

УДК 579.222

НОВІ ШТАМИ-ПРОДУЦЕНТИ БІОБУТАНОЛУ. I. ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ

О. О. Тігунова
С. М. Шулґа

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

E-mail: Shulga5@i.ua

Отримано 12.07.2012

Одержання нових продуктивних штамів мікроорганізмів, які продукують біобутанол, стає нагальною і актуальною проблемою. Вивчення морфологічних властивостей виділених штамів, відпрацювання умов їх культивування, оптимізація синтезу біобутанолу — основні передумови для створення економічно доцільного технологічного процесу. Мета роботи полягала в пошукові та ідентифікації штамів-продуцентів біобутанолу і масляної кислоти (його попередника). Об'єктами дослідження були мікроорганізми, виділені з ґрунтів та мулів водойм міста Києва. За результатами скринінгу виділених культур отримано три перспективних штами, які ідентифіковано як *Clostridium acetobutylicum*, *C. tyrobutylicum*, *C. butylicum*. Модифіковано середовище з урахуванням потреб нових культур. З метою максимального накопичення цільових продуктів досліджено метаболічні особливості продуцентів.

Ключові слова: біобутанол, біосинтез, АБЕ-ферментація, штами-продуценти.

Дослідження ензиматичних процесів з метою одержання біопалива розвиваються достатньо швидко. Біобутанол — один із видів біопалива, який одержують за допомогою мікробного синтезу в результаті ацетон-бутанол-етанол (АБЕ)-ферментації з використанням як субстрату глюкози або сахарози.

Для економічно доцільного виробництва біобутанолу штам-продуцент має продукувати виключно біобутанол та/або використовувати дешеву сировину-субстрат.

Бактерії *Clostridium acetobutylicum* у класичній АБЕ-ферментації спочатку продукували масляну, пропіонову, молочну та оцтову кислоти (стадія утворення кислоти), згодом водневий показник знижувався і починалася стадія продукування розчинників з утворенням бутанолу, ацетону й етанолу [1].

Одну з нових двостадійних технологій отримання біобутанолу [2] було розроблено в останні роки. На першій стадії штам-продуцент виробляв масляну кислоту, а на другій — інший штам-продуцент виробляв біобутанол [3]. У процесі накопичення масляної кислоти, попередника біобутанолу, його синтез інтенсифікувався, підвищувалася швидкість накопичення та збільшувались об'єми цільового продукту. Розроблення цієї технології стимулювало пошук нових продуктивних штамів продуцентів з використанням дешевої відновлювальної сировини [4–7].

У роботі проведено пошук та здійснено ідентифікацію нових штамів-продуцентів біобутанолу і масляної кислоти [8].

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були мікроорганізми, виділені з ґрунту та мулу водойм м. Києва (табл. 1).

Зразки ґрунтів відбирали стерильним шпателем з глибини 20 см, вносили їх у стерильні флакони з етикетками, на яких було вказано дату, назву зразка і місце відбору.

Ґрунтову суспензію для виявлення колоній та підрахунку мікроорганізмів отримали методом граничних розведень у співвідношенні 1:10 000.

Живильне середовище, бобово-пептонний агар (БПА) на основі бобового екстракту, було використано для визначення кількості мікроорганізмів у зразках. Екстракт виготовляли за схемою: 250 г насіння бобових замочували в 1 л води, кип'ятили протягом 1 год, відвар зливали і доводили його об'єм до 1 л відстояною водопровідною водою. Додавали 10 г сахарози і стерилізували протягом 20 хв (тиск — 0,5 атм). Для приготування БПА до 1 л екстракту додавали: сахарозу — 20 г, пептон — 5 г, NaCl — 5 г, CaCO₃ — 20 г, агар — 30 г, потім стерилізували упродовж 30 хв (тиск — 1 атм).

