

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

СКРОЦЬКИЙ СЕРГІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ



УДК 602.4:663.18+544.431.122+543.94

**БІОТЕХНОЛОГІЯ ПРЕПАРАТУ ПРЯМОГО ВНЕСЕННЯ ДЛЯ АКТИВАЦІЇ
АЦЕТОНО-БУТИЛОВОГО БРОДІННЯ
*03.00.20 – біотехнологія***

**АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук**

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, академік НАН України **Підгорський Валентин Степанович**, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, директор, завідувач відділу фізіології промислових мікроорганізмів.

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, старший науковий співробітник **Даниленко Світлана Григорівна**, Інститут продовольчих ресурсів НААН України, завідувачка відділу біотехнології

доктор технічних наук, доцент **Тодосійчук Тетяна Сергіївна**, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, завідувачка кафедри промислової біотехнології

Захист відбудеться «23» вересня 2020 р. о 15⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.058.03 Національного університету харчових технологій за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 68, корпус А , аудиторія А- 311.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного університету харчових технологій за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 68.

Автореферат розісланий « 21 » серпня 2020 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради, кандидат технічних наук, доцент



Н. М. Ющенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ацетоно-бутилові бактерії (АББ) і процеси отримання при їх використанні органічних кислот та розчинників вивчають більше 100 років. Та актуальність цих питань з часом не знижується, а, навпаки, зростає. Про це свідчить ряд сучасних досліджень і активне обговорення їх у науковій літературі.

Сьогодні надзвичайно важливим є питання збільшення використання екологічного біопалива. Один з найперспективніших шляхів його отримання – використання бутанолу. Проте існуюча традиційна технологія виробництва бутанолу досить складна для її впровадження, адже по своїй суті поєднує в собі два технологічних напрямки. Один – біотехнологія мікробного синтезу для підтримання мікроорганізмів – продуцентів розчинників та накопичення достатньої кількості біомаси, що необхідна для ефективного проведення подальшого процесу бродіння. Інший – це безпосередньо біотехнологія зброджування субстратів та виділення цільових продуктів.

Схожі проблеми донедавна існували і в інших біотехнологіях з використанням мікроорганізмів, зокрема у виробництві молочнокислих продуктів, етилового спирту, виноробстві. Сьогодні на галузевих підприємствах (молочних, спиртових та виноробних) для отримання кінцевих продуктів ефективно використовують технології прямого внесення готових до використання бактеріологічних концентратів із специфічною активністю, які виготовляються на спеціалізованих біотехнологічних підприємствах. Використання готових до застосування бактеріологічних концентратів прямого внесення дозволило значно знизити фінансові затрати та спростити організацію технологій кінцевих продуктів, що стимулювало розвиток галузей. Цілком зрозуміло, що і для широкого впровадження виробництва бутанолу значний поштовх дасть наявність концентратів ацетоно-бутилових бактерій (КАББ) прямого внесення для активації процесу бродіння. Їх використання забезпечить значне спрощення технології зброджування, яка буде обмежуватись тільки внесенням готового концентрату мікроорганізмів у підготований субстрат, підтримкою умов зброджування і виділення основного продукту. Відсутність необхідності у проведенні складних мікробіологічних процесів, організації біотехнологій мікробного синтезу, необхідності залучення вузькопрофільних спеціалістів та використання спеціалізованого біотехнологічного обладнання зробить технологію екологічного біопалива значно дешевшою та простішою. Тому проведення досліджень, спрямованих на створення готових для використання форм біопрепарату – КАББ прямого внесення для активації процесу бродіння та розробка технології його отримання – надзвичайно важливі умови активного прогресу технологій екологічного біопалива.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана відповідно до планів по темах «Молочнокислі бактерії, актинобактерії, дріжджі: таксономічні дослідження, біологічні властивості та біосинтетична активність перспективних для промисловості штамів мікроорганізмів» (2009-

2013р.), «Різноманіття, фізіолого-біохімічні і генетичні властивості та біотехнологічний потенціал промислово-важливих штамів бактерій та дріжджів» (2014-2018 рр.) та у рамках проекту (ДР № 0115U004278) цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Розробка наукових основ ефективних біотехнологій отримання рідких біопалив з органовмісних відходів із використанням наноматеріалів» (2015-2019 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи була розробка технології біопрепарату прямого внесення для активації ацетоно-бутилового бродіння на основі виділених високоактивних продуцентів органічних кислот та розчинників.

Для виконання роботи необхідно було виконати такі завдання:

- виділити з природніх джерел мікроорганізми – продуценти бутанолу, ацетону, етанолу та відібрати найактивніші штами, провести їх ідентифікацію
- дослідити ефективність зброджування активними ацетоно-бутиловими штамами мікроорганізмів традиційних та альтернативних субстратів, які є забруднювачами навколишнього середовища;
- підібрати склад поживних середовищ для виділених клостридій, які забезпечують максимальну концентрацію клітин;
- оптимізувати склад концентрату ацетоно-бутилових бактерій (КАББ) прямого внесення для активації процесу бродіння та визначити доцільність сумісного використання штамів;
- раціоналізувати технологічні умови використання створеного КАББ прямого внесення для активації процесу бродіння, перевірити доцільність використання методики двохстадійного зброджування;
- визначити можливість використання наночасток металів для підвищення синтезу розчинників та збільшення стійкості до них;
- дослідити технологічну ефективність використання іммобілізації клітин бактерійного концентрату;
- показати економічну ефективність та соціальну значимість використання створеного біопрепарату прямого внесення;
- розробити ефективну технологію концентрату ацетоно-бутилових бактерій прямого внесення для активації процесу бродіння в оптимальних формах його випуску, розробити технологічну документацію та провести промислову апробацію створеної технології.

Об'єкт дослідження – моноштами ацетоно-бутилових бактерій *Clostridium beijerinckii* IMB В-7701, *C. beijerinckii* IMB В-7806, *C. acetobutylicum* IMB В-7807, концентрат ацетоно-бутилових бактерій прямого внесення для активації процесу бродіння, наночастки Fe_3O_4 , $GdVO_4$, GdO , CeO_2 , Ag_2O , Au_2O , альгінатні гранули.

Предмет дослідження – технологія отримання ефективного концентрату ацетоно-бутилових бактерій (КАББ) прямого внесення для активації процесу бродіння.

Методи дослідження. Під час виконання дисертаційної роботи використовували біотехнологічні, фізико-хімічні, біохімічні, мікробіологічні молекулярно-генетичні, математичні методи досліджень.

Наукова новизна отриманих результатів. З різних екологічних джерел виділені бактерії – продуценти розчинників (ацетону, бутанолу, етанолу) та органічних кислот, які віднесено до роду *Clostridium*. На основі аналізу гену 16S рРНК встановлено їх належність до видів *Clostridium beijerinckii* та *Clostridium acetobutylicum*, інформацію занесено у базу даних GenBank.

Встановлено можливість заміни зернових субстратів високої вартості для синтезу бутанолу та органічних кислот *C. beijerinckii* ІМВ В-7806, *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 та *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807 на відходи промисловості, які є масовими забруднювачами навколишнього середовища (курячий послід, молочна сироватка). Виявлено, що найвища концентрація бутанолу (9,2 г/дм³) синтезувалась на середовищі з курячим послідом та молочною сироваткою у співвідношенні 3:7 за сухими речовинами.

Доведено ефективність сумісного використання *C. beijerinckii* ІМВ В-7806, *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 та *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807 в порівнянні з використанням вказаних моноштамів. Встановлено збільшення синтезу бутанолу при сумісному використанні продуцентів порівняно з монокультурами: на 17 % від *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807 та на 21 % від *C. beijerinckii* ІМВ В-7701. Зменшено тривалість бродіння при сумісному використанні продуцентів на 28%.

Доведено доцільність застосування методу двохстадійного внесення штамів: І стадія – *C. beijerinckii* ІМВ В-7806 та *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 для активації процесу зброджування; ІІ стадія – при досягненні рН 4,5 (закінчення ацидогенної стадії бродіння) – *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807 для підвищення ефективності бродіння.

Вперше було вивчено вплив наночасток Fe₃O₄, GdVO₄, GdO, CeO₂, Ag₂O, Au₂O на бактерії роду *Clostridium*. Показано зміну морфології клітин при їх взаємодії з наночастками. Виявлено штам-специфічний вплив наночасток на синтез продуктів бродіння.

Доведено можливість та значну ефективність використання альгінату натрію для іммобілізації *C. beijerinckii* ІМВ В-7806, *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 та *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807. При використанні іммобілізованих клітин для зброджування субстратів синтез бутанолу збільшується на 26 % в порівнянні з вільними клітинами.

