

На правах рукописи

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА»

Биологический факультет

Попова Любовь Ильинична

**Микробное разложение целлюлозосодержащих субстратов с
образованием биотоплива**

Специальность 03.02.03 - микробиология

Специальность 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
д.б.н., профессор
Нетрусов А.И.
к.б.н., ст. научный сотрудник
Цавкелова Е.А.

Москва, 2019 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Микробное разложение целлюлозосодержащих субстратов	11
1.1.1. Состав лигноцеллюлозной биомассы	11
1.1.2. Биоразложение лигноцеллюлозных субстратов	14
1.1.3. Микроорганизмы, разлагающие целлюлозосодержащие субстраты в аэробных условиях	20
1.1.4. Разложение целлюлозосодержащих субстратов в анаэробных условиях	22
1.2. Биотехнологические аспекты биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в биотопливо	25
1.2.1. Предобработка лигноцеллюлозного сырья	30
1.2.2. Получение биогаза из целлюлозосодержащих субстратов.....	33
1.2.3. Структура метаногенного сообщества	35
1.3. Бутанол как альтернативный источник биотоплива	39
1.3.1. Продуценты биобутанола - клостридии	40
1.3.2. Ацетоно-бутиловое брожение клостридий	42
1.3.3. Биотехнологические аспекты получения биобутанола	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	56
2.1. Микроорганизмы и условия их культивирования.....	56
2.2. Выделение чистых культур целлюлозолитических бактерий из анаэробных микробных сообществ.....	62
2.3. Газовая хроматография.....	63
2.4. Оценка роста и развития микроорганизмов.....	64
2.5. Микроскопия.....	65
2.6. Определение целлюлазной активности микроорганизмов.....	65
2.7. Молекулярно-генетические методы изучения состава микробных сообществ	66
2.7.1. Выделение (экстракция) ДНК	66
2.7.2. Электрофорез в агарозном геле	67
2.7.3. Условия проведения ПЦР	68
2.7.4. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ, DGGE)	69
2.7.5. Метагеномный анализ микробного сообщества	70
2.8. Молекулярно-генетические методы для определения выделенных целлюлозолитических культур	71
2.9. Биотест с растениями.....	72
2.10. Обработка результатов.....	72
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	73
3.1. Биоконверсия лигноцеллюлозосодержащего сырья в биогаз на примере пивной дробины.....	73
3.2. Биоконверсия целлюлозосодержащих субстратов в биогаз с помощью микромицетов и метаногенных сообществ.....	79
3.2.1. Изучение целлюлозолитической активности микромицетов <i>Trichoderma viride</i> и <i>Aspergillus terreus</i>	80
3.2.2. Использование микромицетов для предобработки субстратов с целью последующей конверсии образующейся биомассы анаэробными микробными сообществами в биогаз.....	87

3.3.	Изучение анаэробных термофильных микробных сообществ.....	92
3.3.1.	Образование биогаза анаэробными микробными сообществами из целлюлозосодержащего сырья.....	92
3.3.2.	Изучение структуры и состава микробных анаэробных сообществ	98
3.3.2.1.	Микроскопия.....	98
3.3.2.2.	Денатурирующий градиентный гель-электрофорез. Анализ состава доминирующих популяций бактерий и архей	102
3.3.2.3.	Анализ состава доминирующих популяций бактерий и архей с помощью метода высокопроизводительного секвенирования (HTS).....	106
3.3.2.4.	Сравнение ДГГЭ и метода HTS при анализе состава доминирующих популяций бактерий и архей микробного сообщества $\Sigma 4$	110
3.4.	Использование микробных сообществ и чистых культур целлюлозолитических бактерий для получения биобутанола	114
3.4.1.	Выделение и идентификация чистых культур анаэробных целлюлозолитических бактерий.....	117
3.4.2.	Бинарно-последовательная культура <i>Clostridium thermocellum</i> и <i>Clostridium acetobutylicum</i> для биоконверсии целлюлозы в бутанол.....	126
3.4.2.1.	Бинарно-последовательная культура <i>Clostridium thermocellum</i> и рекомбинантного штамма <i>C. acetobutylicum rex:int</i> для биоконверсии целлюлозы в бутанол	134
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		138
ВЫВОДЫ.....		141
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ		142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		143

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

В XX веке одной из наиболее развивающихся отраслей стала разработка и добыча энергоносителей, которые в настоящее время относят к традиционным видам топлива (нефть, газ, каменный уголь). Однако их чрезмерное использование и всё более возрастающие потребности человечества в электроэнергии отрицательно влияют на экономику, прежде всего, из-за зависимости ценообразования от нефти, а кроме того, возникает целый ряд экологических проблем: истощение разрабатываемых месторождений, высокая эмиссия диоксида углерода в составе парниковых газов, которая усугубляет глобальное изменение климата, а также разрушение природных экосистем при добыче, переработке и транспортировке традиционных видов топлива.