Для виділення спорових і знешкодження неспорових мікроорганізмів усі зразки

Таблиця 1. Характеристики місць відбору зразків

Зразок	Місця відбору
IFBG C1M	Мул озера «Міністерське». Піщаний, близько 1% коренів рослин, 20% рослинних решток
IFBG C2M ₁	Ґрунт озера «Міністерське». Чорнозем, 30% піску, 40% рослинних коренів, 20% рослинних решток
IFBG C3U	Мул з анаеробного біореактора очисних споруд м. Києва
IFBG C4B	Ґрунт озера «Водяне». Глинистий, 20% піску, 20% рослинних решток, 5% коренів рослин, близько 1% мушель
IFBG C53	Термічно оброблений мул очисних споруд м. Києва
IFBG C6H	Ґрунт озера «Наливне». Дерново-підзолистий, наявні рослинні рештки та близько 20% коренів
IFBG C7P	Регенерований мул очисних споруд м. Києва
IFBG C83	Ґрунт затоки річки «Дніпро». Піщаний, переважають рослинні корені (майже 85% від проби), близько 5% чорнозему, наявні рослинні рештки
IFBG C9Б	Ґрунт озера «Бетонне». Чорнозем, переважають рослинні корені (майже 95% від проби), близько 1% становить пісок, наявні часточки решток рослин

піддавали термічній обробці, яку проводили протягом 10 хв на водяній бані за температури 80 °С.

Бобово-пептонний бульйон (БПБ) використовували для накопичення культур мікроорганізмів. Для приготування БПБ до 1 л екстракту додавали: сахарози — 20 г, пептону — 5 г, NaCl — 5 г, CaCO₃ — 20 г, далі стерилізували протягом 30 хв (тиск — 0,5 атм).

Для накопичення культур 1 г кожної проби (ґрунту або мулу) вносили в колбу об'ємом 50 мл, стерильно доливали до верху колби БПБ і закривали стерильною пробкою з газовідвідною трубкою, кінець трубки занурювали в пробірку з водою і вміщували в термостат при 30 °С.

Селективним середовищем слугувало середовище Ешбі такого складу: водопровідна вода — 1 л, сахароза — 20 г, K₂HPO₄ — 2 г, MgSO₄ — 2 г, NaCl — 2 г, K₂SO₄ — 1 г, 1%-й розчин FeSO₄ — дві краплі, CaCO₃ — 5 г. Середовище стерилізували протягом 30 хв (тиск — 0,5 атм).

Для виявлення кластридальних культур у колбу об'ємом 50 мл вносили 1 г кожної проби (ґрунту або мулу) та 30 мл середовища Ешбі. Колби зі зразками вміщували в ексікатор.

Як тестові використовували два середовища: Виноградського (дистильована вода — 1 л, глюкоза — 5 г, K₂HPO₄ — 1 г, MgSO₄ — 0,5 г, NaCl — 0,01 г, FeSO₄ — 0,01 г, MnSO₄ — 0,01 г), яке стерилізували протягом 30 хв, тиск — 0,5 атм, та середовище зі скибок картоплі, натертих крейдою. Для приготування останнього картоплю ретельно мили, очищували, знову мили, нарізали скибочками

завтовшки 0,5–0,7 см, натирали крейдою та розкладали у чашки Петрі на два шари фільтрувального паперу. Чашки стерилізували протягом 1 год (тиск — 1 атм).

Середовище Виноградського (об'єм 30 мл) розливали у 50 мл колби, додавали 1 г відібраних зразків і вносили до ексікатора.

Для очищення культур та отримання окремих колоній було створено модифіковане агаризоване середовище Виноградського (МAB) такого складу (г/л): дистильована вода — 1 л, глюкоза — 20 г, K₂HPO₄ — 1 г, MgSO₄ — 0,5 г, NaCl — 0,01 г, FeSO₄ — 0,01 г, MnSO₄ — 0,01 г, CaCO₃ — 20 г, дріжджовий екстракт — 2 г, вітамін B₁ — 0,01 г, вітамін B₁₂ — 0,01 г, тіаміну гідрохлорид — 0,25 г, параамінобензойна кислота — 0,001 г, агар — 30 г. Середовище стерилізували протягом 30 хв (тиск 1 атм).

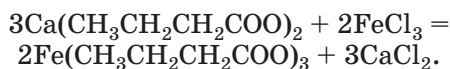
Використовували також ензиматичне середовище такого складу (г/л): меляса — 55; (NH₄)₂SO₄ — 0,6; (NH₄)₂HPO₄ — 1,6; CaCO₃ — 10; рН — 6,2. Середовище стерилізували протягом 30 хв (тиск — 1 атм).