Практичне значення отриманих результатів. Три штами клостридій, що є активними продуцентами розчинників (*C. beijerinckii* – 2 штами, *C. acetobutylicum* – 1 штамп), задепоновано та отримано свідоцтва про депонування у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номерами ІМВ В-7806, ІМВ В-7701, ІМВ В-7807. Отримано також заключення Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України про їх

непатогенність. Штами захищені патентами на корисну модель № 137353 (2019), №137354 (2019), № 137659 (2019).

Вперше для ацетоно-бутилового зброджування субстратів запропоновано використання бактерійного концентрату прямого внесення, який не потребує спеціалізованої мікробіологічної підготовки для використання і може бути безпосередньо внесений у субстрат у рідкій або сухій гранульованій формах. Доведено доцільність використання концентрату ацетоно-бутилових бактерій прямого внесення для вирішення проблеми утилізації курячого посліду і молочної сироватки з одночасним отриманням дешевих продуктів бродіння.

Розроблено технологію виготовлення зручної для використання, транспортування та зберігання форми випуску КАББ прямого внесення – альгінатні гранули. На основі розробленої технології створено тимчасовий технологічний регламент виробництва КАББ, визначена собівартість рідкої і сухої форм випуску даного препарату та показано соціально-економічний ефект від впровадження КАББ. Технологія отримання КАББ апробована на базі біотехнологічного модуля ІМВ НАНУ. Її ефективність підтверджено актом апробації. Використання КАББ для зброджування субстратів було перевірено на дослідній установці ТОВ «ПРОММАШСЕРВІС». Переваги нової технології ацетоно-бутилового бродіння над класичною та доцільність використання КАББ у бродильних установках підтверджено Актом апробації.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Здобувачем проведено аналіз вітчизняних та іноземних літературних джерел з даної тематики, підготовлено та написано наукові статті, узагальнено отримані експериментальні дані, проведено їх порівняльний аналіз з даними літератури, сформульовано висновки щодо результатів роботи. Проведено експерименти з виділення, очищення та ідентифікації нових продуцентів бутанолу, визначено фізіолого-біохімічні особливості окремих штамів роду *Clostridium*. Підібрано штамовий склад КАББ прямого внесення. Експериментально визначено можливість зброджування курячого посліду та молочної сироватки. Досліджено вплив наночасток на моноштами ацетоно-бутилових бактерій. Визначено на основі експериментів технологічні параметри отримання сухих альгінатних гранул як ефективної форми випуску КАББ. Розроблено тимчасовий технологічний регламент отримання КАББ та показано соціально-економічний ефект від впровадження розробленого продукту.

Визначення органічних кислот та розчинників проводилось спільно з к.б.н. М.А. Хархотою, генетичні дослідження – з участю к.б.н. Л.Б. Зеленої. Роботи з наночастками та статистичні дослідження проводили спільно з к.б.н. С.І. Войчуком. Ідентифікацію мікроорганізмів за фізіолого-біохімічними ознаками виконували у взаємодії з к.б.н. О.М. Василюк та к.б.н. Л.А. Хоменко.

Вибір об'єктів і напрямку досліджень, планування експериментальних робіт, аналіз отриманих даних, підготовку публікацій, розробку структури дисертаційної

роботи здійснювали при безпосередній участі наукового керівника акад. НАН України, д.б.н. Підгорського Валентина Степановича.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на міжнародній науково-практичній конференції «Новітні технології, обладнання, безпека та якість харчових продуктів: сьогодення та перспективи» (м. Київ, Україна, 2010 р.), VI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (м. Київ, Україна, 2012 р.), 16-тій міжнародній Пуцинській школі-конференції молодих учених «Биология – наука XXI века» (м. Пуціно, РФ, 2012 р.), міжнародній молодіжній науковій конференції з природничих та технічних наук «Научному прогресу – творчество молодых» (м. Йошкар-Ола, РФ, 2013р.), XIII з'їзді Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського. (м. Ялта, Україна 2013 р.), XV з'їзді Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (м. Одеса, Україна, 2017 р).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць. Із них 5 статей – у фахових виданнях України, 6-у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз; 1 стаття – у інших наукових виданнях та 6 тез доповідей у матеріалах всеукраїнських та міжнародних конференцій. Отримано 3 патенти на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Робота складається з 182 сторінок машинописного тексту, включає 29 рисунків та 24 таблиці; список літератури нараховує 175 літературних джерел (із них 118 іноземних авторів). До дисертаційної роботи входять додатки: А – Свідоцтва про депонування штамів роду *Clostridium* у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номерами ІМВ В-7806, ІМВ В-7701, ІМВ В-7807; Б – патенти на корисну модель на штами мікроорганізмів, що складають КАББ № 137353 (2019), №137354 (2019), № 137659 (2019); В – тимчасовий технологічний регламент (62 сторінки машинописного тексту, 12 таблиць, 4 креслення формату А3); Д – дані про собівартість рідкої і сухої форм випуску даного препарату та соціально-економічний ефект від впровадження КАББ (18 сторінок машинописного тексту, 7 таблиць); Е – Акт апробації технології виготовлення концентрату ацетоно-бутилових бактерій (17 сторінок машинописного тексту, 8 таблиць); Ж – акт апробації використання концентрату ацетоно-бутилових бактерій для зброджування субстратів (9 сторінок машинописного тексту, 4 таблиці); З – Список публікацій здобувача, опублікованих за темою дисертації.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** надано обґрунтування теми дисертації, розкрито зв'язок теми дисертаційної роботи з науковими програмами, сформульовано мету і основні завдання, названо предмет, об'єкти, методи досліджень, визначено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів та особистий внесок автора.

Розділ 1 Ацетоно-бутилове бродіння – ефективний метод отримання відновлюваної енергії. Наведено та проаналізовано вітчизняні і зарубіжні літературні дані щодо розвитку досліджень у галузі отримання екологічно чистих біопалив, зокрема бутанолу. Визначені основні лімітуючі фактори біосинтезу основного продукту бродіння, що були досліджені різними авторами. Проаналізовано дані літератури про використання традиційних і альтернативних субстратів для ацетон-бутанол-етанол (АБЕ) збродження та технологічні аспекти їх використання. Вивчено літературні дані щодо методів підвищення ефективності ацетоно-бутилових бактерій. Проаналізовано організаційно-технологічні чинники, що ускладнюють широке впровадження ацетоно-бутилових технологій у виробництво.

Розділ 2 Об'єкти і методи досліджень

Об'єкти досліджень. Окремі штами ацетоно-бутилових бактерій *C. beijerinckii* ІМВ В-7701, *C. beijerinckii* ІМВ В-7806, *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807, які виділено, ідентифіковано та задепоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України; концентрат ацетоно-бутилових бактерій (КАББ) прямого внесення; наночастки Fe_3O_4 , GdVO_4 , GdO , CeO_2 , Ag_2O , Au_2O ; альгінатний гель, гранули альгінатні.

Ізоляція та підготовка зразків для виділення спорових мікроорганізмів. Для накопичення та виділення ацетоно-бутилових бактерій використовували картопляне середовище такого складу (г/дм³): картопля – 200,0; глюкоза – 5,0; сульфат амонію – 1,0; карбонат кальцію – 3,0; водопровідна вода (Антипчук та інші., 2003). Попередній відбір АББ проводили візуально за критеріями: виділення вуглекислого газу, розрідження середовища, загальне освітлення середовища.

Виділення чистих культур мікроорганізмів, що викликають ацетоно-бутилове бродіння. Чисті культури ізолювали, використовуючи синтетичне напіврідке агаризоване середовище такого складу (г/дм³): пептон – 10,0; дріжджовий екстракт – 3,0; розчинний крохмаль – 1,0; хлорид натрію – 5,0; гідрохлорид цистеїну – 0,5; глюкоза – 5,0; оцтовокислий натрій – 3,0; агар – 5,0; вода дистильована. Культивування АББ проводили при 37°C 24-48 год в анаеробних умовах, у герметичній камері з використанням анаеробних систем GenBox (BioMerieux, Франція).

Для підтримки бактеріальних клітин в активній фазі росту їх культивували на тіогліколевому поживному середовищі, що мало такий склад г/дм³: триптон – 15,0, дріжджовий екстракт – 5,0, глюкоза – 5,5, натрій хлорид – 2,5, L-цистеїн – 0,5, натрій тіогліколят – 0,5, натрій резазурин – 0,0001, агар-агар – 15,0, рН 7,1±0,2. (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Індія).