Поиск альтернативных источников топлива и оптимизация инфраструктуры, которая могла бы служить эффективной заменой имеющимся технологиям, остаются актуальными и востребованными в отечественных и мировых исследованиях. Одну из ведущих ролей в этой области играет биоэнергетика, использующая различные типы биотоплива, многие виды которого образуются при непосредственном участии микроорганизмов. Наибольшее распространение получило образование биогаза в результате микробиологической переработки биомассы растений, отходов сельского хозяйства и животноводства, различных видов органических бытовых, муниципальных и промышленных отходов и стоков. Дополнительное преимущество биоконверсии органических субстратов с помощью ферментов микробного происхождения, сообществ микроорганизмов или их чистых культур заключается в том, что в результате трансформации в биотопливо отходы и побочные продукты этих процессов также могут служить источниками сырья или биоудобрений, что позволяет создать полностью безотходные технологии (Василов, 2007; Borjesson and Mattiasson, 2008).

Среди наиболее востребованных видов биотоплива на основе активности микроорганизмов выделяют биоспирты (этанол, метанол, бутанол), биодизель, биогаз и биоводород (Faaij, 2006; Кугучин и Алеханова, 2012; Елисеева и др., 2013). При этом в различных регионах мира наиболее предпочтительные типы биотоплива могут варьироваться. В США нашло применение получение этанола из кукурузного крахмала, в Бразилии - этанола из сахарного тростника, а в Германии и Франции - биодизеля из рапсового масла (Василов, 2007; Sagar and Kartha, 2007). Все больше применение находит биобутанол, который по своей энергоёмкости практически соответствует бензину (Dürre, 2007; Swana et al., 2011), а также биогаз, который использует около 38 % мирового населения (Sehgal, 2018).

Несмотря на растущий интерес и наличие необходимых ресурсов доля использования биоэнергетики в России составляет менее 1 % (Елисеева и др., 2013), при этом большая часть биотопливного рынка представлена производством твёрдых видов топлива, а именно топливных пеллет (прессованные отходы деревообработки). В 80-е годы прошлого века отечественными технологами были разработаны и организованы промышленные производства: биогаза и биоводорода в «Запорожском конструкторско-технологическом институте сельскохозяйственного машиностроения», биоэтанола, биобутанола и биоацетона - на заводах в Докшукино и Грозном (Василов, 2007; Давидов и др., 2008). К сожалению, по причинам экономической нерентабельности большинство биотопливных предприятий были закрыты. На сегодняшний день правительственная комиссия по высоким технологиям и инновациям включает в комплексную программу развития биотехнологий в РФ развитие и внедрение технологий, обеспечивающих производство биотоплива из агропромышленных и органических отходов. Предполагается, что из органических отходов, которые по предварительным оценкам составляют по всей России около 700 млн т. возможно получение около 58 млрд м³ биогаза, а также до 88 млн м³ водорода и до 165 тыс. т. растворителей (бутанол и ацетон) (Елисеева и др., 2013; Назаров и Корнеева, 2013; Сусану, 2019).

Использование биогаза в мире неуклонно растёт, однако, в настоящее время биотехнологические разработки, в основном, внедряются в частные хозяйства или промышленные объекты преимущественно в виде ферментёров для получения биогаза. Несмотря на то, что на уровне научно-исследовательских работ, патентов и опытно-промышленных установок существует большое разнообразие данных относительно получения новых штаммов, использования рекомбинантных микроорганизмов, оптимизации сред их культивирования и технологических схем для получения биотоплива, для того чтобы внедрение биоэнергетики стало экономически эффективным, экологичным и повсеместным, необходимы дальнейшие фундаментальные и прикладные исследования в этой области.

