

## LIGNOCELLULOSIC WASTES AS THE FEEDSTOCK FOR BUTANOL PRODUCTION BY CLOSTRIDIA

O. Skrotska, T. Pirog

National University of Food Technologies

S. Skrotzkyi

Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU

---

**Key words:**

*Biofuel*  
*Butanol*  
*Clostridia*  
*Fermentation*  
*Lignocellulosic wastes*

---

**Article history:**

Received 10.01.2019  
Received in revised form  
25.01.2019  
Accepted 11.02.2019

---

**Corresponding author:**

O. Skrotska  
**E-mail:**  
npnuht@ukr.net

---

**ABSTRACT**

In recent yeasts microbiologically derived butanol is considered as a promising biofuel. Butanol obtained from renewable and economically efficient substrates could provide an alternative to the traditional fossil fuels. Lignocellulosic materials as the main components of organic wastes of agriculture, wood, paper and food industries and also domestic wastes could become such substrates for butanol production.

As bacteria of the genus *Clostridium* are the best-known butanol producers this review is aimed to summarize recent scientific data on butanol production from lignocellulosic wastes by clostridia. This review provides the summarized information on sources of carbon and energy for microbiological synthesis of butanol. Different methods of hydrolysis and fermentation of lignocellulosic wastes are described. Scientific data on the various methods of feedstock pre-treatment, enzymatic hydrolysis and butanol yields as the result of clostridia cultivation on lignocellulosic wastes are provided. The perspectives of genetically-modified strains of clostridia as butanol producers are discussed, such strains are capable of the simultaneous assimilation of glucose and xylose and produce high levels of butanol from the substrate. The review contains the information on the non-modified strains isolated from nature that possess similar characteristics and can hydrolyze lignocellulosic wastes without preliminary treatment or enzymatic hydrolysis.

Several problems should be solved for the industrial-scale butanol production by clostridia from lignocellulosic wastes. The efficient methods for feedstock pre-treatment should be developed. The butanol yield by known butanol producers could be increased using metabolic and genetic engineering to enable bacterial strains to synthesize cellulytic enzymes, assimilate simultaneously a mixture of carbohydrates, increase the concentration of produced butanol and remove acetone as a by-product. Also the existing technologies could be improved to obtain high butanol yields and develop alternative methods of its separation from fermentation mixture.

---

**DOI:** 10.24263/2225-2924-2019-25-1-4

---

## ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНІ ВІДХОДИ ЯК СИРОВИНА ДЛЯ СИНТЕЗУ БУТАНОЛУ КЛОСТРИДІЯМИ

О.І. Скроцька, Т.П. Пирог

Національний університет харчових технологій

С.О. Скроцький

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

*В останні роки бутанол, отриманий мікробіологічним способом, розглядають як перспективне біопаливо. Бутанол може стати альтернативою викопному паливу у разі його отримання з використанням поновлювальних та економічно вигідних джерел. З цього погляду таким джерелом є лігноцелюлозні матеріали як основні компоненти органічних відходів сільського та лісового господарств, целюлозно-паперової, деревообробної та харчової промисловості, а також побутових відходів.*

*Оскільки для отримання біобутанолу в основному використовують представників роду Clostridium, метою цього огляду є аналіз сучасної наукової літератури щодо отримання бутанолу на лігноцелюлозних відходах з використанням клостридій. У статті узагальнено матеріали про джерела вуглецю та енергії для виробництва бутанолу мікробіологічним способом. Розглянуто різні способи гідролізу та зброджування лігноцелюлозних відходів. Наведено дані наукових досліджень останніх восьми років щодо різних способів попередньої обробки вказаної сировини, ферментативного гідролізу та концентрації бутанолу за культивування клостридій на целюлозовмісних субстратах. Показано можливість використання у біотехнології бутанолу генетично модифікованих клостридій, що здатні до одночасного споживання глюкози і ксилози та зброджування субстрату з високим виходом бутанолу. Наведено дані щодо природних немодифікованих продуцентів, які мають такі ж властивості, а також можуть споживати лігноцелюлозні відходи без попередньої обробки та ферментативного гідролізу.*

*Для широкомасштабного виробництва біобутанолу за допомогою клостридій з використанням лігноцелюлозних відходів потрібно вирішити ряд проблем. Зокрема, розробити ефективні методи попередньої обробки вихідного субстрату. Застосувавши методи метаболічної і генної інженерії, вдосконалити існуючі продуценти з метою синтезу ними целюлолітичних ферментів, міксотрофного споживання суміші вуглеводів, синтезу великої кількості бутанолу та відсутності ацетону в процесі бродіння як побічного продукту. Також необхідно оптимізувати існуючі технології з метою отримання високого виходу бутанолу та розробити альтернативні способи його виділення.*

**Ключові слова:** біопаливо, бутанол, клостридії, бродіння, лігноцелюлозні відходи.

**Постановка проблеми.** На сьогодні нафта є одним із найбільш важливих джерел енергії. Проте її запаси не є невичерпними [1], а вартість постійно

коливається. Тому розробка технологій поновлюваного та економічно вигідного біопалива є актуальним завданням сьогодення.

Нині велику увагу дослідників привертає бутанол як носій відновлюваної енергії. Його мікробіологічне виробництво було одним з перших широко-масштабних промислових процесів глобального значення і, незважаючи на 100-літню історію розвитку, інтерес до цього процесу не зменшується як з комерційного, так і з наукового погляду [2]. Порівняно з традиційним етанолом бутанол як біопаливо має ряд переваг — більш високий вміст енергії, низька летючість, негігроскопічність, краща здатність змішуватися з бензином або дизельним паливом, можливість використання у двигунах внутрішнього згоряння без модифікації [3].

Для того, щоб бутанол міг стати альтернативним заміником викопному паливу, необхідно розробити способи його отримання з використанням поновлювальних та економічно вигідних джерел. Найбільш перспективним джерелом є лігноцелюлозні матеріали як основні компоненти органічних відходів сільського та лісового господарств, целюлозно-паперової, дерево-обробної та харчової промисловості, а також побутових відходів. За допомогою процесів біохімічного перетворення лігноцелюлозна сировина може бути розкладена на її складові компоненти, що можуть засвоюватись мікроорганізмами для виробництва біопалива.

Оскільки для отримання біобутанолу в основному використовують представників роду *Clostridium* [4—6], метою цього огляду є аналіз сучасної наукової літератури щодо отримання бутанолу на лігноцелюлозних відходах з використанням клостридій.