Культикування зразків проводили в колбах з рідким середовищем або на чашках Петрі в ексікаторі. Кришку ексікатора герметично притирали. Після притирання ексікатор тричі продували азотом і ставили в термостат, нагрітий до 30 °С.

Мікроскопіювання проводили за допомогою мікроскопа Laboval (Німеччина). Знімки робили фотоапаратом Canon PowerShot A640 (Японія).

Для виявлення в культуральній рідині масляної кислоти використовували якісну реакцію отримання маслянокислого заліза.

Реакція полягала в тому, що нейтральні розчини маслянокислих солей під час нагрівання з FeCl_3 набували коричневого забарвлення з утворенням маслянокислого заліза:



Для проведення такої реакції в пробірку наливали 5 мл культуральної рідини, додавали 5%-й розчин хлориду заліза (2 мл) і нагрівали на полум'ї пальника.

Розчин маслянокислого заліза у відбитому світлі набував бурувато-коричневого забарвлення, а в світлі, яке проходило, — криваво-червоного. Як негативний контроль застосовували стерильне ензиматичне середовище з додаванням FeCl_3 . Кількість маслянокислого заліза, що утворювалось, визначали за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) за довжини хвилі 540 нм. Вихідне середовище слугувало стандартом.

За допомогою ФЕК побудовано калібрувальний графік (ензиматичне середовище з різною концентрацією маслянокислого заліза) та визначено концентрацію масляної кислоти в культуральній рідині (рис. 1).

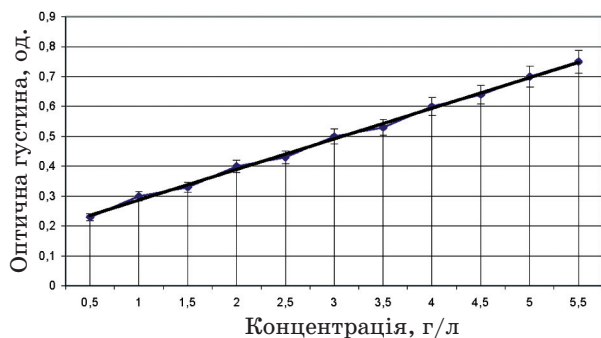


Рис. 1. Калібрувальний графік визначення концентрації масляної кислоти

Для виявлення ацетону в культуральному середовищі використовували індикаторні смужки «Ацетонтест» (Україна) з діапазоном концентрацій від 0 до 15 ммоль/л. Негативним контролем слугувало стерильне середовище для культивування, а позитивним — чистий ацетон.

Після семи діб вирощування клітини осаджували за допомогою ультрацентрифуги Labofuge 400R, Німеччина (швидкість 13 000 об/хв).

Наявність етанолу та бутанолу в культуральній рідині визначали за допомогою газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором. Використовували набивну колонку завдовжки 3 м, фаза — карбовак

1500 на хроматоні N-A-W-DMSC (0,20–0,25 мм). Температура колонки 60 ± 2 °С, випарювача 160 ± 5 °С. Співвідношення потоків азот–водень–повітря 1:1:10.

Використовували м'ясопептонну желатину (склад, г/л: суха суміш поживного бульйону — 15, NaCl — 5, дрібно порізаної желатини — 150) для визначення параметра «розріджуваність». Середовище стерилізували протягом 30 хв (тиск — 0,5 атм).

Для фарбування джгутиків застосовували метод Лефлера з модифікацією, наведеною в роботі [9]. Середовища Гісса з індикатором Андреде використовували для встановлення «зброджуваності» цукрів. Для забарвлення препаратів із живими клітинами використовували розчин Люголя, а для вітального забарвлення — метиленовий синій.

Усі проби для виявлення гранульози було проаналізовано за допомогою мікроскопії. Культури відбирали з товщі середовища та готували препарат «роздавлена крапля» з додаванням розчину Люголя. Гранульоза, реагуючи з йодом, забарвлювалась синім. Для вітального фарбування відібрані бактерії за допомогою петлі наносили на предметне скельце з краплею води, фіксували над полум'ям пальника та фарбували метиленовим синім.

Для ідентифікації місця розташування спор у клітинах було застосовано метод фарбування спор, наведений у роботі [9].

Для визначення відношення зразків до фарбування за Грамом провели дослідження з використанням відповідних барвників [10].