Особый интерес для получения биотоплива имеют целлюлозосодержащие материалы. Однако присутствие лигнина делает растительную биомассу устойчивой к биоразложению, затрудняя стадию гидролиза, и, собственно, ингибируя весь процесс биоконверсии таких субстратов до конечного продукта - биотоплива. Одним из способов повышения утилизации лигноцеллюлозных субстратов являются их предобработка. В промышленности используются в основном механические (измельчение) и физико-химические (гидротермолиз, автогидролиз под паром) методы, обработка различными реагентами (щелочной и кислотный гидролиз), органическими растворителями и окислителями (Sun and Cheng, 2002). Биологические методы предобработки, несмотря на всю их перспективность, используют в незначительной степени, в основном, это применение уже готовых ферментных препаратов, полученных,

преимущественно, из грибов, например, *Trichoderma reesei*, *Humicola insolens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thermofida fusca*. В связи с этим поиск возможных путей совмещения биологической предобработки целлюлозосодержащих субстратов с их последующей ферментацией в биотопливо также являются актуальным, особенно ввиду его экологичности.

Несмотря на то, что всё больше исследований появляется в области зелёных биотехнологий, широкое их использование пока ограничено из-за ряда нерешённых вопросов. В частности, использование микробных сообществ или бинарных культур для получения биотоплива предполагает использование одновременно двух и более штаммов микроорганизмов, обладающих различными трофическими потребностями и метаболическими характеристиками (например, целлюлозолитики, синтрофы, метаногены, бродильщики), что позволяет расширить спектр используемых субстратов и получить более высокие показатели продуктивности по сравнению с чистыми культурами. Взаимодействие между микроорганизмами в подобных консорциумах представляет многопараметрическую систему, функционирование которой напрямую зависит от состава микробных сообществ, их физиологических параметров роста, а также трофических связей, обеспечивающих конверсию субстратов в продукты их метаболизма.

Так, при одновременной биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов и получении *n*-бутанола с помощью клостридий, в связи с неспособностью бродильщиков (*Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* или *C. butylicum*) гидролизовать целлюлозу, использование их бинарных (смешанных или последовательных) культур с целлюлозолитическими видами (*C. thermocellum*, *C. cellulovorans*, *C. celevecrescens*) вызывает в последнее время особый интерес. Однако для успешного использования подобных биотехнологий при последующем масштабировании необходимо изучение поведения культур при их совместном (последовательном) выращивании, активности штаммов, селекции наиболее эффективных микробных сообществ, а также поиску оптимальных условий для культивирования и биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в биотопливо, что и обуславливает актуальность выполненного исследования.

Цель и задачи исследования

Цель работы - исследовать структуру и свойства анаэробных микробных сообществ и бинарно-последовательных культур, осуществляющих биоконверсию целлюлозосодержащих субстратов в биогаз и продукты ацетоно-бутилового брожения.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

- провести выделение и селекцию стабильных метаногенных анаэробных микробных сообществ (далее МС), активно разлагающих различные целлюлозосодержащие субстраты

(органические отходы, биомассу растений, бумажную продукцию) в биогаз и оптимизировать условия для культивирования МС и биоконверсии субстратов;

- изучить возможность использования грибов на примере *Trichoderma viride* и *Aspergillus terreus* для предобработки лигноцеллюлозного сырья и оценить их целлюлозолитическую активность;

- изучить возможность полной утилизации целлюлозосодержащих производственных отходов на примере пивной дробины в качестве субстрата для получения биогаза и биоудобрения;

- провести анализ структуры и определить состав метаногенного сообщества, эффективно конвертирующего целлюлозосодержащие субстраты в биогаз;

- провести выделение и идентификацию чистых культур анаэробных целлюлозолитических бактерий;

- подобрать культуры и условия для применения бинарно-последовательной анаэробной ко-культуры, состоящей из целлюлозолитических и способных к ацетоно-бутиловому брожению микроорганизмов, для биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в АБЭ продукты (ацетон, бутанол, этанол).

Научная новизна работы

Научная новизна работы заключается в том, что впервые на примере анаэробных мезофильных и термофильных метаногенных сообществ был исследован процесс биоконверсии различных типов бумажной продукции и отходов в биогаз. Изучен состав консорциума микроорганизмов (бактерий и архей), входящих в эффективные термофильные метаногенные целлюлозолитические сообщества. Анализ структуры микробных сообществ, проведённый с использованием современных методов денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) и высокопроизводительного секвенирования (ВПС), позволил выявить доминирующие и минорные популяции бактерий и архей, идентифицировать представителей и определить роль термофильных синтрофных ацетат-окисляющих бактерий в этом процессе. Также к фундаментальным аспектам работы относится изучение целлюлозолитической активности грибов (на примере *Trichoderma viride* и *Aspergillus terreus*) в отношении предобработки различных целлюлозосодержащих субстратов (бумажная продукция, фитомасса топинамбура) для дальнейшего их сбраживания микробными метаногенными сообществами.