**Викладення основних результатів дослідження.** *Загальна характеристика біобутанолу.* В останні роки бутанол, отриманий мікробіологічним способом, розглядають як альтернативне біоетанолу паливо. Він має вищу температуру кипіння, ніж етанол (табл. 1), тому набагато довше згорає у двигуні. Бутанол майже не викликає корозії металів, тому, на відміну від етанолу, більш придатний до транспортування наявними трубомагістралями. Бутанол можна змішувати з бензином у більшому співвідношенні, ніж з етанолом, оскільки його основні характеристики подібні з бензином. Слід відзначити, що використання бензину, змішаного з бутанолом, призводить до зменшення викидів вихлопних газів [7].

*Таблиця 1. Порівняння основних характеристик бензину, бутанолу і етанолу [8]*

Показник	Бензин	Бутанол	Етанол
Точка кипіння	27—221	117—118	78
Густина при 20°C, г/мл	0,7-0,8	0,81	0,79
Розчинність у 100 г води	—	—	+
Густина енергії, МДж/л	32	27—29,2	19,6
Вміст енергії/значення, БТО*/галон	115000	110000	84000
Теплота пароутворення, МДж/кг	0,36	0,43	0,92
Теоретичне октанове число	91-99	96	129
Моторне октанове число	81-89	78	102

**Примітка:** \*БТО — британська термічна одиниця.

Незважаючи на переваги використання бутанолу як палива, його мікробіологічне виробництво має деякі недоліки — відносно низький вихід продукту та висока вартість субстрату. Саме тому сучасні дослідження з отримання біобутанолу спрямовані на пошук дешевих субстратів (відходи виробництв, лігноцелюлоза, водорості) та модифікацію продуцентів з метою отримання високого виходу даного продукту.

*Джерела вуглецю та енергії для виробництва біобутанолу.* Єдиним джерелом вуглецю та енергії для біологічних агентів при виробництві бутанолу є цукри (вуглеводи), зокрема С-5 та С-6 вуглеводи. Джерелами вуглеводів у технології виробництва бутанолу можуть слугувати зернові культури (пшениця, ячмінь, жито), картопля, кукурудза, цукрові буряк та тростина, відходи їхньої переробки (меляса, патока), відходи сільського господарського виробництва, залишки деревини, побутове сміття та водорості [9].

Залежно від цінності джерела вуглецю та часових проміжків використання, субстрати для отримання біобутанолу можна поділити на кілька поколінь.

*Джерела вуглецю першого покоління.* До них відносять цінні харчові вуглеводи: зернові, крохмалі (пшеничний, рисовий, картопляний тощо), очищені цукри та деякі відходи (меляса, патока тощо). Біобутанол, отриманий з використанням джерел вуглецю першого покоління, синтезується мікроорганізмами при споживанні в основному гексозних цукрів. Їх отримують у результаті гідролізу багатих крохмалем сільськогосподарських культур, таких як кукурудза, пшениця, рис, маніока тощо [10].

Тобто джерела вуглецю першого покоління є ціннішими в господарстві і житті людини, ніж інші. Їх використання при виробництві бутанолу не є економічно вигідним, оскільки існує конфлікт галузей використання: це продукти харчування чи сировина для виробництва?

*Джерела вуглецю другого покоління.* Сільськогосподарські відходи, залишки деревини, побутове сміття зазвичай називають субстратами для отримання бутанолу другого покоління, оскільки паливо отримують із сировини, яка є неістивним залишком виробництва харчових продуктів або неістивною частиною рослин (качани кукурудзи, солома, тверді та м'які породи деревини). Основним компонентом джерел вуглецю другого покоління є лігноцелюлоза. Вона складається з трьох основних полімерів: целюлози, геміцелюлози і лігніну, які формують фібрилярну структуру. Залежно від типу, виду і походження джерела лігноцелюлози ці полімери містяться в різній кількості (табл. 2).

*Таблиця 2. Джерела вуглецю другого покоління [11]*

Відходи	Вміст компонентів, %		
	Целюлоза	Геміцелюлоза	Лігнін
1	2	3	4
Трава	25—40	35—50	10—30
Листя	15—20	80—85	0
Качани кукурудзи	45	35	15
Пшенична солома	30	50	15
Гній великої рогатої худоби	1,6—4,7	1,4—3,3	2,7—5,7
Свинячий гній	6	28	—

1	2	3	4
Деревина листяних порід	40—55	24—40	18—25
Деревина хвойних порід	45—50	25—35	25—35
Горіхова шкарлупа	25—30	25—30	30—40
Паперова пульпа	60—70	10—20	5—10
Газети	40—55	25—30	18—30
Папір	85—99	0	0—15

Основною перевагою виробництва бутанолу з використанням джерел вуглецю другого покоління є те, що відсутня конкуренція з харчовим ланцюгом, а також їх доступність і низька вартість. Слід також наголосити, що в Україні активно розвивається сектор тваринництва і птахівництва, утилізація відходів якого є проблемою. При цьому хімічний склад гною тварин і посліду птахів дає змогу провести процес ацето-бутилового бродіння. Зокрема, у [12] показано можливість використання курячого посліду як основного або допоміжного компонента субстрату при вказаному процесі.

*Джерела вуглецю третього покоління.* У цю групу входять водорості, які нині є одним з перспективних видів сировини для отримання бутанолу. У більшості видів водоростей вміст жирів складає близько 50% [13], що робить їх придатними для виробництва біодизелю. Слід відзначити таку особливість їх хімічного складу — у макроводоростей вміст білків і ліпідів є значно меншим, ніж вуглеводів порівняно з мікроводоростями [14]. Відходи, які залишаються після екстракції олій з водоростей, в подальшому можуть використовуватися для виробництва біобутанолу.

Загальну характеристику джерел вуглецю та енергії для виробництва бутанолу наведено в табл. 3, з даних якої видно, що доцільним субстратом для вказаного процесу на території України є використання саме лігноцелюлозної сировини.

*Таблиця 3. Порівняльна характеристика субстратів для виробництва біобутанолу*

Покоління	Джерело вуглецю	Переваги	Недоліки
I	Пшениця, ячмінь, жито, кукурудза, картопля	Високий вихід бутанолу, простота технології	Харчова сировина
II	Листя, солома, качани кукурудзи, тирса, макулатура	Наявність відходів у великій кількості	Необхідність попередньої обробки
III	Водорості	Висока швидкість росту, незалежність від пори року	Необхідність наявності акваторій

*Особливості використання лігноцелюлози.* При використанні джерел вуглецю II покоління для виробництва бутанолу виникає необхідність попередньої обробки сировини для руйнування щільної структури лігноцелюлози та її оцукрювання. Для цього використовують фізичні (подрібнення та перемелювання, дія мікрохвиль та електричного поля), хімічні (кислотний або лужний гідроліз) та біологічні (целюлазні комплекси мікроорганізмів) методи.