Ідентифікація, систематизація мікроорганізмів- продуцентів бутанолу. Ідентифікацію культур проводили за визначниками Бергі (Берджі, 1980). Для порівняльних досліджень при встановленні систематичного положення культур, як еталонні, використовували дані щодо типових штамів (Keis et al., 1995; McCoу

et al. 1926). Культурально-морфологічні ознаки АББ вивчали загальновідомими методами (Лабинская, 1972; Звягинцев, 1991; Селибер, 1962). Визначення нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК та філогенетичний аналіз проводили згідно з методиками, наведеними у роботах (Lane D., 1991).

Субстрати для ацетоно-бутилового бродіння. Для дослідження ефективності зброджування використовували 8 % затори (ячмінний, житній, вівсяний, кукурудзяний, соєвий) та поживне середовище на основі КМЦ (карбоксиметилцелюлози) такого складу (г/дм³): КМЦ – 30,0, соєве борошно – 40,0; екстракт дріжджовий – 0,4; І-цистеїн – 0,3. Середовище Рушмана (г/дм³): картопля – 200,0; глюкоза – 5,0; сульфат амонію – 1,0; карбонат кальцію – 3,0; водопровідна вода. Підготовку курячого посліду та молочної сироватки проводили за однією методикою: з єдиної партії сухого (курячого посліду або молочної сироватки) брали наважку, заливали дистильованою водою, нагрітою до 100 °С (з розрахунку 80 г/дм³). При підготуванні комплексного середовища курячий послід/молочна сироватка 3/7 брали наважки: 24 г/дм³ курячого посліду і 56 г/дм³ молочної сироватки. Упродовж 1,5 год проводили екстракцію при 60 °С, безперервно помішуючи (Ястремська та інші, 2010). Отриманий об'єм суспензії розливали у флакони або колби по 50-100 см³ та стерилізували при 0,15 МПа 30 хвилин. Після стерилізації вимірювали інтенсивність кольору та рН.

Культивування АББ та отримання концентрату ацетоно-бутилових бактерій. КАББ отримували методом роздільного глибинного культивування моноштамів в анаеробних умовах та наступного змішування їх безпосередньо перед використанням. Штам *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 культивували на середовищі такого складу (г/дм³): послід курячий сухий – 24; сироватка молочна суха – 56; екстракт дріжджовий – 3; І-цистеїн – 0,5. Штам *C. beijerinckii* ІМВ В-7806 культивували на середовищі, яке мало такий склад (г/дм³): КМЦ – 30, борошно соєве – 40; екстракт дріжджовий – 0,4; І-цистеїн – 0,3. Культивування штаму *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807 проводили на 8 % житньому заторі.

Проведення зброджування субстратів методом «двохстадійного» внесення культур. Для проведення двохстадійного зброджування в підготований субстрат вносили культури КАББ – *C. beijerinckii* ІМВ В-7806 та *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 (50/50 %) – у вигляді культуральної рідини 1 об.% та у 0,1 об.% у вигляді сухих альгінатних гранул. При досягненні в процесі бродіння значення рН-4,5 додавали еквівалентну кількість *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807.

Визначення параметрів росту та сольвентогенних властивостей при сумісному та роздільному культивуванні штамів. Оптичну густину бактеріальної суспензії вимірювали нефелометричним методом за допомогою спектрофотометра Specord M-40 (Carl Zeiss, Jena, Німеччина). Для визначення токсичної концентрації бутирату та н-бутанолу на бродильну активність бактерій до зразків, що досліджувались, вносили такі робочі концентрації бутанолу: 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 і 2,0 %. Бутанол (SigmaAldrich Chemie GmbH, Німеччина). Додавали його безпосередньо перед внесенням бактеріальних клітин.

Визначення продуктів ацетоно-бутилового бродіння. Для якісного визначення ацетону використовували реакцію-конденсації фенілгідразинів з кетонами з утворенням фенілгідрозонів. Визначення розчинників бутанолу, етанолу, ацетону проводили двома методами. Перший – окиснення бутанолу, етанолу та ацетону, розроблений Б.М. Нахмановичем. Другий – за допомогою газорідного хроматографа. Кількісне визначення коротколанцюгових жирних кислот вивчали методом газової хромато-мас-спектрометрії на приладі Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, USA).

Імобілізація мікроорганізмів АББ в структуру кальцій-альгінатного полімеру. Імобілізацію мікроорганізмів проводили в кальцій-альгінатному полімері. Визначення вологості гранул здійснювали при їх висушуванні до постійної маси. Статистична обробка експериментальних даних була зроблена за допомогою програми Microsoft Excel.

Розділ 3 Виділення з природних джерел та ідентифікація мікроорганізмів – продуцентів органічних кислот, бутанолу, етанолу та ацетону. Відібрано 86 зразків ізолятів сольвентогенних бактерій з різних екоджерел: річковий мул, чорнозем, польовий і лісовий ґрунти, торф, активний мул очисних споруд, гній великої рогатої худоби та курячий послід.

За здатністю продукувати розчинники відібрані 12 активних штамів, які за морфолого-культуральними ознаками віднесені до роду *Clostridium*. Високу сольвентогенну продуктивність та резистентність до бутанолу в концентрації 1,5-1,7 % проявили 5 штамів (В3, Г2, А3, Ж1, 10). Активні штами (В та 10) продукували н-бутанол у концентрації 10,0-11,7 г/дм³, а решта штамів – 7,1-8,3 г/дм³. Ацетон синтезували всі штами у межах 4,0-6,0 г/дм³, а етанол – 0,8-2,2 г/дм³ (рис. 1).

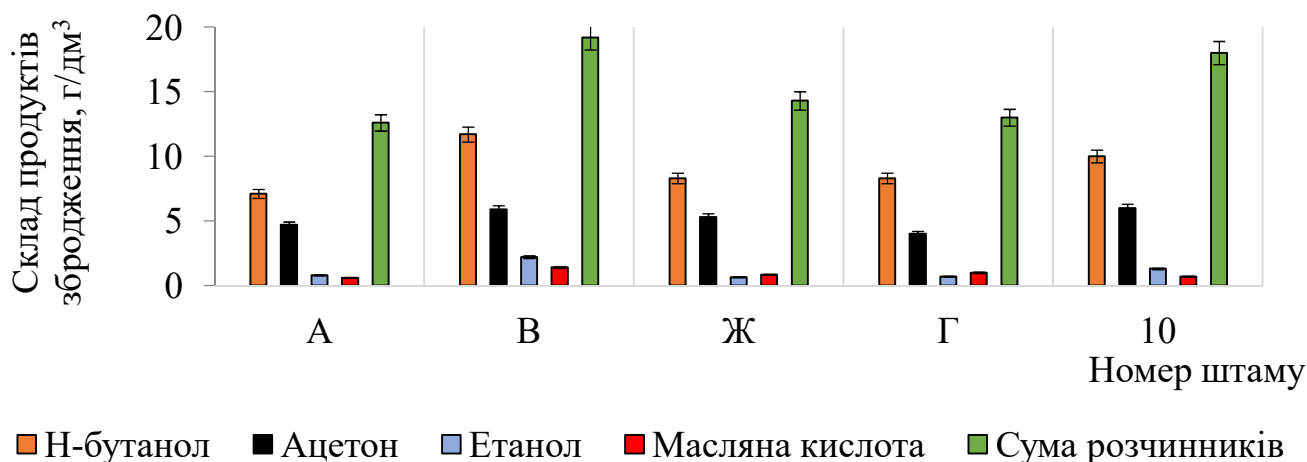


Рисунок 1 – Синтез розчинників природними ізолятами роду *Clostridium* у результаті АБЕ бродіння на тіогліколевому середовищі

На основі аналізу гена 16S рРНК встановлено належність активних штамів до видів *Clostridium beijerinckii* і *Clostridium acetobutylicum* (табл.1, рис. 2).

Таблиця 1 – Видова приналежність досліджуваних штамів та їх номер в GenBank та депозитарії

Робочий номер штаму	Видова назва	Номер депозитарію ІМВ (ІМВ В)	Номер GenBank (аналіз нуклеотидної послідовності 16S рРНК)
А	<i>Clostridium beijerinkii</i>	7806	МК463633 (МК463635)
Г	<i>Clostridium beijerinkii</i>	7701	MN006695 (MN006702)
Ж	<i>Clostridium beijerinkii</i>	7702	MN006696 (MN006703)
В	<i>Clostridium beijerinkii</i>	7851	MN749359(MN759358)
10	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	7807	МК463632 (МК463634)

Штами депоновано в Депозитарії мікроорганізмів ІМВ НАНУ та їх нуклеотидні послідовності внесені до GenBank.