Статистичну обробку даних було здійснено за допомогою програми Microsoft Excel. Усі досліді проводили в 3 повторах. Дані вважали достовірними за $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Проби зразків ґрунту та мулу з водою м. Києва (табл. 1) було відповідно оброблено та досліджено протягом першої доби. Для визначення кількості мікроорганізмів у кожному зразку були приготовлені і висіяні на БПА розведення відповідної суспензії з ґрунту та мулу. Кількість мікроорганізмів у відібраних зразках наведено в табл. 2.

Отримані дані про кількість мікроорганізмів у зразках дали змогу встановити оптимальне розведення суспензії для подальших досліджень.

Для накопичення культур маслянокислих бактерій зразки було внесено в БПБ і залишено в термостаті за температури

Таблиця 2. Кількість мікроорганізмів у зразках

Зразок	Кількість мікроорганізмів, млн. КУО/г
IFBG C1M	105± 15
IFBG C2M ₁	199± 20
IFBG C3U	210± 18
IFBG C4B	800±50
IFBG C5З	900±52 I
IFBG C6H	248±20
IFBG C7P	130±19
IFBG C8З	561±33
IFBG C9Б	634±41

30 °С. Для одержання анаеробних азотфіксаторів зразки розсіяли на тестове середовище Виноградського, перенесли їх до ексикатора та помістили в термостат при 30 °С. Спостереження за зразками вели впродовж тижня. Отримані дані щодо змін характеристик середовища подано в табл. 3.

З даних табл. 3 випливає, що в зразках IFBG C9Б, IFBG C6H та IFBG C4B на БПБ відбувалось активне газоутворення, а в пробі IFBG C5З — незначне; на середовищі Виноградського — активне газоутворення та помутніння в зразках IFBG C2M₁, IFBG C7P, IFBG C3U, а неістотне — в IFBG C1M; на середовищі Ешбі активне газоутворення спостерігали в зразку IFBG C6H, IFBG C8З, а незначне — у IFBG C5З. В усіх пробах було відзначено помутніння середовища та відчувався характерний запах масляної кислоти.

Проведено фарбування живих препаратів за допомогою розчину Люголя для встановлення належності відібраних культур бактерій до клостридіального типу. Клітини

бактерій групи клостридій містили в своєму складі гранульозу — крохмалеподібну речовину, яка за дії йоду забарвлювалась у синій колір (рис. 2).

В усіх пробах виявили одну або більше культур, які мали форму рухливих паличок і містили гранульозу. В деяких пробах було виявлено суміш культур.

Усі зразки було висаджено на скибки картоплі, натерті крейдою та вміщені в чашки Петрі, для перевірки наявності маслянокислих та ацетонобутилових бактерій. Культивування проводили при 30 °С в ексикаторі. Отримані дані наведено в табл. 4.

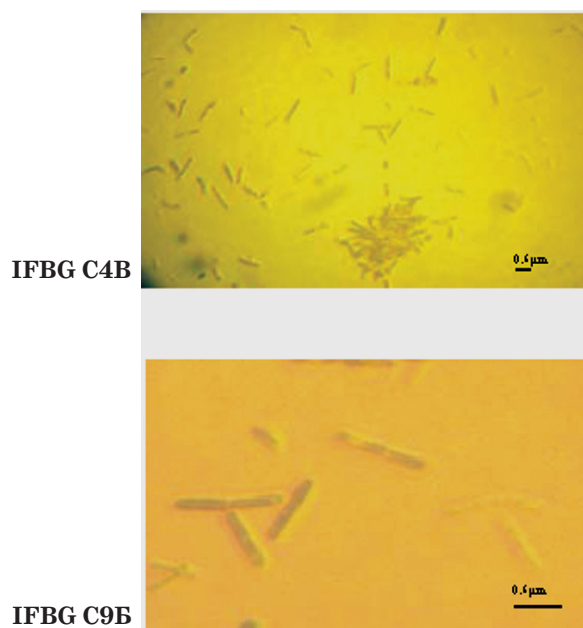


Рис. 2. Фотографії культур IFBG C4B та IFBG C9Б (темним забарвлено гранульозу)