Слід зазначити, що у процесі попередньої обробки лігноцелюлозної сировини фізичними чи хімічними методами утворюється велика кількість токсичних сполук, які є інгібіторами мікробної ферментації. Серед них фурфурол, пірогалол, фуранові і фенілові альдегіди, метилбензойні кислоти, гідрохінон, катехін, бензиловий спирт, корична кислота, цинамальдегід, пара- і орто-бензохінони, а також кислоти: бензойна, мурашина, левулінова, оцтова, молочна, глюконова, галактарова, глюкуронова, ксилонова та ін. [15]. Тому після попередньої обробки обов'язковим є процес детоксикації для видалення інгібіторів. Вказані процеси підвищують вартість отриманого біобутанолу. Саме тому біологічні методи обробки з використанням целюлазних комплексів бактерій мають беззаперечні переваги при отриманні бутанолу із лігноцелюлозної сировини.

Оскільки для виробництва біобутанолу в основному використовують бактерії роду *Clostridium*, розглянемо особливості функціонування їх целюлолітичних ферментів. Клострідії продукують різні целюлолітичні ферменти, які на поверхні клітини формують складні мультибілкові структури, що отримали назву целюлозосоми. Їх вперше виявили у *Clostridium thermocellum*, досліджуючи фактори адгезії бактерій з целюлозою. Залежно від штаму й умов росту целюлозосоми *C. thermocellum* мають молекулярну масу від 2,0 до  $6,5 \cdot 10^6$  і складаються з 14—26 поліпептидних субодиниць. За допомогою целюлозосоми *C. thermocellum* прикріплюється до целюлози. Ферментний комплекс целюлозосоми, що включає понад 20 ферментів (ендоглюканазі, целлобіогідролази, ксиланазі та ін.), розкладає целюлозу до глюкози і целюлодекстринів з подальшим транспортуванням всередину клітини. Ефективність целюлозосом залежить від їх структурної цілісності, оскільки навіть частково дисоційовані комплекси призводять до значної втрати активності, особливо щодо кристалічних форм целюлози [16].

Гідроліз та зброджування целюлозовмісної сировини може здійснюватися різними шляхами, які відрізняються між собою організаційно, а також у просторі й часі. Головні процеси переробки обробленої лігноцелюлози в бутанол мають декілька конфігурацій реалізації: 1 — окреме оцукрювання і зброджування вуглеводів; 2 — одночасне оцукрювання і зброджування вуглеводів; 3 — об'єднаний метод [17]. Узагальнена схема даних процесів наведена на рис. 1.

При окремому оцукрюванні та зброджуванні вуглеводів виділяють такі етапи: попередня обробка сировини для руйнування щільної структури лігноцелюлози, внесення целюлолітичних ферментів, гідроліз полісахаридів, зброджування вуглеводів, виділення бутанолу [18]. Перевагою цього методу є можливість керування вказаними етапами. Серед недоліків виділяють такі: всі процеси відбуваються в окремих апаратах, що збільшує технологічні витрати на виробництво; можливе ретроінгібування ферментативної активності целюлаз утвореними олігомерами, що призводить до меншого виходу цукрів з лігноцелюлозного субстрату.

Одночасне оцукрювання і зброджування вуглеводів включає наведені вище етапи, але гідроліз полісахаридів із додаванням ферментів та бродіння здійснюють в одній ємкості, не розділяючи ці процеси на окремі стадії [19]. Цей спосіб має такі переваги: нижчі витрати на процес, менша кількість фер-

ментів, ніж при окремому оцукрюванні та зброджуванні вуглеводів, менша тривалість процесу. Недоліком методу є висока вартість целюлаз, які використовують для ферментативного гідролізу.

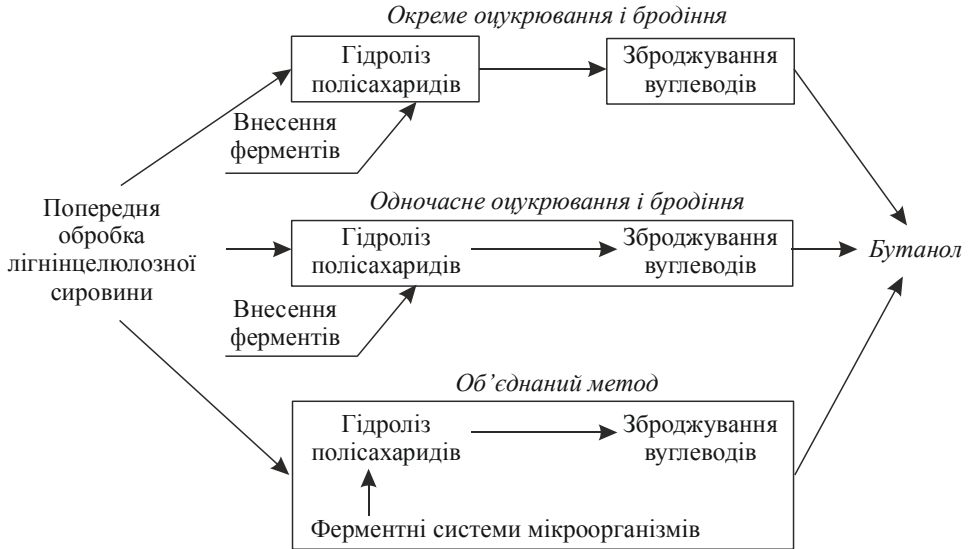


Рис. 1. Способи біопереробки лігноцелюлозної сировини

При об'єднаному (консолідованому) методі виробництва біобутанолу виділяють ті ж самі етапи, що вказані вище, але споживання целюлози відбувається за участі ферментних систем мікроорганізмів-продуцентів. Такий підхід знаходиться на ранній стадії розробки, але характеризується значними перевагами, порівняно з попередніми. Цей метод об'єднує всі процеси, які обмежують швидкість, попередню обробку, оцукрювання і бродіння в одному ферментері, що призводить до зменшення експлуатаційних витрат, підвищення ефективності конверсії і зниження інгібування побічних продуктів. Зазвичай, при застосуванні цього методу виробництва бутанолу використовують модифіковані продуценти [20].

*Біотехнологія бутанолу із лігноцелюлозних відходів.* Нині для отримання біобутанолу, зазвичай, використовують представників роду *Clostridium* (*C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* та ін.). Цим мікроорганізмам притаманні такі загальні особливості: здатність до споживання широкого спектра С-5- та С-6-вуглеводів, бродильний тип метаболізму, більшість із них є природними целюлозолітиками.

Також слід відзначити той факт, що не всі клостридії експресують целюлозосоми, однак у всіх видів цих мікроорганізмів наявні гени, що їх кодують. Зокрема в *C. acetobutylicum* виявлено 11 генів, що кодують целюлази. Відсутність експресії целюлозосом обумовлена еволюційним нокаутом відповідних генів [21].