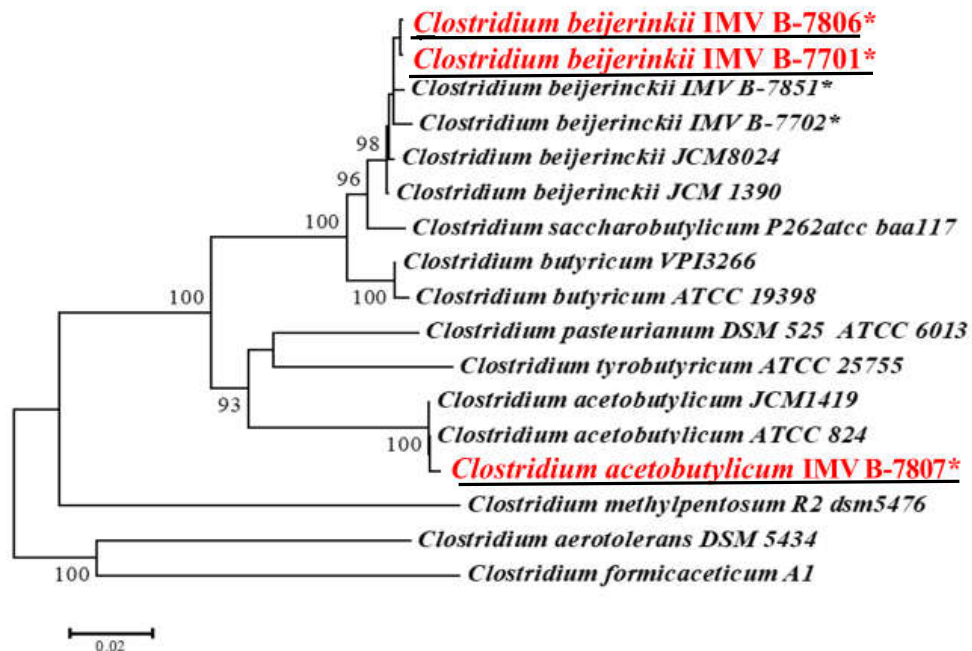


Рисунок 2 – Дендрограма філогенетичних зв'язків між штамми, що досліджувались, та типовими штамми бактерій роду *Clostridium*. (Цифрами вказана статистична достовірність точки розгалуження, визначена за допомогою бутстреп-аналізу (* - позначені виділені штамми))

Розділ 4 Ефективність застосування субстратів для ацетоно-бутилового бродіння. У процесі досліджень відібрано 3 штамми (*C. beijerinkii* ІМВ В-7701, *C. beijerinkii* ІМВ В-7701, *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807), які активно синтезували розчинники як на традиційних субстратах, так і на альтернативних – курячому посліді та молочній сироватці (рис. 3 - 4).

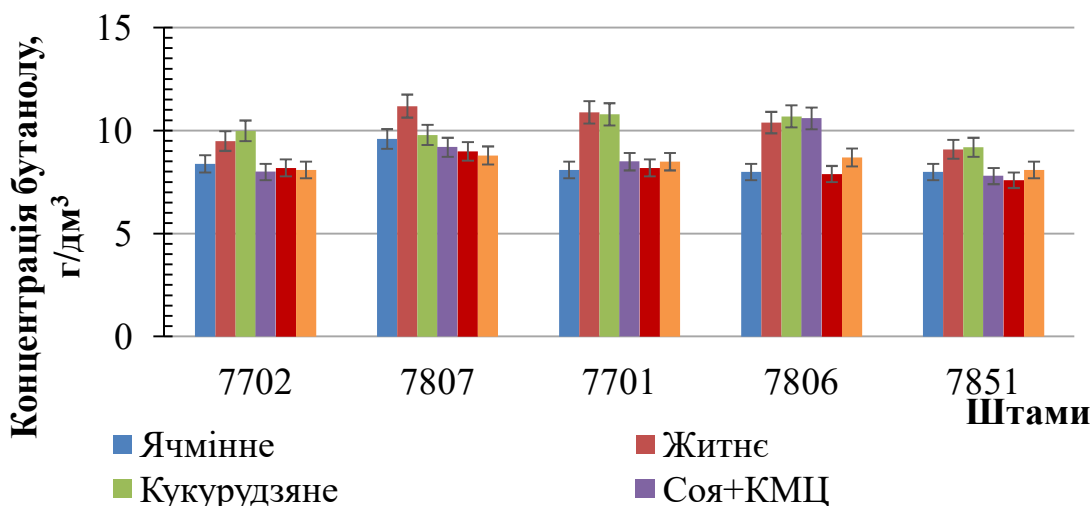


Рисунок 3 – Концентрація бутанолу на природних поживних середовищах

Встановлено оптимальне співвідношення курячого посліду та молочної сироватки (3:7) для отримання максимальної кількості розчинників. Виявлено, що виділені активні штами АББ мають виражену як видову, так і штамову специфічність по відношенню до різних субстратів. З метою створення препарату для активації АБЕ бродіння підібрано оптимальне середовище, на якому спостерігали найбільшу концентрацію бактерій (КУО/см³) для кожного штаму.

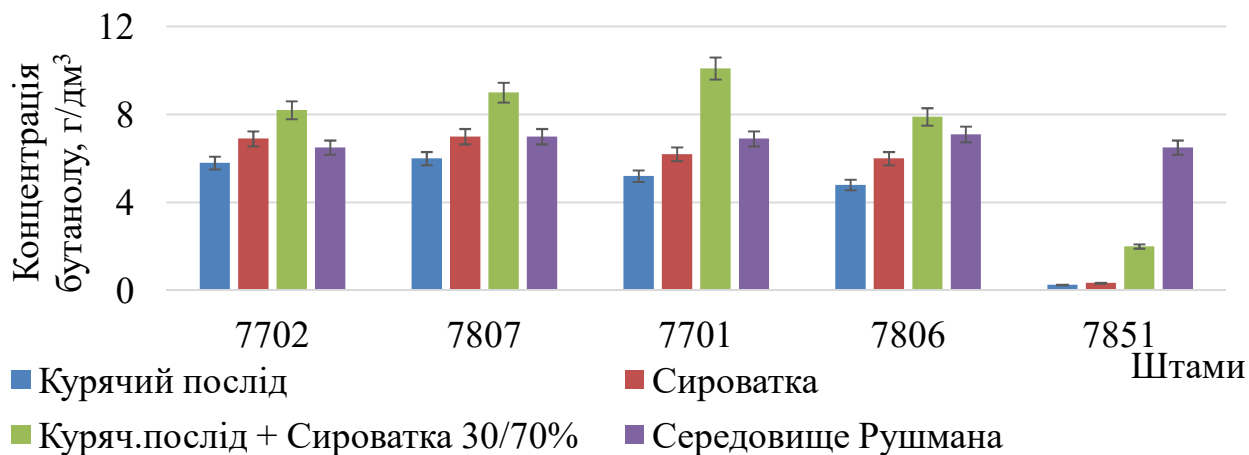


Рисунок 4 – Синтез бутанолу на молочній сироватці та курячому посліді

Для кожного штаму підібрані оптимальні за концентрацією клітин середовища. Для *S. beijerinckii* IMB В – 7701 – це середовище на основі молочної сироватки/курячого посліду(7/3); для *S. beijerinckii* IMB В - 7806 – середовище на основі КМЦ/соєве борошно; для *S. acetobutylicum* IMB В - 7807 – традиційне середовище (житній затор).

Розділ 5 Штамовий склад та особливості використання концентрату ацетоно-бутилових бактерій прямого внесення. Для визначення максимально ефективного складу КАББ та способу внесення препарату (табл. 2) здійснювали порівняння сольвентогенної активності найактивніших монокультур при їх окремому та сумісному використанні (табл. 3).

Таблиця 2 – Підбір складу та способу використання бактерійного концентрату прямого внесення для активації процесу АБЕ бродіння

Варіант	Склад препарату та спосіб внесення
1	Монокультура – <i>C. beijerinckii</i> IMB B - 7701
2	Монокультура – <i>C. beijerinckii</i> IMB B - 7806
3	Монокультура – <i>C. acetobutylicum</i> IMB B - 7807
4	Сумісне використання: одночасне внесення трьох штамів <i>C. beijerinckii</i> IMB B - 7806, <i>C. beijerinckii</i> IMB B - 7701, <i>C. acetobutylicum</i> IMB B - 7807
5	Метод двохстадійного внесення: I стадія бродіння – одночасне внесення двох штамів <i>C. beijerinckii</i> IMB B - 7806 та <i>C. beijerinckii</i> IMB B - 7701; II стадія бродіння – внесення <i>C. acetobutylicum</i> IMB B - 7807

Проведені дослідження сольвентогенної активності показали, що сумісне використання штамів збільшує вихід розчинників порівняно із монокультурами (табл. 3).