Таблиця 3. Характеристики змін середовища

Зразок	Зміни середовища					
	Помутніння			Газоутворення		
	БПБ	Виноградського	Ешбі	БПБ	Виноградського	Ешбі
IFBG C1M	+*	+	+	-*	++	—
IFBG C2M1	+	++	+	+	+++	+
IFBG C3U	+	++	+	+	+++	+
IFBG C4B	+++*	+	-	+++*	++	-
IFBG C5З	+	+	+	+	-	+++
IFBG C6H	++	++	++	+++	+	+++
IFBG C7P	++	+++	++	+	+++	+
IFBG C8З	+	+	+	++	++	++
IFBG C9Б	++	+	++	+++	+	+

* — Зміни відсутні; +, ++, +++ інтенсивність змін.

Таблиця 4. Морфологія колоній на скибках картоплі

Зразок	Морфологічні ознаки
IFBG C1M	Жовті, невеликі, округлі, з нерівним краєм, з пухирцями повітря всередині
IFBG C2M ₁	Яскраво-жовтого кольору, плейоморфні, зморшкуваті, з пухирцями повітря всередині
IFBG C3U	Сірувато-жовті, бліді, зморшкуваті, з пухирцями повітря всередині
IFBG C4B	Темно-руді, округлі, гладенькі, з пухирцями повітря всередині, яскравого забарвлення
IFBG C5З	Жовті, округлі, випуклі, з пухирцями повітря всередині
IFBG C6H	Білого кольору, округлі, гладенькі, з пухирцями повітря всередині
IFBG C7P	Білого кольору, округлі, зморшкуваті, з пухирцями повітря всередині
IFBG C8З	Жовті, округлі, слизюваті, з пухирцями повітря всередині
IFBG C9Б	Жовтувато-коричневі, гладенькі, дрібні, слизюваті з пухирцями повітря всередині

Як видно з табл. 4, наявність в усіх зразках характерних колоній білого та жовтого кольору свідчить про присутність маслянокислих бактерій. Колонії цих бактерій на поверхні картоплі мали опуклу форму, жовтуватий колір і пухирці газу всередині. Проаналізувавши форму, розміри, характер краю, забарвлення, структуру, консистенцію та поверхню колоній, дійшли висновку, що в усіх зразках виявлено різні штами маслянокислих бактерій.

Для очищення культур та отримання окремих колоній культури висіяли на МАВ і культивували в термостаті за температури 30 °С. На 5-ту добу одержано ізольовані характерні колонії білого і сірого кольору та колонії з жовтим відтінком. В результаті дослідження отримано колонії трьох основних типів: у формі «двокоопуклої лінзи», «клаптика вати» або «літачка» із зоною провітлення навколо всіх колоній. Найхарактерніші колонії трьох зразків подано на рис. 3.

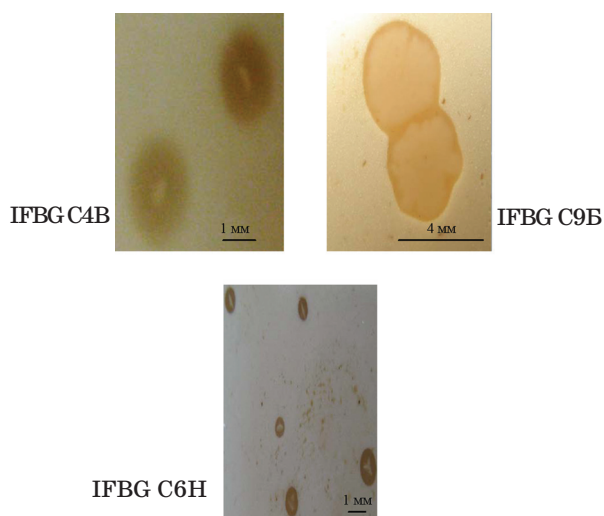


Рис. 3. Зразки IFBG C4B, IFBG C9Б, IFBG C6H на середовищі МАВ

Для підтвердження належності колоній до клостридій та чистоти культур було проведено мікроскопіювання з метиленовим синім. Результати типового зразка наведено на рис. 4.

В усіх зразках виявлено палички із заокругленими кінцями, розташовані поодинокі, попарно або у вигляді ланцюжка. Спори були розміщені термінально або субтермінально.