*Окреме оцукрювання і зброджування вуглеводів.* У праці Qureshi із співавт. розглянуто можливість використання *C. beijerinckii* P260 як продуцента бутанолу на відходах сільськогосподарського виробництва. Як джерело вуглецю

використовували залишки після збирання та обробки кукурудзи: стебла, листя і качани. Попередню обробку лігноцелюлозного субстрату здійснювали сірчаною кислотою, а ферментативний гідроліз — з використанням целюлази (Celluclast 1.5 L),  $\beta$ -глюкозидази (Novozyme 188) і ксиланази (Viscostar 150L). Для видалення інгібіторів ацетоно-бутилового бродіння гідролізат обробляли гідрокарбонатом кальцію. При використанні необробленого гідролізату не спостерігали росту культури і бродіння, а при використанні обробленого — вдалось отримати бутанол у концентрації 14,5 г/л [22].

Природні джерела лігноцелюлози, серед яких — деревина сосни (*Pinus banksiana*), трава (*Phleum pratense*) та солома пшениці були використані у дослідженні Nanda із співавт. Для попередньої обробки субстратів використовували сірчану кислоту, а для ферментативного гідролізу — целюлазу (Celluclast 1.5 L),  $\beta$ -глюкозидазу (Novozyme 188) та ксиланазу (Xylanase 1). За результатами культивування *C. beijerinckii* В-592 найкращий результат був одержаний на середовищі із гідролізатом сосни — 11,6 г/л бутанолу [23].

Yu із співавт. здійснили генетичну модифікацію *C. tyrobutyricum*. Із *C. acetobutylicum* АТСС 824 були виділені гени, які відповідають за транспорт та утилізацію ксилози (*xylT*, *xylA*, *xylB*). Їх конститутивно коекспресували з геном *adhE2* (кодує NADH-залежну альдегід/алкогольдегідрогеназу), який відповідає за синтез бутанолу у *C. tyrobutyricum*. Авторами досліджено можливість використання лушпиння сої як лігноцелюлозного субстрату. Сировину обробляли соляною кислотою. Ферментативний гідроліз здійснювали целюлазами (Cellic® CTec2), а детоксикацію — активованим вугіллям. Модифіковані клітини *C. tyrobutyricum* ( $\Delta$ ack)-рТВА набули здатності до одночасного споживання глюкози і ксилози, що наявна у гідролізаті лушпиння сої і, як результат, отримано бутанол у досить високій концентрації — 15,7 г/л [24].

Китайські вчені досліджували можливість використання стебел топінамбура для виробництва бутанолу. Розроблена технологія передбачала їх обробку сумішшю 2% NaOH — 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, після чого здійснювали гідроліз целюлазами. Використовуючи *C. beijerinckii* СС101, в процесі бродіння отримано бутанол у концентрації 11,8 г/л за 60 год культивування. Слід зазначити, що при розробленій біотехнології значно зменшуються викиди стічних вод у процесі попередньої обробки сировини [25].

У наступному дослідженні Qureshi із співавт. як субстрат використали макуху з насіння *Physaria fendleri*. Рослина належить до родини гірчичних, з насіння якої отримують нехарчову олію. Її використовують як інгібітор корозії, а також при виробництві смоли, воску, нейлону, пластмаси і косметичних засобів. Макуху обробляли сірчаною кислотою. Для ферментативного гідролізу використовували гідролітичні ферменти: целюлазу,  $\beta$ -глюкозидазу і ксиланазу. За культивування *C. beijerinckii* Р260 із 100 г макухи отримали 11 г бутанолу. Загальна концентрація розчинників (АБЕ) у культуральній рідині становила 19,2 г/л. Слід зазначити, що в контрольному експерименті при використанні глюкози як основного джерела вуглецю концентрація АБЕ була на 3% нижчою, а тривалість процесу на 5 год більшою [26].



Органічну фракцію твердих побутових відходів з вмістом лігноцелюлозних компонентів 20% використали як джерело для отримання біобутанолу Farmanbordar з колегами. Вказана сировина містить фенольні сполуки, особливо таніни, які інгібують процес АБЕ бродіння клостридіями. Автори запропонували здійснювати їх екстракцію етанолом, після попередньої обробки сировини сірчаною кислотою. Для ферментативного гідролізу обрали целюлази (Cellic® CTec2) та геміцелюлази (Cellic® HTec2). За 96 год культивування *C. acetobutylicum* NRRL В-591 концентрація бутанолу становила 10 г/л. Таким чином з кілограма відходів вдалось отримати 84 г бутанолу [27].

Як субстрат для АБЕ бродіння Khedkar із співавт. використали ананасові шкірки. Розроблений ними спосіб попередньої обробки сировини передбачав кислотний гідроліз з використанням суміші фенолу і сірчаної кислоти. Отриманий після цього твердий залишок піддавали ферментативному гідролізу з використанням ферментів Cellic® CTec2. Далі об'єднували вказані гідролізати і здійснювали культивування. Використовуючи *C. acetobutylicum* NRRL В 527, отримали бутанол у досить малій кількості — 5 г/л [28].

У праці Borah із співавт. як субстрат взято суміш восьми різних бур'янів (*Arundo donax*, *Chromolaena odorata*, *Eichhornia crassipes*, *Ipomea carnea*, *Lantana camara*, *Mikania micrantha*, *Parthenium hysterophorus*, *Saccharum spontaneum*). Сировину піддавали кислотному гідролізу з використанням сірчаної кислоти з подальшим ферментативним гідролізом за допомогою целюлази та  $\beta$ -глюкозидази. Запропонована авторами технологія передбачала застосування ультразвуку упродовж усього часу культивування з такими параметрами 10-хвилинного циклу: 1хв ультразвук, 9 хв перемішування. За культивування *C. acetobutylicum* 11274 отримали бутанол у концентрації 9,1 г/л. Зазначимо, що з 1 кг сирової маси бур'янів було отримано 288 г розчинників АБЕ [29].

*Одночасне оцукрювання і зброджування вуглеводів.* Ibrahim із колегами використали пресовані пусті залишки пальмових фруктів як джерело вуглецю для культивування *C. acetobutylicum* ATCC 824. Попередню обробку сировини здійснювали гідроксидом натрію. Ферментацію та гідроліз з використанням целюлази (Celluclast 1.5 L) проводили одночасно в одній ємкості. Наприкінці бродіння концентрація бутанолу була досить низькою і становила близько 3 г/л [30].