Таблиця 3 – Продуктивність біосинтезу розчинників клостридіями при культивуванні на житньому заторі (8%) та молочній сироватці з курячим послідом

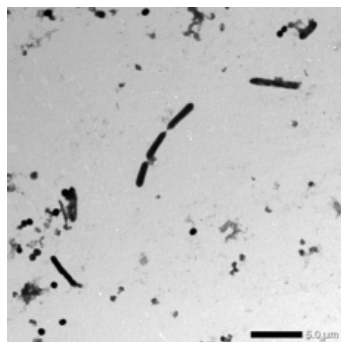
Варіант*	Час зброджування год.	Розчинники, г/дм ³	Продуктивність н-бутанолу, г/дм ³ /год	Продуктивність розчинників, г/дм ³ /год
на житньому заторі (8%)				
1	53,50±5,51	11,93±0,38	0,19±0,02	0,22±0,02
2	65,50±5,51	13,58±0,95	0,13±0,02	0,20±0,01
3	66,00±5,16	18,60±1,14	0,17±0,02	0,28±0,03
4	54,25±3,30	19,43±1,35	0,22±0,03	0,36±0,04
5	43,50±5,00	21,33±1,24	0,31±0,05	0,50±0,08
на молочній сироватці з курячим послідом				
1	69,00±7,75	8,60±0,27	0,12±0,01	0,13±0,02
2	71,00±2,58	12,38±0,45	0,1±0,03	0,18±0,01
3	69,00±2,58	13,08±0,59	0,13±0,03	0,19±0,02
4	60,25±1,71	15,60±0,12	0,16±0,02	0,26±0,01
5	49,50±1,91	16,70±0,54	0,21±0,02	0,34±0,01

Примітка: * – склад препарату та спосіб внесення (табл. 2)

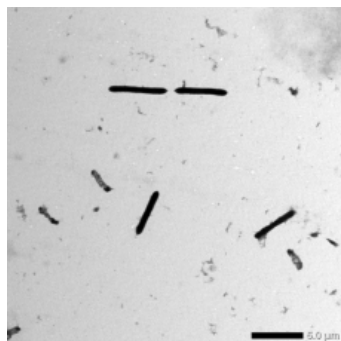
Продуктивність синтезу розчинників при двохстадійному внесенні (варіант 5) у порівнянні з найактивнішим моноштамом (варіант 3) була на 44 % вищою при використанні обох субстратів (табл. 3). Отже максимально ефективним для активації процесу бродіння є використання концентрату (КАББ), що складається з 3-ох штамів: *C. beijerinckii* IMB В - 7701, *C. beijerinckii* IMB В - 7806 та *C. acetobutylicum* IMB В - 7807 при умові двохстадійного внесення цих культур.

Розділ 6 Наночастки металів – потенційні фактори підвищення біологічної активності ацетоно-бутилових бактерій. Для вивчення впливу наночастинок (НЧ) на АББ (ацетоно-бутилові бактерії) були проведені дослідження морфологічних змін вегетативних клітин та спор при їх взаємодії з наночастинами. Вперше було доведено взаємодію досліджуваних наночастинок з клостридіями. Відзначені візуальні зміни як у вегетативних клітинах, так і в спорах (смуґасті, помітні включення) (рис. 5).

***C. acetobutylicum*
IMB В-7807**

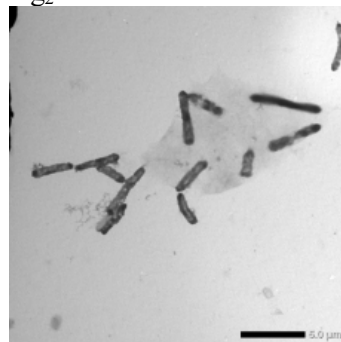


***C. beijerinckii*
IMB В-7806**

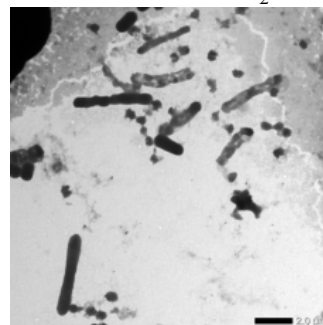


***C. acetobutylicum* IMB В-7807 при взаємодії з наночастинами**

Ag_2O

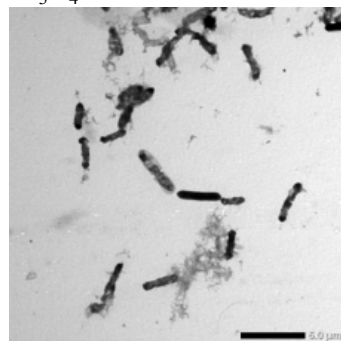


CeO_2



***C. beijerinckii* IMB В-7806 при взаємодії з наночастинами**

Fe_3O_4



$GdVO_4$

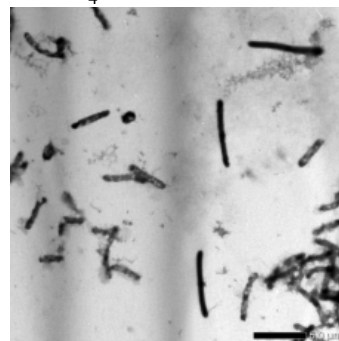


Рисунок 5 – Електронна мікроскопія клітин та спор штамів *C. acetobutylicum* IMB В-7807 та *C. beijerinckii* IMB В-7806 з використанням наночастинок та при їх відсутності. Смуга 5 μm. Збільшення × 80 000

Вперше показано вплив наночастинок на процес АБЕ-бродиння. Було встановлено, що наночастки в мінімальній наномолярній концентрації 0,1 η М стимулюють біосинтез бутанолу та загальну кількість розчинників. Виявлено збільшення виходу бутанолу при застосуванні наночастинок Fe_3O_4 , CeO_2 , Au_2O в середньому на 12 %, а наночастинок Ag_2O – на 23 %. Отримані результати взаємодії наночастинок з клостридіями вказують на існування певних штамових особливостей, які, ймовірно, полягають у відмінності особливих ферментних систем у різних видів (штамів) мікроорганізмів.

Визначено ефект збільшення стійкості до дії високих концентрацій бутирату при застосуванні наночастинок CeO_2 в концентрації 0,1 η М. Зокрема у досліджуваних штаммах зростає стійкість до бутирату на 16 %, а до токсичної дії бутанолу – на 24%. Збільшення концентрацій наночастинок до 10 η М знижувало резистентність бактерій, а іноді навіть впливало на збільшення токсичності порівняно з контрольними зразками. Очевидно, що НЧ можуть брати безпосередню або ж опосередковану участь у певних ферментативних реакціях і виступати в ролі каталізаторів, медіаторів, тощо. Вплив НЧ на процес АБЕ-бродиння потребує подальшого дослідження, що дозволить розробити теорію, яка б пояснила їх біологічну дію на даний процес.

Розділ 7 Імобілізація мікроорганізмів бактерійного концентрату (КАББ) прямого внесення шляхом включення в структуру альгінатного гелю. Застосування технологічної стадії гранулювання дозволяє відмовитись від технологічної стадії концентрування біомаси, що потребує використання спеціалізованого обладнання – установки ультрафільтрації, сепараторів, фільтрів, сублімаційних та розпилювальних сушарок, тощо. Суха гранульована форма випуску КАББ є зручною та ефективною у зберіганні, логістиці та використанні, а також значно підвищує ефективність препарату та його стійкість до токсичної дії продуктів бродиння. Гранулювання біомаси клостридій проводили методом іммобілізації живих клітин у натрій-альгінатний гель з наступним його розпиленням у розчин хлориду кальцію для полімеризації утворених краплин (рис. 6). Для проведення процесу гранулювання було розроблено та створено пілотну установку. Отримані гранули висушували у конвективній сушарці при температурі 45 °С.

Пошук оптимальної для гранулювання концентрації носія (альгінату натрію) і осаджувача (хлориду кальцію) показав, що при концентрації носія 20 $\text{г}/\text{дм}^3$ та одночасному використанні осаджувача в концентрації 5 $\text{г}/\text{дм}^3$ показники часу початку бродиння не відрізнялися від використання інтактних клітин. Встановлено, що при діаметрі гранули 1 мм відбувається найбільш ефективно накопичення розчинників (ацетон, етанол, бутанол) – $24,0 \pm 1,2 \text{ г}/\text{дм}^3$. Даний розмір є оптимальним для гранульованої форми випуску КАББ (рис. 7). Дослідження стадії концентрування монокультур, що входять до складу КАББ, показали, що на стадії отримання «вологих» гранул досягався ефект концентрування біомаси в 7-9 разів.