Клостридіальні колонії переносили на рідке ензиматичне середовище та культивували протягом чотирьох діб. Після закінчення культивування визначали кількість масляної кислоти за допомогою реакції з FeCl₃ (рис. 5).

Найбільшу інтенсивність забарвлення з FeCl₃ було виявлено в культуральній рідині зразка IFBG C4B. Оптична густина культуральної рідини зразка IFBG C4B становила 0,64, концентрація масляної кислоти — 4,5 г/л.

Усі зразки перевірили за допомогою ацетон-тесту на наявність ацетону в культуральній рідині. Результати перевірки подано в табл. 5.

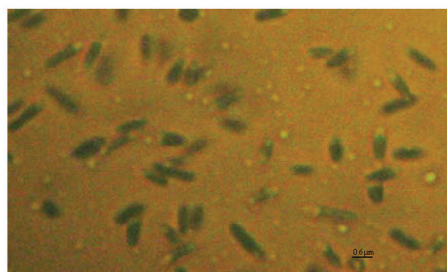


Рис. 4. Культура IFBG C9Б, забарвлена метиленовим синім

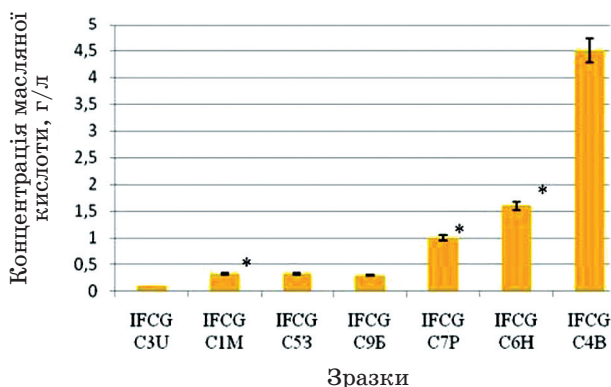


Рис. 5. Вміст масляної кислоти у культуральній рідині відібраних зразків:

* — різниця достовірна порівняно з контролем; контроль — найменша концентрація масляної кислоти у культуральній рідині

Таблиця 5. Вміст ацетону в культуральній рідині відібраних зразків

Зразки	Концентрація ацетону, г/л
IFBG C3U	—
IFBG C1M	0,21±0,05
IFBG C53	—
IFBG C9B	—
IFBG C7P	0,23±0,05
IFBG C6H	0,23±0,05
IFBG C4B	—

З результатів, наведених у табл. 5, випливає, що ацетон виявлено в культуральній рідині культур IFBG C6H, IFBG C7P та IFBG C1M. Концентрація ацетону в цих зразках за даними тесту — близько 0,2 г/л.

Було визначено вміст етилового спирту та бутанолу в культуральній рідині відібраних зразків (рис. 6).

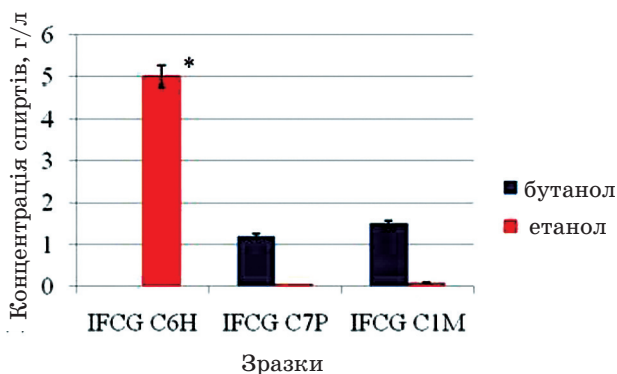


Рис. 6. Вміст етанолу та бутанолу в культуральній рідині зразків IFCG C6H, IFCG C1M, IFCG C7P:

* — різниця достовірна відносно контролю; контроль — найменша концентрація бутанолу та етанолу в культуральній рідині

Як видно з рис. 6, культуральна рідина штамів IFCG C6H, IFCG C7P містила бутанол та етанол. Кількість етанолу й бутанолу в культуральній рідині становила близько 1,2 г/л. Зразок IFCG C1M містив лише бутанол.

Для встановлення виду бактерій було проведено ідентифікацію зразків IFCG C4B, IFCG C6H і IFCG C7P. Ідентифікацію виконували в декілька етапів (рис. 7).