Кукурудзяна солома як субстрат для отримання бутанолу була використана Li із співавт. Як метод попередньої обробки був використаний паровий вибух, після чого солому промивали дистильованою водою для видалення інгібіторів бродіння. Ферментативний гідроліз здійснювали з використанням целюлази (Cellic® CTec2). Авторами запропоновано методику періодичної системи перистальтики, яка була розроблена відповідно до принципу травлення в рубці жуйних тварин. За допомогою вертикальних розтягувальних рухів металевий зонд створював перистальтичний тиск 0,15 МПа з частотою 6 год упродовж перших 48 годин. Далі відбувалась статична ферментація. За культивування *C. acetobutylicum* ATCC 824 отримано бутанол у концентрації 10,4 г/л [31].

Науковий і практичний інтерес має дослідження, де автори для отримання бутанолу використали тверді відходи целюлозно-паперової промисловості —

шлам крафт-паперу. Попередню обробку субстрату не здійснювали, а ферментативний гідроліз проводили з використанням Cellic® CTec2 упродовж 12 год з подальшим внесенням *C. acetobutylicum* ATCC 824. При додаванні у поживне середовище 7,4% зневодненого паперового шламу отримали 10,2 г/л бутанолу. Паперовий шлам містить карбонат кальцію ( $\text{CaCO}_3$ ), який активує NAD(P)H-залежні бутиральдегіди і бутанолдегідрогенази, що значно збільшує вихід бутанолу в процесі одночасного оцукрювання та ферментації. Контроль рН є критичною проблемою при виробництві бутанолу *C. Acetobutylicum*, тому, враховуючи також і буферні властивості  $\text{CaCO}_3$ , автори висувають припущення, що глюкан і ксилан паперового шламу можуть бути перероблені у бутанол без контролю рН [32].

Тайванськими вченими досліджено можливість використання слонової трави (*Pennisetum purpureum*, Napier grass) як джерела вуглецю при виробництві біобутанолу. У цій траві загальний вміст вуглеводів близько 54%, що робить її потенційним вуглецевим субстратом. Для розчинення лігніну сухий порошок слонової трави попередньо обробляли гідроксидом натрію. Ферментативний гідроліз здійснювали з використанням целюлазного комплексу (Cellic® CTec2) упродовж 24 год з подальшим внесенням інокуляту *C. acetobutylicum* ATCC 824. У процесі бродіння отримали бутанол у кількості 9,5 г/л [33].

Як субстрат для отримання бутанолу Farmanbordar із співавт. використали органічну фракцію твердих побутових відходів іранського міста Ісфахан. Фракція містила 20% лігноцелюлози. Попередню обробку вказаної фракції здійснювали етанолом та сірчаною кислотою. Ферментативний гідроліз проводили з використанням целюлази (Cellic® CTec2) і геміцелюлази (Cellic® HTec2). Використовуючи *C. acetobutylicum* NRRL B-591, за 96 год культивування було отримано 8,6 г/л бутанолу. Розроблена авторами технологія передбачала отримання 102,4 г бутанолу з кожного кілограма органічної фракції твердих побутових відходів [34].

*Об'єднаний метод.* Технологію виділення бутанолу з використанням вакууму в процесі культивування запропонував Qureshi із співавт. Як субстрат використовували стебла, листя та качани кукурудзи — залишки після її збору та обробки. Їх подрібнювали і здійснювали попередню обробку сірчаною кислотою. Концентрація обробленого й освітленого гідроксидом кальцію субстрату становила 86 г/л. У процесі бродіння з використанням *C. beijerinckii* P260 отримали 11,6 г/л бутанолу, який почали виділяти, не зупиняючи процес, через 35 год культивування [35].

Можливість використання лігноцелюлозної сировини без попередньої обробки досліджували Rajagopalan із співавт. На середовищі з подрібненими рисовими висівками (94,5 г/л) та кунжутною макухою (36,7 г/л) отримали 13,5 г/л бутанолу за культивування *Clostridium* sp. ВОНЗ. Сольвентогенні клостридії через недостатню експресію гідролізуючих ферментів не можуть споживати лігноцелюлозну біомасу без попередньої обробки. Автори вперше показали можливість використання таких бактерій для прямої ферментації відходів сільськогосподарського виробництва, оскільки природні *Clostridium* sp. ВОНЗ синтезують целюлазу, ксиланазу і амілазу [36]. Слід зазначити, що штам ВОНЗ також здатний до одночасного споживання глюкози і ксилози [37].

У праці Li та He досліджено можливість використання природного мезофільного штаму *Clostridium* sp. MF28 для отримання бутанолу з використанням як джерела вуглецю трави (*Panicum virgatum*), кукурудзяних качанів і деревини листяних порід. Концентрація бутанолу (г/л) на цих субстратах становила 0,9, 1,0 та 1,5 відповідно. При цьому, використовуючи ксилан (група геміцелюлоз) як джерело вуглецю, вдалось отримати бутанол у кількості 3,2 г/л. Для імітації складу гідролізату лігноцелюлозної маси штаму MF28 вирощували на середовищі із глюкозою, ксилозою та арабінозою. Концентрація бутанолу при цьому становила 12 г/л. Незважаючи на низьку кількість бутанолу на природних субстратах, плюсами такої технології є використанням лігноцелюлозної біомаси без її попередньої хімічної обробки та без додавання целюлазних ферментів. Серед переваг використання штаму MF28 можна виділити відсутність споруляції, здатність до одночасного споживання глюкози, ксилози й арабінози, а також відсутність таких продуктів бродіння, як ацетону й етанолу [38].

З ґрунту на пасовищах китайської провінції Шаньдун Xin з колегами виділили *C. pasteurianum* GL11. Встановлено, що цей штаму продукує целюлази, ксиланазу та амілазу. Використовуючи ксилан з берези (60 г/л), вказані клостридії синтезують 1,5 г/л бутанолу, а етанолу — у 3,5 раза більше. Цікаво, що при використанні крохмалю (60 г/л) як субстрату штаму GL11 синтезує 5 г/л бутанолу, а етанолу — у 8 разів менше [39].

Xin із співавт. з ґрунту виділили *Clostridium* sp. NJP7. Штаму клостридій — це вперше виділені природні бактерії, які характеризуються здатністю до прямого споживання ксилану та синтезу бутанолу за ферментативним шляхом ацетон-ізопропанол-бутанол. Виявивши, що ксиланазу *Clostridium* sp. NJP7 зберігає 90% активності при 55°C упродовж години, автори розробили технологію зі зміщенням температури. Для ефективного гідролізу ксилану через 24 год культивування температуру з 35°C підвищували до 55°C і витримували 24 год. Потім температуру понижували до 35°C і вносили свіжу культуру *Clostridium* sp. NJP7. За концентрації ксилану берези 60 г/л вдалось отримати 2,1 г/л бутанолу. Також автори запропонували спосіб екстрагування бутанолу та ізопропанолу *in situ* із використанням біодизелю, за якого на середовищі з глюкозою отримали 25,6 г/л бутанолу [40].