Рисунок 6 - Схема отримання кальцій-альгінатних гранул з кластридіями

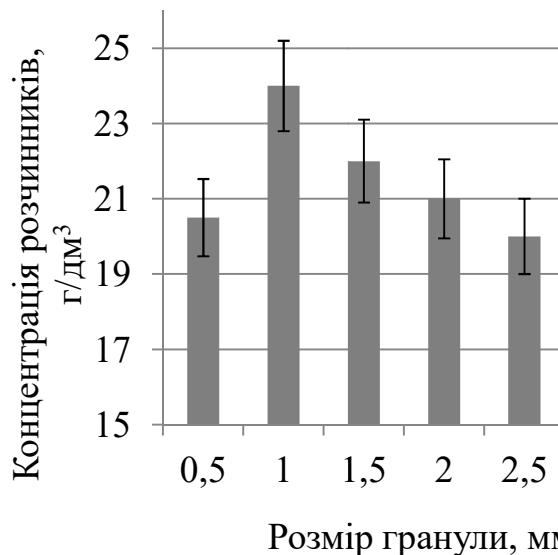


Рисунок 7 - Вплив розміру альгінатної гранули на сольвентогенну активність бактерій

При цьому зниження концентрації життєздатних кластридій не перевищувало 12 %, а після висушування – 10 %. Слід зазначити, що ознак деструкції щільного середовища на основі альгінату натрію мікроорганізмами КААБ та токсичного впливу альгінату на мікроорганізми не виявлено.

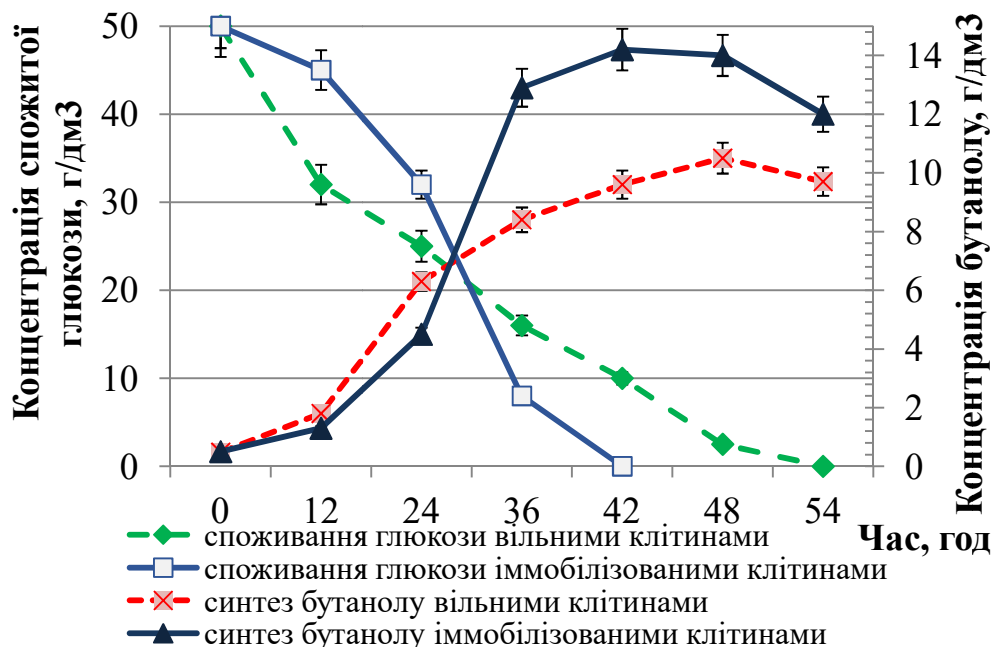


Рисунок 8 - Синтез бутанолу та споживання глюкози іммобілізованими та вільними клітинами КААБ

При застосуванні гранульованого препарату КАББ (рис. 8) синтез бутанолу становить – $14,2 \pm 0,71$ г/дм³, а при використанні неімобілізованих клітин – на 26 % менше. Необхідно зазначити, що споживання глюкози при використанні гранул КАББ проходить швидше, і вже на 42 годину росту цей субстрат споживається повністю. Отже отримання високої концентрації клітин клостридій, додатковий захист від токсичних факторів, покращення умов логістики та збільшення строків зберігання препарату доводять доцільність та високу ефективність використання і сухої гранульованої форми КАББ.

Розділ 8 Технологія концентрату ацетоно-бутилових бактерій (КАББ) прямого внесення. На основі одержаних експериментальних даних розроблено технологію одержання концентрату ацетоно-бутилових бактерій (КАББ) для активації процесу бродіння. Готовий препарат – рідкий або сухий гранульований концентрат АББ *C. beijerinckii* ІМВ В-7701, *C. beijerinckii* ІМВ В-7806 та *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807, що розфасовані в окрему для кожної монокультури тару. Для зброджування попередньо підготовленого субстрату в нього необхідно вносили по 0,5 об.% рідкої форми або по 0,05 об.% сухих гранул концентратів культур *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 та *C. beijerinckii* ІМВ В-7806. При досягненні, в процесі бродіння значень рН 4,5 додавали 0,5 об.% рідкої форми або 0,05 об.% сухих гранул концентрату *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807. Перевагами застосування КАББ для отримання продуктів бродіння в порівнянні з «класичною» технологією є: менша кількість технологічних стадій (замість 5 – 2), зниження часу проходження технологічного процесу з 268 год до 60 год (в 4 рази), можливість проведення двохстадійного процесу, вищі інгібуючі концентрації бутанолу до 20-22 г/дм³ (13-15 г/дм³ при використанні «класичної» технології), наявність можливості зброджувати широкий спектр субстратів. Проведено розрахунок потужності виробництва КАББ для отримання 2 тис. т бутанолу. З врахуванням високої концентрації активних живих клітин в КАББ достатня його кількість буде складати 1,70 тис. т рідкої форми випуску. Кількість технологічних циклів – 98 рік. Культивування потрібно проводити окремо для кожної з культур. Отримання культуральної рідини за цикл складає 5,8 м³. Виходячи з техніко-економічного обґрунтування та отриманих дослідних даних, розроблено тимчасовий технологічний регламент на виробництво КАББ прямого внесення в рідкій та сухій гранульованій формах випуску. Розроблено технологічні інструкції для виконання технологічних стадій та використання отриманого біопрепарату. Розраховано соціально-економічний ефект від використання КАББ.

Було проведено апробацію розробленої технології отримання КАББ на біотехнологічному модулі ІМВ НАНУ. Результати апробації підтверджують можливість реального виготовлення концентрату ацетоно-бутилових бактерій прямого внесення (КАББ) відповідної якості за даною технологією.

Результати апробації на дослідній установці ТОВ «ВП ПРОММАШСЕРВІС» підтверджують можливість практичного застосування

КАББ прямого внесення для зброджування субстратів на основі курячого посліду та молочної сироватки.

ВИСНОВКИ

У підготовці дисертаційної роботи були проведені наукові дослідження з вивчення бродильної активності виділених природних ацетоно-бутилових мікроорганізмів. Розроблено та апробовано технологію комплексного активатора ацетоно-бутилового бродіння (КАББ) прямого внесення. Наявність такого продукту значно оптимізує технологію зброджування субстратів. Застосування КАББ спрощує технології отримання кінцевих продуктів ацетоно-бутилового бродіння та знижує вартість їх реалізації. Зникає необхідність у проведенні попередніх складних мікробіологічних та біотехнологічних процесів, у залученні вузькопрофільних спеціалістів та спеціалізованого біотехнологічного обладнання. Відповідно до аналізу результатів проведених досліджень сформульовано наступні висновки:

1. Ізольовано з різних природних джерел та відібрано 5 активних бактерій-продуцентів розчинників, що за морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними ознаками та на основі аналізу гену 16S рРНК віднесені до видів *Clostridium beijerinckii* та *Clostridium acetobutylicum*. Штами задепонували в Депозитарії мікроорганізмів, їх нуклеотидні послідовності внесли до GenBank.

2. Відібрані найактивніші штами серед виділених за сольвентогеними властивостями, для яких концентрація бутанолу на традиційних середовищах при АБЕ бродінні становила 11,2 г/дм³ (*C. acetobutylicum* ІМВ В-7807), а для штамів *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 та ІМВ В-7806 – 10,9 г/дм³ та 10,66 г/дм³. Обґрунтовано використання суміші сироватки з курячим послідом (7/3) як субстрату для АБЕ бродіння. Найбільшу кількість бутанолу на даному субстраті синтезував штам *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 – 9,2 г/дм³. Кількість цього розчинника для штамів *C. beijerinckii* ІМВ В-7806 та *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807 була нижчою – 8,4 г/дм³ та 8,2 г/дм³ відповідно.