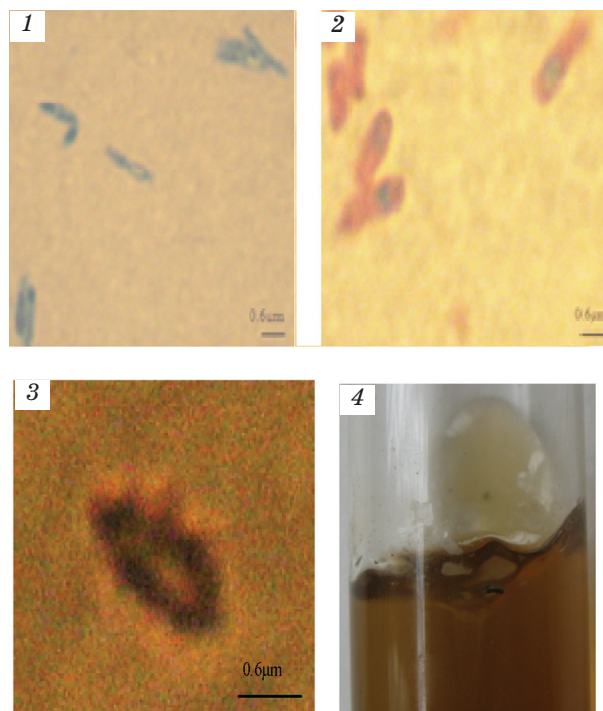


Рис. 7. Етапи визначення родової належності культур:

- 1 — фарбування за Грамом;
- 2 — фарбування спор;
- 3 — фарбування джгутиків;
- 4 — розрідження желатини

Етап перший

Відомо, що розрізнення грамозитивних та грамнегативних бактерій є першим кроком у диференціації бактеріального зразка за біохімічними властивостями їхньої клітинної стінки. Забарвлення за Грамом має велике значення у систематиці бактерій, тому було проведено дослідження штамів на відповідну реакцію.

Під час фарбування клітини набули темно-синього забарвлення, що свідчить про належність їх до грамозитивних бактерій (рис. 7, 1).

Етап другий

Готували мазок тридобових культур для виявлення спор та визначення їхніх характеристик. Спори фарбували за методом, наведеним у роботі [9]. На рис. 7, 2 показано

спори, забарвлені блакитним або синім кольором, та цитоплазму молодих клітин — рожевим або червоним. Зразки мали однакове розташування спор — субтермінальне. Спори мали овальну форму і начебто «роздували» клітину.

Етап третій

Джгутики добової культури зразків фарбували за методом, наведеним в роботі [9]. Результати дослідів подано на рис. 7, 3. Бактерії мали перитрихіяльно розташовані джгутики.

Етап четвертий

Для дослідження кластридальних культур на розрідження желатини штами культурували на м'ясопептонній желатині. Порівняно з контролем зразки IFBG C7P та IFBG C4B не розріджували, а зразок IFBG C6H — розріджував желатину. Розрідження мало лійкоподібну форму з поверхнею у вигляді кратера (рис. 7, 4).

Етап п'ятий

Для визначення «зброджуваності» цукрів зразки висівали на кольорові середовища Гісса (Hiss). Результати досліджень подано в табл. 6.

У результаті ідентифікації бактерій за Бердже було виявлено, що зразок IFBG C6H належав до виду *Clostridium acetobutylicum*, IFBG C4B — до *C. tyrobutylicum*, IFBG C7P — до *C. butylicum*.

Таблиця 6. Визначення «зброджуваності» цукрів

Вуглеводи	Зразки		
	IFBG C4B	IFBG C7P	IFBG C6H
Глюкоза	+	+	+
Сорбіт	–	–	+
Фруктоза	+	+	+
Арабіноза	–	–	+
Аскулін	–	+	–
Лактоза	–	+	+
Целюлоза	–	–	+
Галактоза	–	+	+
Крохмаль	–	+	+
Ксиліоза	+	+	+
Сахароза	–	+	+
Маніт	+	–	+
Рамноза	–	+	+
Маноза	+	+	+

+ зброджується; – не зброджується.