Застосувавши багатофакторну модульну метаболічну інженерію, Wen із співавт. створили подвійний консорціум клостридій (*C. cellulovorans* DSM 743B, *C. beijerinckii* NCIMB 8052) для синтезу бутанолу на лігноцелюлозному субстраті. Для целюлолітичного штаму DSM 743B розроблена генетична система передбачала зміни за двома модулями: I — посилення вуглецевого потоку у напрямку синтезу бутирату, II — перенаправлення NADH у бік синтезу бутирату й етанолу. Для штаму NCIMB 8052, що здатен синтезувати розчинники АБЕ, розроблено зміни за такими модулями: III — реасиміляція органічних кислот, IV — утилізація ксилози. Як джерело вуглецю використовували кукурудзяні качани, які обробляли гідроксидом натрію. Вказаний консорціум розкладає 83,2 г/л попередньо оброблених кукурудзяних качанів і синтезує 11,5 г/л бутанолу [41].

Zhang із колегами як субстрат використали деревину гібридної тополі (*Populus*). Попередню обробку лігноцелюлозної сировини здійснювали сірчаною кислотою. Отриманий прегідролізат освітлювали гідрокарбонатом кальцію з подальшою детоксикацією активованим вугіллям. Культивуючи *S. saccharobutylicum* ВАА-117 на середовищі із субстратом, що пройшов таку обробку, отримали бутанол у концентрації 13 г/л. Автори також досліджували можливість використання необробленого, лише освітленого або лише детоксифікованого прегідролізату. При цьому зброджування вуглеводів не спостерігали [42].

Як лігноцелюлозну сировину в наступному дослідженні було використано деревину сосни. Її попередню обробку здійснювали етанолом. Автори (Li із колегами) запропонували двоетапний спосіб детоксикації прегідролізату із застосуванням гідроксиду кальцію (I етап: 25°C, 30 хв) та аніонної смоли Dowex 1X4 (II етап: 25°C, 1 год). У результаті АБЕ бродіння з використанням *S. acetobutylicum* ATCC 824 було отримано лише 7,5 г/л бутанолу [43].

Порівняно з мезофільними продуцентами, що були розглянуті вище, перевагою використання *S. thermocellum* є здатність рости при вищих температурах (50—60°C), що сприяє розкладанню целюлози і знижує імовірність інфікування сторонніми мікроорганізмами. Lin із співавт. створили генетично модифіковані кластридії *S. thermocellum* СТ24 з інтегрованими у бактеріальну хромосому генами кетокислотного шляху біосинтезу ізобутанолу (*kivd*, *ilvBN*, *ilvC*, *ilvD*). Штам СТ24 вирощували на середовищі з концентрацією целюлози 80 г/л при 50°C, але концентрація ізобутанолу при цьому була досить низькою і становила 5,4 г/л [44].

Узагальнена інформація щодо вказаних вище штамів кластридій наведена у табл. 4.

*Таблиця 4. Синтез органічних розчинників кластридіями на основі лігноцелюлозної сировини*

Продуцент	Вихідна сировина	Метод попередньої обробки сировини (параметри)	Концентрація бутанолу, г/л	Загальна концентрація розчинників (АБЕ), г/л	Тривалість культивування, год	Джерело
1	2	3	4	5	6	7
<i>Окреме оцукрювання і зброджування вуглеводів</i>						
<i>S. acetobutylicum</i> NRRL B 527	Шкірки ананасу	Фенольно-кислотний гідроліз (автоклавування — 180°C, 10 хв)	5,2	9,3	120	[28]
<i>S. acetobutylicum</i> 11274	Бур'яни	Кислотний гідроліз (автоклавування — 121°C, 15 хв)	9,1	16,5	92	[29]
<i>S. acetobutylicum</i> NRRL B-591	Органічна фракція твердих побутових відходів	Кислотний гідроліз (автоклавування — 140°C, 60 хв)	10,1	17	96	[27]

1	2	3	4	5	6	7
<i>C. beijerinckii</i> P260	Макуха з насіння <i>Physaria fendleri</i>	Кислотний гідроліз (автоклавування — 121°C, 1 год)	11,1	19,2	40	[26]
<i>C. beijerinckii</i> B-592	Деревина сосни	Кислотний гідроліз (витримка — 1 год; автоклавування — 121 °C, 1 год)	11,6	18,5	60	[23]
<i>C. beijerinckii</i> CC101	Стебла топінамбура	Гідроліз сумішшю лугу та пероксиду водню (автоклавування — 121°C, 1 год)	11,8	17,6	60	[25]
<i>C. beijerinckii</i> P260	Стебла, листя і качани кукурудзи	Кислотний гідроліз (автоклавування — 160°C, 20 хв)	<b>14,5</b>	<b>26,3</b>	<b>85</b>	[22]
<i>C. tyrobutyricum</i> (Dack)-pTBA	Лушпиння сої	Кислотний гідроліз (автоклавування — 121°C, 30 хв)	<b>15,7</b>	<b>27</b>	<b>54</b>	[24]
<i>Одноступеневе оцукрювання та зброджування вуглеводів</i>						
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Пусті залишки пальмових фруктів	Лужний гідроліз (витримка — 4 год; автоклавування — 121°C, 5 хв)	2,8	4,7	96	[30]
<i>C. acetobutylicum</i> NRRL B-591	Органічна фракція твердих побитових відходів	Спиртово-кислотний гідроліз (автоклавування — 120°C, 30 хв)	8,6	13,1	96	[34]
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Слонова трава	Лужний гідроліз (автоклавування — 121 °C, 40 хв)	9,5	15,8	96	[33]
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Шлам крафт-паперу	Без обробки	10,2	18	120	[32]
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Кукурудзяна солома	Паровий вибух (автоклавування — 1,5 МПа, 5 хв)	<b>10,4</b>	<b>17,1</b>	<b>84</b>	[31]
<i>Об'єднаний метод</i>						
<i>Clostridium</i> sp. MF28*	Деревина листяних порід	Без обробки	1,5	*	20 діб	[38]
<i>C. pasteurianum</i> GL11**	Ксилан берези	—	1,5	6,6**	144	[39]
<i>Clostridium</i> sp. NJP7***	Ксилан берези	—	2,1	5,8***	144	[40]
<i>C. thermocellum</i> CT24****	Целюлоза	—	5,4	9,4****	75	[44]
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Деревина сосни	Спиртовий гідроліз (витримка — 12 год; автоклавування — 170°C, 1 год)	7,5	11,1	72	[43]

