y., Yu X.B., Luo W.* Enhancement of butanol tolerance and butanol yield in *Clostridium acetobutylicum* mutant NT642 obtained by nitrogen ion beam implantation. // *J. Microbiol.* – 2013, V. 50, I 6. – P. 1024–1028

13. *Syed Q.-ul-A., Nadeem M., Nelofer R.* Enhanced Butanol Production by Mutant Strains of *Clostridium acetobutylicum* in Molasses Medium // *Turk J. Biochem.* – 2008. – 33(1). – P. 25–30.

14. *Yu X.B., Hu W. J., Wang Q., Gu Q. Y., Luo W., Li H. G.* Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined low-energy ion beam implantation and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine induction // *Bioresource Technol.* – 2013. – 137. – P. 254–260.

Стаття надійшла до редакції 12.05.2015 р.