3. Визначені оптимальні середовища для накопичення максимальної концентрації КУО найактивніших сольвентогенних штамів. Встановлено, що при концентрації КУО/см³ оптимальними поживними середовищами є: для штаму *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807 – житній затор, для штаму *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 – поживне середовище на основі молочної сироватки та курячого посліду (70/30), для штаму *C. beijerinckii* ІМВ В-7806 – середовище з КМЦ та соєвим борошном.

4. Виявлено, що застосування штамів, *C. beijerinckii* ІМВ В-7701, *C. beijerinckii* ІМВ В-7806 та *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807 за методикою двохстадійного їх внесення збільшує концентрацію кінцевого продукту бродіння бутанолу на 21% (для житнього затору) та на 27% (для курячого посліду/молочної сироватки) порівняно з використанням найактивнішого моноштаму.

5. Показано, що продуктивність біосинтезу розчинників при застосуванні методики двохстадійного внесення культур збільшувалась порівняно з монокультурами на 44%. Доведено доцільність сумісного використання вказаних штамів та запропоновано на їх основі створення концентрату ацетоно-бутилових бактерій прямого внесення для активації процесу бродіння (КАББ).

6. Вперше отримано нові дані про вплив наночастинок (Fe_3O_4 , GdVO_4 , GdO , CeO_2 , Ag_2O та Au_2O) на морфологію, здатність до синтезу розчинників та стійкості досліджених штамів до їх високих концентрацій. Встановлено штамоспецифічний вплив та визначено, що наночастки Fe_3O_4 , CeO_2 , Ag_2O підвищують резистентність мікроорганізмів до токсичної дії продуктів бродіння та можуть збільшувати синтез бутанолу на 12,2-23,0%.

7. Показано, що застосування іммобілізованих бактерій для синтезу бутанолу збільшує його концентрацію в культуральній рідині на 26 % (до $14,2 \text{ г/дм}^3$) порівняно з використанням незакріплених клостридій.

8. За результатами порівняльного аналізу технологічної ефективності створено дві зручні форми випуску для зберігання та ефективного застосування КАББ – рідка форма та сухі гранули. Рідка форма має невисоку собівартість. Сухі гранули дозволяють забезпечити високу концентрацію мікроорганізмів у невеликому об'ємі, зберігати основні специфічні властивості мікроорганізмів та покращувати їх. Визначено оптимальне співвідношенням носій/осаджувач – 20 г/дм^3 альгінату натрію / 5 г/дм^3 хлориду кальцію. На стадії отримання гранул досягалося збільшення концентрування біомаси в 50 разів.

9. Розраховано економічну ефективність від застосування КАББ прямого внесення та показано, що його використання в порівнянні з застосуванням традиційної ацетоно-бутилової технології знижує необхідність у первинних інвестицій на створення нового виробництва на 34%, зменшує собівартість отримання продуктів бродіння за рахунок зниження витрат на закупівлю КАББ прямого внесення порівняно з витратами на мікробний синтез за традиційною технологією в 1,7 рази. Доведено збільшення ефективності використання субстратів в середньому на 24%.

10. Розроблено тимчасовий технологічний регламент на створення КАББ. Проведено промислову апробацію розробленої технології та апробацію створеного концентрату для активації процесу ацетоно-бутилового бродіння. Доведено, що використання КАББ дозволяє ефективно зброджувати субстрати, що є забруднювачами навколишнього середовища, а це в значній мірі підвищує рентабельність виробництва біопалива та вирішує актуальні екологічні проблеми.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях

1. Скроцький, С.О. Органовмісні відходи виробництва як субстрати для біосинтезу бутанолу бактеріями роду *Clostridium*. *Наукові праці НУХТ*, 2018, 24

(2), с 34-43. (Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України з технічних наук; міжнародна індексація *Index Copernicus*)
 Особистий внесок дисертанта: вивчення та аналіз літературних джерел з теми отримання бутанолу з органівмісних відходів, планування та проведення експериментів з їх зброджування.

2. Скроцька, О.І.; Пирог, Т.П.; **Скроцький, С.О.** Лігноцелюлозна сировина як субстрат для синтезу бутанолу клостридіями. *Наукові праці НУХТ*, **2019**, 25 (1), с 16-32 (Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України з технічних наук; міжнародна індексація *Index Copernicus*).
 Особистий внесок дисертанта: вивчення та аналіз літературних джерел з теми отримання бутанолу з лігноцелюлозної сировини.

3. **Скроцький, С.О.**; Хоменко, Л.А.; Підгорський, В.С. Альгінат натрію як основа для іммобілізації та концентрування бактерій роду *Clostridium*. *Наукові праці НУХТ*, **2019**, 25 (2), с 33-47. (Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України з технічних наук; міжнародна індексація *Index Copernicus*).

Особистий внесок дисертанта: аналіз літератури з даної тематики, проведення практичних досліджень з підбору оптимальних умов для організації процесу іммобілізації та концентрування. Обробка отриманих результатів.

4. **Skrotskyi, S.**; Voychuk, S.; Khomenko, L.; Vasyliuk, O.; Pidhorskyi, V. Influence of nanoparticles on the solventogenesis of bacteria *Clostridium beijerinckii* IMV B-7806, *Clostridium acetobutylicum* IMV B-7807. *Ukrainian Food Journal*, **2019**, 8 (1), pp 110-118. (Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України з технічних наук; міжнародна індексація *Web of Science*).

Особистий внесок дисертанта: аналіз літератури з даної тематики, планування та безпосереднє проведення дослідів з вивчення впливу частинок на бактерії роду *Clostridium*, аналіз отриманих результатів.

5. **Скроцький, С.О.**; Хоменко, Л.А.; Василюк, О.М.; Зелена, Л.Б.; Войчук, С.І. Ідентифікація сольвентогенних бактерій, виділених з природних джерел. *Наукові праці НУХТ*, **2019**, 25 (4), с 42-50. (Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України з технічних наук; міжнародна індексація *Index Copernicus*).

Особистий внесок дисертанта: аналіз літератури з даної тематики, планування та організація мікробіологічних та генетичних досліджень.

Патенти на корисну модель

6. **Скроцький, С.О.**; Хоменко, Л.А.; Василюк, О.М.; Войчук, С.І. Штам *Clostridium acetobutylicum* IMV B-7807 - продуцент н-бутанолу, ацетону та етанолу. Патент на корисну модель України 137353, Жовт 10, 2019. (Особистий внесок дисертанта: виділення та очищення культури з природного ореолу її існування).

7. **Скроцький, С.О.**; Хоменко, Л.А.; Василюк, О.М.; Войчук, С.І. Штам *Clostridium beijerinckii* IMB В-7701 - продуцент масляної кислоти. Патент на корисну модель України 137354. Жовт 10, 2019. (*Особистий внесок: проведення літературного і патентного пошуку, виділення та очищення культури з природного ореолу її існування*).

8. **Скроцький, С.О.**; Хоменко, Л.А.; Василюк, О.М.; Войчук, С.І. . Штам *Clostridium beijerinckii* IMB В 7806 - продуцент н-бутанолу та масляної кислоти. Патент на корисну модель України 137659, Жовт 25, 2019. (*Особистий внесок: проведення літературного і патентного пошуку, складання опису, формули винаходу та виділення та очищення культури з природного ореолу її існування*).

Статті у інших наукових журналах

9. Скроцька, О.І.; Пенчук, Ю.М.; **Скроцький С.О.**; Гавриленко М.М.; Смирнова Г.Ф. Виділення ацетоно-бутилових бактерій з різних природних джерел. *Харчова промисловість*, **2010**, 9, с 49-52. (*Особистий внесок дисертанта: відбір зразків з різних природних ніш, проведення первинного відбору активних до ацетоно-бутилового бродіння зразків та практичне виділення окремих чистих культур мікроорганізмів*).

10. **Скроцький, С.О.**; Хоменко, Л.А.; Войчук, С.І.; Підгорський, В.С. Особливості росту та біосинтетична активність сольвентогенних бактерій роду *Clostridium*. *Мікробіологічний журнал*, **2018**, 80 (2), 5-13. (*Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України; міжнародна індексація Scopus*).

Особистий внесок дисертанта: вивчення особливостей росту та визначення продукування розчинників ацетоно-бутиловими бактеріями.

Публікації у матеріалах наукових конференцій

11. Скроцька, О.І.; Гавриш, Я.В.; **Скроцький, С.О.** Поширення ацетоно-бутилових бактерій у різних природних нішах. «Новітні технології, обладнання, безпека та якість харчових продуктів: сьогоднішня та перспективи», Збірник Міжнародна науково-практична конференція., Київ, Україна, вересень 27-28, 2010 р., НУХТ, Київ, 2010; с. 57-58. (*Особистий внесок дисертанта: відбір зразків з різних природних ніш, проведення первинного відбору активних до ацетоно-бутилового бродіння зразків та практичне виділення окремих чистих культур мікроорганізмів*).