1	2	3	4	5	6	7
Консорціум <i>C. cellulovorans</i> DSM 743B + <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	Кукурудзяні качани	Лужний гідроліз (автоклавування — 121°C, 20 хв)	11,5	22,1	108	[41]
<i>C. beijerinckii</i> P260	Стебла, листя і качани кукурудзи	Кислотний гідроліз (автоклавування — 160°C, 20 хв)	11,6	20,8	70	[35]
<i>C.</i> <i>saccharobutylicum</i> BAA-117	Деревина тополі	Кислотний гідроліз (витримка — 12 год; автоклавування — 160°C, 1 год)	13,4	21,3	96	[42]
<i>Clostridium</i> sp. ВОНЗ	Рисові висівки і кунжутна макуха	<b>Без обробки</b>	13,5	<b>нв</b>	7 діб	[36]

**Примітка:** АБЕ — ацетон-бутанол-етанол; \* — штам не продукує ацетон і етанол; \*\* — штам не продукує ацетон, продукує бутанол і етанол; \*\*\* — штам синтезує ізопропанол, бутанол, етанол; \*\*\*\* — штам синтезує ізобутанол, не синтезує ацетон; нв — не визначали ацетон та етанол.

Як видно з даних, що наведені у табл. 4, досить перспективними продуцентами бутанолу для подальшого вивчення є *C. beijerinckii* P260, *C. tyrobutyricum* (Dack)-рТВА, *C. saccharobutylicum* BAA-117, *C. acetobutylicum* ATCC 824 та *Clostridium* sp. ВОНЗ. Також слід зазначити, що штами (Dack)-рТВА та ВОНЗ здатні до одночасного споживання глюкози і ксилози, при цьому штам ВОНЗ є природним немодифікованим продуцентом. Також перевагою *Clostridium* sp. ВОНЗ є здатність споживати лігноцелюлозну сировину без попередньої обробки та ферментативного гідролізу. Такі ж властивості притаманні штаму MF28, але недоліком його використання є низька концентрація бутанолу та досить тривалий час культивування.

## Висновки

Широкомасштабне виробництво біобутанолу на основі лігноцелюлозних відходів передбачає вирішення ряду проблем. По-перше, розробка ефективних методів попередньої обробки вихідного субстрату. По-друге, одержання сольвентогенних штамів кластридій, здатних до синтезу целюлолітичних ферментів, міксотрофного споживання суміші вуглеводів і переважного синтезу бутанолу без побічних продуктів. По-третє, розробка технологій, що забезпечують високу концентрацію бутанолу на лігноцелюлозних субстратах.

## Література

1. Sorrell S., Speirs J., Bentley R., Brandt A., Miller R. Global oil depletion: A review of the evidence. *Energy Policy*. 2010, 38(9): 5290—5295. doi: 10.1016/j.enpol.2010.04.046.
2. Sauer M. Industrial production of acetone and butanol by fermentation – 100 years later. *FEMS Microbiol. Lett.* 2016, 363(13). doi: 10.1093/femsle/fnw134.

3. Lapuerta M., Ballesteros R., Barba J. Strategies to introduce n-butanol in gasoline blends. *Sustainability*. 2017, 9(4). doi: 10.3390/su9040589.
4. Tomita H., Okazaki F., Tamaru Y. Direct IBE fermentation from mandarin orange wastes by combination of *Clostridium cellulovorans* and *Clostridium beijerinckii*. *AMB Express*. 2019, 9(1). doi: 10.1186/s13568-018-0728-7.
5. Al-Shorgani N.K.N., Shukor H., Abdeshahian P., Kalil M.S., Yusoff W.M.W., Hamid A.A. Enhanced butanol production by optimization of medium parameters using *Clostridium acetobutylicum* YM1. *Saudi J. Biol. Sci.* 2018, 25 (7): 1308—1321. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.017.
6. Shanmugam S., Sun C., Zeng X., Wu Y.R. High-efficient production of biobutanol by a novel *Clostridium* sp. strain WST with uncontrolled pH strategy. *Bioresour. Technol.* 2018, 256: 543—547. doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.077.
7. Elfasakhany A. Experimental study on emissions and performance of an internal combustion engine fueled with gasoline and gasoline/n-butanol blends. *Energy Convers. Manag.* 2014, 88: 277—283. doi: 10.1016/j.enconman.2014.08.031.
8. Tiginova O.A., Shulga S.M., Blume Y.B. Biobutanol as an alternative type of fuel. *Cytol. Genet.* 2013, 47(6): 366—382. doi: 10.3103/S0095452713060042.
9. Blaschek H.P., Ezeji T.C., Scheffran J. Biofuels from agricultural wastes and byproducts. Blackwell Publishing. 2010. 265 p.
10. Ndaba B., Chiyanzu S., Marx I. n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: a review. *Biotechnol. Reports*. 2015, 8: 1—9. doi: 10.1016/j.btre.2015.08.001.
11. Verardi A., De Bari I., Ricca E., Calabro V. Hydrolysis of lignocellulosic biomass: current status of processes and technologies and future perspectives. In *Bioethanol*. InTech. 2012: 95—122.
12. Скроцький С.О. Органовмісні відходи виробництва як субстрати для біосинтезу бутанолу бактеріями роду *Clostridium*. *Наукові праці НУХТ*. 2018, 24(2): 34—43. doi: 10.24263/2225-2924-2018-24-2-6.
13. Ullah K., Ahmad M., Sharma V.K., Lu P., Harvey A., Zafar M., Sultana S. Assessing the potential of algal biomass opportunities for bioenergy industry: a review. *Fuel*. 2015, 143: 414—423. doi: 10.1016/j.fuel.2014.10.064.
14. Monlau F., Sambusiti C., Barakat A., Quemeneur M., Trably E., Steyer J.P., Carrere H. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 2014, 32: 934-951. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.04.007.
15. Jonsson L.J., Martin C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* 2016, 199: 103-112. doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.009.
16. Mbaneme-Smith V., Chinn M.S. Consolidated bioprocessing for biofuel production: recent advances. *Energy Emiss. Control Technol.* 2015, 3: 23—44. doi: 10.2147/EECT.S63000.
17. Jouzani G.S., Taherzadeh M.J. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Res. J.* 2015, 5: 152—195. doi: 10.18331/BRJ2015.2.1.4.
18. Cheng C.-L., Che P.-Y., Chen B.-Y., Lee W.-J., Lin C.-Y., Chang J.-S. Biobutanol production from agricultural waste by an acclimated mixed bacterial microflora. *Appl. Energy*. 2012, 100: 3—9. doi: 10.1016/j.apenergy.2012.05.042.
19. Amiri H., Karimi K. Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: challenges and perspectives. *Bioresour. Technol.* 2018, 270: 702—721. doi: 10.1016/j.biortech.2018.08.117.
20. Xin F., Dong W., Zhang W., Ma J., Jiang M. Biobutanol production from crystalline cellulose through consolidated bioprocessing. *Trends Biotechnol.* 2018. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.08.007.
21. Tamaru Y., Lypez-Contreras A.M. Cellulose — Biomass Conversion: Chapter 6 — Lignocellulosic biomass utilization toward biorefinery using mesophilic clostridial species. InTech. 2013: 131—144. doi: 10.5772/56480.