Ідентифікація культур нових штамів-продуцентів біопалива це — перший крок на шляху розроблення технології одержання біобутанолу з основними технологічними етапами — збільшенням виходу біобутанолу та використанням дешевої відновлювальної сировини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Tiginova O., Shulga S. Obtaining of new butanol producers // Abst. 15th Eur. Congr. Biotechnol., Istanbul, Turkey, 23–29 September 2012. — V. 29, Issue S. — P. S 43.
2. International patent US 5 753 474. Continuous two stage, dual path anaerobic fermentation of butanol and other organic solvents using two different strains of bacteria / D. E. Ramey. — Filed 20.12.1996; Published 19.05.1998.
3. Биобутанол: история, технологии, производители. — Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология». — 2009. — Онлайн ресурс: <http://www.cbio.ru/article.php?storyid=3355>.
4. Ren Z., Ward T. E., Logan B. E., Regan J. M. Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic *Clostridium* species // J. Appl. Microbiol. — 2007 — V. 103 (6). — P. 2258–2266.
5. Березина О. В. Целлюлазная и гемицеллюлазная активности сольентогенных кластридий // Сборник статей «Биотехнология будущего» в рамках Международного

- симпозиума «ЕС — Россия: перспективы сотрудничества в области биотехнологии в 7-ой Рамочной программе». — М.: ОАО «Авиаиздат», 2006. — С. 4–5.
6. Ястремская Л. С., Васильченко О. А. Селекция анаэробного целлюлолитического термофильного штамма *Clostridium thermocellum* 5CT // Биотехнология. — 2011. — Т. 4, № 2. — С. 80–85.
7. Guillaume Bruant, Marie-Josée Levesque et al. Genomic Analysis of Carbene Monoxide Utilization and Butanol Production by *Clostridium carboxidivorans* Strain p7^T. // Plose ONE. — 2010. — V. 5, Iss. 9. — P. 1–12.
8. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта. — М.: Мир, 1980. — 495 с.
9. Слюсаренко Т. П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. Издание третье, переработанное и дополненное. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. — 208 с.
10. Энтеробактерии. Руководство для врачей / Под ред. В. И. Попровского. — М.: Медицина, 1985. — 317 с.

**НОВЫЕ ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ
БИОБУТАНОЛА.
I. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ**

*Е. А. Тигунова
С. М. Шулга*

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

E-mail: Shulga5@i.ua

Получение новых продуктивных штаммов микроорганизмов, продуцирующих бутанол, становится насущной и актуальной проблемой. Изучение морфофизиологических свойств выделенных штаммов, отработка условий их культивирования, оптимизация синтеза биобутанола — основные предпосылки для создания экономически целесообразного технологического процесса. Цель работы — поиск и идентификация штаммов-продуцентов биобутанола и масляной кислоты (его предшественника). Объектами исследования были микроорганизмы, выделенные из почвы и ила водоемов города Киева.

По результатам скрининга выделенных культур получены три перспективных штамма, которые идентифицированы как *C. acetobutylicum*, *C. tyrobutylicum*, *C. butylicum*. Модифицирована среда культивирования с учетом потребностей новых культур. С целью максимального накопления целевых продуктов исследованы метаболические особенности продуцентов.

Ключевые слова: биобутанол, биосинтез, АБЕ-ферментация, штаммы-продуценты.

**NEW PRODUCER STRAINS
OF BIOBUTANOL.
I. ISOLATION AND IDENTIFICATION**

*O. A. Tigunova
S. M. Shulga*

SO «Institute of Food Biotechnology
and Genomics» of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: Shulga5@i.ua

Getting new, more productive strains of microorganisms that produce butanol is a topical problem. Studying of morphological and physiological characteristics of the isolated strains, improvement of their cultivation conditions, optimization of biobutanol synthesis gives the possibility to organize a cost-effective butanol production technology. The aim of this work was searching new butanol and butyric acid producer strains, their identification and studying the main steps of the selective strains biosynthesis. The objects of this study were microorganisms that had allocated from soils and sludges samples of Kiev's lakes. Obtained cultures have been screened. Three strains were obtained as promising and identified as *C. acetobutylicum*, *C. tyrobutylicum*, *C. butylicum*. Selective medium have been developed and modified for the microorganisms. Producer's features were investigated in order to maximize the accumulation of target metabolites.

Key words: biobutanol, biosynthesis, ABE-fermentation, producer strains.