12. **Скроцький, С.О.**; Гавриш, Я.В.; Скроцька, О.І. Дослідження продукції ацетону та бутанолу бактеріями роду *Clostridium*. Збірник тез VI Всеукраїнська науково-практичної конференції. Київ, Україна, квітень 5, 2012 р.; НТУУ «КПІ», Київ 2012; с. 109-110. (*Особистий внесок: проведення первинного дослідження продукції бутанолу різними штамми ацетоно-бутилових бактерій*).

13. Скроцькая, О.И.; Гаврыш, Я.В.; **Скроцкий, С.А.** Исследование эффективных продуцентов ацетона и бутанола среди представителей рода

Clostridium. Тези доповідей 16-той Международной Пушинской школа-конференция молодых ученых. Пушино, Россия, апреля 16–21, 2012 г., – с. 282–283. (Особистий внесок: проведення досліджень з визначення штамів – найактивніших продуцентів бутанолу).

14. Зинченко, А.А.; Скроцкая, О.И.; **Скроцкий, С.А.** Исследование продукции ацетона и бутанола бактериями рода *Clostridium*. Тези доповідей Научному прогрессу – творчество молодых, Международной молодежной научной конференции по естественнонаучным и техническим дисциплинам. г. Йошкар-Ола, Россия, апреля 19-20, 2013 г., с. 198-200.

(Особистий внесок: проведення досліджень з визначення закономірностей динаміки біосинтезу бутанолу мікроорганізмами роду *Clostridium*).

15. **Скроцкий, С.О.**; Кістень, О.Г.; Скроцька, О.І. Дослідження продукції ацетону і бутанолу бактеріями роду *Clostridium*. XIII З'їзд Товариства мікробіологів України. Збірник тез, Ялта, Україна, Жовтень 01 – 06, 2013; с. 421. (Особистий внесок: проведення досліджень з визначення особливостей біосинтезу розчинників мікроорганізмами роду *Clostridium*).

16. **Скроцький, С.О.**; Хоменко, Л.А.; Войчук, С.І.; Василюк, О.М. Пошук шляхів створення ефективних біотехнологій отримання рідких біопалив з відходів – забруднювачів навколишнього середовища. Тези доповідей XV з їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, Одеса, Україна, вересень 11-15 2017 р, с 287. (Особистий внесок: проведення практичних досліджень з отримання бутанолу шляхом зброджування нетрадиційних субстратів).

АНОТАЦІЯ

Скроцький С.О. Біотехнологія препарату прямого внесення для активації ацетоно-бутилового бродіння. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний університет харчових технологій МОН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена розробці технології отримання концентрату ацетоно-бутилового бродіння (КАББ) прямого внесення на основі нових виділених штамів бактерій роду *Clostridium*, що дозволяє спростити та підвищити ефективність процесу отримання продуктів бродіння з субстратів.

До складу КАББ ввійшли штами (*C. beijerinckii* ІМВ В-7806, *C. beijerinckii* ІМВ В-7701 та *C. acetobutylicum* ІМВ В-7807). Використання КАББ дозволяє отримувати бутанол також і з нетрадиційних субстратів: курячого посліду/молочної сироватки різних лігноцелюлозних субстратів). Скорочення кількості технологічних стадій при використанні КАББ пришвидшує процес зброджування в порівнянні з традиційною технологією в 4 рази. Вперше виявлено взаємодію наночасток оксидів металів з АББ. Іммобілізація клітин КАББ в альгінаті натрію збільшує синтез бутанолу на 26 %.

Розроблені ефективна технологія виготовлення КАББ і тимчасовий технологічний регламент на виробництво рідкої та сухої форми КАББ для використання його у збродженні субстратів методом його прямого внесення.

Ключові слова: *C. beijerinckii* ИМВ В-7806, *C. beijerinckii* ИМВ В-7701 та *C. acetobutylicum* ИМВ В-7807, концентрат прямого внесення, КАББ, субстрати, наночастки, гранули.

АННОТАЦИЯ

Скροцький С.А. Биотехнология препарата прямого внесения для активации ацетон-бутилового брожения. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный университет пищевых технологий МОН Украины, Киев, 2020.

Диссертационная работа посвящена разработке технологии получения концентрата ацетон-бутилового брожения (КАББ) прямого внесения на основе новых выделенных штаммов бактерий рода *Clostridium* для упрощения организации и повышения эффективности процесса получения продуктов брожения из субстратов.

В состав КАББ вошли штаммы (*C. beijerinckii* ИМВ В-7806, *C. beijerinckii* ИМВ В-7701 и *C. acetobutylicum* ИМВ В-7807). Использование КАББ позволяет получать бутанол также и из нетрадиционных субстратов (куриный помет / молочная сыворотка различные лигноцеллюлозные субстраты). Сокращение количества стадий при использовании КАББ ускоряет процесс сбраживания по сравнению с традиционной технологией в 4 раза. Впервые показано взаимодействие наночастиц оксидов металлов с АББ. Иммуобилизация клеток КАББ в альгинат натрия увеличивает последующий синтез бутанола на 26 %.

Разработаны эффективная и низкзатратная технология изготовления КАББ, временный технологический регламент на производство жидкой и сухой формы КАББ для сбраживания субстратов методом его прямого внесения.

Ключевые слова: *C. beijerinckii* ИМВ В-7806, *C. beijerinckii* ИМВ В-7701 и *C. acetobutylicum* ИМВ В-7807, концентрат прямого внесения, КАББ, субстраты, наночастицы, гранулы.

SUMMARY

Skrotskyi S. Biotechnology of direct inoculation preparation for activation of acetone-butyl alcohol fermentation. – On the rights of the manuscript.

Dissertation for a Candidate Degree in Technical Science with a specialty 03.00.20 - Biotechnology. – D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the development of technology to produce the direct inoculation biopreparation from concentrates of acetone-butyl bacteria (CABB) on the basis of newly isolated strains of bacteria of the genus *Clostridium*. Biopreparation is

purposed to simplify and increase the efficiency of obtaining fermentation products from substrates. Bacteria-producers of solvents (acetone, butanol, ethanol) and organic acids were isolated from various environmental sources. Based on 16S rRNA gene analysis isolates were identified as belonging to species *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium acetobutylicum*. Obtained information was provided to GenBank database. Passports of three *Clostridia* strains (*C. beijerinckii* - 2 strains, *C. acetobutylicum* – 1 strain) were composed and Certificates of deposit No. IMV B-7806, IMV B-7701, IMV B-7807 were granted by the Depository of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine. There was demonstrated a possibility of replacement of high cost grain substrates for the synthesis of butanol and organic acids by *C. beijerinckii* IMV B-7806, *C. beijerinckii* IMV B-7701 and *C. acetobutylicum* IMV B-7807 with common industrial wastes that are mass pollutants of the environment (chicken manure, whey). For the first time a bacterial concentrate (CABB) of direct inoculation was proposed for acetone-butyl fermentation of substrates. Proposed preparation does not require any specialized microbiological operations for use and can be directly inoculated into the substrate in liquid or dry granular forms. The CABB included strains (*C. beijerinckii* IMV B-7806, *C. beijerinckii* IMV B-7701 and *C. acetobutylicum* IMV B-7807). Reducing the number of stages with use of CABB fastens the fermentation process in 4 times compared to traditional technology. For the first time the interaction of nanoparticles of metal oxides and ABB was demonstrated. Changes in cell morphology were shown in bacteria-nanoparticles interaction. The specific effect of nanoparticles on the synthesis of fermentation products was revealed. There is a potential for further enhancement of CABB efficiency by the use of cerium, silver and iron oxide nanoparticles. Immobilization of CABB cells in sodium alginate increases the subsequent synthesis of butanol of 26%.

Efficient and inexpensive CABB manufacturing technology has been developed, consisting of: 1) separate cultivation of *C. beijerinckii* IMV B-7806, *C. beijerinckii* IMV B-7701 and *C. acetobutylicum* IMV B-7807 on nutrient media of different composition; 2) immobilization of strains using sodium alginate at a concentration of 20 g / L; 3) formation of calcium-alginate granules at a concentration of calcium chloride not lower than 5 g / L; 4) drying (40-45 °C.).

A temporary technological regulation for the production of liquid and dry form of CABB was developed to use it for fermentation of substrates by the method of direct inoculation.

Key words: *C. beijerinckii* IMV B-7806, *C. beijerinckii* IMV B-7701 and *C. acetobutylicum* IMV B-7807, direct inoculation concentrate, CABB, substrates, nanoparticles, granules.