22. Qureshi N., Saha B.C., Hector R.E., Dien B., Hughes S., Liu S. Iten L., Bowman M.J., Sarath G., Cotta M.A. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II — Use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass Bioenergy*. 2010, 34: 566—571. doi: 10.1016/j.biombioe.2009.12.023.
23. Nanda S., Dalai A.K., Kozinski J.A. Butanol and ethanol production from lignocellulosic feedstock: biomass pretreatment and bioconversion. *Energy Sci. Eng.* 2014, 2(3): 138—148. doi: 10.1002/ESE3.41.
24. Yu L., Xu M., Tang I-C., Yang S.-T. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production through co-utilization of glucose and xylose. *Biotechnol. Bioeng.* 2015, 112 (10): 2134—2141. doi: 10.1002/bit.25613.
25. Xue C., Zhang X.T., Wang J.F., Xiao M., Chen L.J., Bai F.W. The advanced strategy for enhancing biobutanol production and high-efficient product recovery with reduced wastewater generation. *Biotechnol. Biofuels*. 2017, 10. doi: 10.1186/s13068-017-0836-7.
26. Qureshi N., Harry-O'kuru R., Liu S., Saha B. Yellow Top (*Physaria fendleri*) presscake: a novel substrate for butanol production and reduction in environmental pollution. *Biotechnol. Prog.* 2018. doi: 10.1002/btpr.2767.
27. Farmanbordar S., Karimi K., Amiri H. Municipal solid waste as a suitable substrate for butanol production as an advanced biofuel. *Energy Convers. Manag.* 2018, 157: 396—408. doi: 10.1016/j.enconman.2017.12.020.
28. Khedkar M.A., Nimbalkar P.R., Kamble S.P., Gaikwad S.G., Chavan P.V., Bankar S.B. Process intensification strategies for enhanced holocellulose solubilization: beneficiation of pineapple peel waste for cleaner butanol production. *J. Clean. Prod.* 2018, 199: 937—947. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.205.
29. Borah A.J., Roy K., Goyal A., Moholkar V.S. Mechanistic investigations in biobutanol synthesis via ultrasound-assisted ABE fermentation using mixed feedstock of invasive weeds. *Bioresour. Technol.* 2019, 272: 389—397. doi: 10.1016/j.biortech.2018.10.063.
30. Ibrahim M.F., Abd-Aziz S., Yusoff M.E.M., Phang L.Y., Hassan M.A. Simultaneous enzymatic saccharification and ABE fermentation using pretreated oil palm empty fruit bunch as substrate to produce butanol and hydrogen as biofuel. *Renew. Energy*. 2015, 77: 447—455. doi: 10.1016/j.renene.2014.12.047.
31. Li J., Wang L., Chen H. Periodic peristalsis increasing acetone-butanol-ethanol productivity during simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn straw. *J. Biosci. Bioeng.* 2016, 122 (5): 620—626. doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.04.009.
32. Guan W., Shi S., Tu M., Lee Y.Y. Acetone-butanol-ethanol production from Kraft paper mill sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour. Technol.* 2016, 200: 713—721. doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.102.
33. He C.-R., Kuo Y.-Y., Li S.-Y. Lignocellulosic butanol production from Napier grass using semi-simultaneous saccharification fermentation. *Bioresour. Technol.* 2017, 231: 101—108. doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.039.
34. Farmanbordar S., Amiri H., Karimi K. Simultaneous organosolv pretreatment and detoxification of municipal solid waste for efficient biobutanol production. *Bioresour. Technol.* 2018, 270: 236—244. doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.017.
35. Qureshi N., Singh V., Liu S. Ezeji T.C., Saha B.C., Cotta M.A. Process integration for simultaneous saccharification, fermentation, and recovery (SSFR): Production of butanol from corn stover using *Clostridium beijerinckii* P260. *Bioresour. Technol.* 2014, 154: 222—228. doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.080.
36. Rajagopalan G., He J., Yang K.-L. One-pot fermentation of agricultural residues to produce butanol and hydrogen by *Clostridium* strain BOH3. *Renew. Energy*. 2016, 85: 1127—1134. doi: 10.1016/j.renene.2015.07.051.
37. Xin F., Wu Y.R., He J. Simultaneous fermentation of glucose and xylose to butanol by *Clostridium* sp. strain BOH3. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, 80(15): 4771—4778. doi: 10.1128/AEM.00337-14.



38. Li T., He J. Simultaneous saccharification and fermentation of hemicellulose to butanol by a non-sporulating *Clostridium* species. *Bioresour. Technol.* 2016, 219: 430—438. doi: 10.1016/j.biortech.2016.07.138.
39. Xin F., Wang C., Dong W., Zhang W., Wu H., Ma J., Jiang M. Comprehensive investigations of biobutanol production by a non-acetone and 1,3-propanediol generating *Clostridium* strain from glycerol and polysaccharides. *Biotechnol. Biofuels.* 2016, 9. doi: 10.1186/s13068-016-0641-8.
40. Xin F., Chen T., Jiang Y., Dong W., Zhang W., Zhang M., Wu H., Ma J., Jiang M. Strategies for improved isopropanol-butanol production by a *Clostridium* strain from glucose and hemicellulose through consolidated bioprocessing. *Biotechnol. Biofuels.* 2017, 10. doi: 10.1186/s13068-017-0805-1.
41. Wen Z., Minton N.P., Zhang Y., Li Q., Liu J., Jiang Y., Yang S. Enhanced solvent production by metabolic engineering of a twin-clostridial consortium. *Metab. Eng.* 2017, 39: 38—48. doi: 10.1016/j.ymben.2016.10.013.
42. Zhang Y., Xia C., Lu M., Tu M. Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. *Biotechnol. Biofuels.* 2018, 11. doi: 10.1186/s13068-018-1182-0.
43. Li J., Shi S., Tu M., Via B., Sun F.F., Adhikari S. Detoxification of organosolv-pretreated pine prehydrolysates with anion resin and cysteine for butanol fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2018, 186 (3): 662—680. doi: 10.1007/s12010-018-2769-4.
44. Lin P.P., Mi L., Morioka A.H., Yoshino K.M., Konishi S., Xu S.C., Papanek B.A., Riley L.A., Guss A.M., Liao J.C. Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*. *Metab. Eng.* 2015, 31: 44—52. doi: 10.1016/j.ymben.2015.07.001.