При выделении чистых культур целлюлозолитических бактерий из селективированных анаэробных термофильных сообществ были выделены изоляты *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, способные к разложению целлюлозы. Изучена возможность использования микробных сообществ, а также составных (смешанных) ко-культур для

биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в АБЭ-продукты. Впервые в составе бинарно-последовательной ко-культуры были использованы не только дикие типы термофильной целлюлозолитической культуры *Clostridium thermocellum* DSM 1237 и мезофильного штамма *C. acetobutylicum* ATCC 824, осуществляющего ацетоно-бутиловое брожение, но и рекомбинантный штамм *C. acetobutylicum* rex:int. Оптимизация условий культивирования и сопряжения этих двух процессов продемонстрировала увеличение общего выхода нейтральных продуктов брожения (в 4,9 раза) в сравнении с имеющимися литературными данными.

Практическая значимость работы

Практическая ценность работы заключается в моделировании биотехнологического процесса безотходной утилизации анаэробными микробными сообществами различных целлюлозосодержащих субстратов: пивной дробины, являющейся основным отходом пивоваренной промышленности, фитомассы растений (на примере *Helianthus tuberosus*), а также различных типов бумажной продукции и их отходов. Показана важность селекции микробных сообществ в течение нескольких пассажей на целлюлозосодержащем субстрате, что позволяет получить не только более активные, но и стабильные в течение долгого времени консорциумы микроорганизмов. Были отобраны два наиболее активных микробных сообщества, осуществляющих разложение различных целлюлозосодержащих отходов с образованием биогаза, причём использование смешанных бумажных отходов, состоящих из легко- и трудноразлагаемых материалов, позволяет повысить эффективность их утилизации и биоконверсии.

Использование выбранных видов клостридий (*C. thermocellum* и *C. acetobutylicum*) и подбор условий для их совместного последовательного культивирования (в том числе, использование повторной инокуляции) позволили увеличить эффективность биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в продукты АБЭ-брожения. Использование рекомбинантных штаммов, а также введение этапа реинокуляции АБЭ-продуцента можно рассматривать как способы повышения эффективности ко-культур для их использования в биотехнологии. Полученные в работе данные могут быть применены для модернизации технологий по переработке целлюлозосодержащих отходов в биотопливо с помощью анаэробных чистых культур и сообществ микроорганизмов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выделены и селектированы мезофильные и термофильные анаэробные микробные сообщества, способных к биоконверсии в биогаз (с содержанием метана более 55%) различных целлюлозосодержащих субстратов: нескольких типов бумажной продукции,

фитомассы топинамбура, а также органических производственных отходов. На примере пивной дробины показана возможность её полной утилизации в биогаз и биоудобрение.

2. Использование метода биологической предобработки лигноцеллюлозного сырья (на примере смеси бумаг и фитомассы топинамбура) с помощью микромицетов, образующих комплекс целлюлозолитических ферментов, увеличивает выход биогаза метаногенными сообществами по сравнению с непредобработанными субстратами.
3. С помощью ДГГЭ-анализа и высокопроизводительного секвенирования впервые исследована структура и состав термофильных метаногенных целлюлозолитических сообществ, культивируемых при 55°C на средах с различными типами бумажной продукции. Среди ключевых групп выявлены представители целлюлозолитических бактерий, синтрофных ацетат-окисляющих бактерий и гидрогенотрофных метаногенных архей.
4. При выделении целлюлозолитических термофильных анаэробных бактерий обнаружено несколько изолятов, принадлежащих к *Thermoanaeracterium thermosaccharolyticum*, отличающихся от типового штамма (*T. thermosaccharolyticum* DSM 571) по своей способности к использованию целлюлозы.
5. Оптимизация бинарно-последовательного культивирования модельной ко-культуры *C. thermocellum* DSM 1237 и *C. acetobutylicum* ATCC 824 для биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в продукты ацетоно-бутилового брожения, а также использование рекомбинантного штамма *C. acetobutylicum rex:int* увеличивают выход АБЭ продуктов.

Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментальной части работы, а также работ по сбору и анализу данных. Все результаты получены самим автором или при непосредственном его участии в случае коллаборации. Автор принимал непосредственное участие при подготовке публикаций по материалам работы, ссылки на которые с указанием соавторов присутствуют в тексте работы.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих российских и международных конференциях: Всероссийский симпозиум с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2014), 1-ый Российский Микробиологический конгресс (Пушино, Московская обл., 2017), 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM Annual Meeting (Бюрцбург, Германия, 2017).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 работ: из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и/или рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ, а также 3 публикации в сборниках материалов и тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из 7 разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 162 страницах компьютерного текста, содержит 41 рисунок и 23 таблицы. Список литературы включает 349 источников, из них 43 на русском и 306 на иностранных языках.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность своему первому научному руководителю Цавкеловой Е. А. за неоценимую помощь в планировании и осуществлении всех этапов работы и за личный вклад в становлении автора в качестве самостоятельного исследователя. Автор благодарен своему второму научному руководителю Нетрусову А. И. за ценные советы и рекомендации по ходу работы, а также за помощь в организации прохождения стажировки в Университете г.Ростока.

Автор благодарен всем сотрудникам кафедры микробиологии за ценные замечания и рекомендации по оформлению и представлению работы. Автор глубоко признателен Егоровой М. А. за обучение и помощь в проведении молекулярно-генетических анализов, а также огромную помощь при выполнении ряда других экспериментов; Леонтьевой М. Р. – за помощь в проведении сканирующей электронной микроскопии; Малаховой Д.В. – за помощь и проведение экспериментов по утилизации производственных отходов микробными сообществами; сотрудникам лаборатории физиологии и биохимии микробов под руководством Шестакова А. И. – за помощь в обучении и организации работы по анаэробному культивированию.

Отдельную благодарность автор выражает сотрудникам кафедры микробиологии Университета г. Росток (Германия) под руководством профессора Х. Баля – за осуществление экспериментов по бинарно-последовательному культивированию клостридий, а также всестороннюю помощь и поддержку во время прохождения стажировки.

Автор искренне благодарен своим близким, друзьям и коллегам за терпение и неоценимую поддержку за все время подготовки и написания диссертации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микробное разложение целлюлозосодержащих субстратов

1.1.1. Состав лигноцеллюлозной биомассы

Целлюлоза представляет собой 1-4-β-D-глюкан и имеет эмпирическую формулу $(C_6H_{10}O_5)_n$, которую можно представить как $[(C_6H_{10}O_2(OH)_3)_n$, учитывая наличие трёх гидроксильных групп в элементарном звене (Алёшина и др., 2001). Целлюлоза встречается в природе почти исключительно как компонент клеточных стенок растительных клеток, хотя к биосинтезу целлюлозы способны также некоторые простейшие: амёбы (*Acanthamoeba*), альвеолаты (*Scrippsiella*, *Pyrocystis*) и хромисты (*Rhizidiomyces*), а также грибы, красные и зеленые водоросли (Nobles et al., 2001; Stone, 2005). Среди представителей подтипа *Tunicata* (хордовые) обнаружен чрезвычайно близкий по составу к целлюлозе тунинин, который входит в состав оболочки этих морских животных. Кроме того, образование целлюлозы отмечено и у некоторых прокариот, например, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium* sp., *Gluconacetobacter xylinum* и *G. hansenii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Sarcina ventriculi*, а также у цианобактерий *Anabaena* sp. и *Nostoc punctiforme* (Nobles et al., 2001; Громовых и др., 2017).

Отличительной характеристикой целлюлозы является ее аморфно-кристаллическая структура. Это гомополимер, состоящий из около 10 000 молекул D-глюкозы, связанных β-1,4-гликозидными связями (Алёшина и др., 2001; Schwarz, 2001; Азаров и др., 2010). Отдельные молекулы целлюлозы (линейные цепочки) на месте биосинтеза подвергаются самосборке и образуют протофибриллы, состоящие из десятков (около 30) отдельных полисахаридных цепочек, которые в свою очередь формируют плотно упакованные микрофибриллы, образующие целлюлозные волокна (рисунок 1). Считается, что целлюлоза может иметь до шести полиморфных модификаций, из которых нативная целлюлоза (I тип) содержится в природных материалах, а другие модификации получают при обратимых или необратимых переходах между ними (Алёшина и др., 2001; Грунин и др., 2015). Для нативных целлюлоз справедлива модель аморфно-кристаллического строения, при которой структура фибриллярной целлюлозы представлена чередованием областей с высокой степенью упорядоченности и кристаллической структурой с неоднородными зонами.

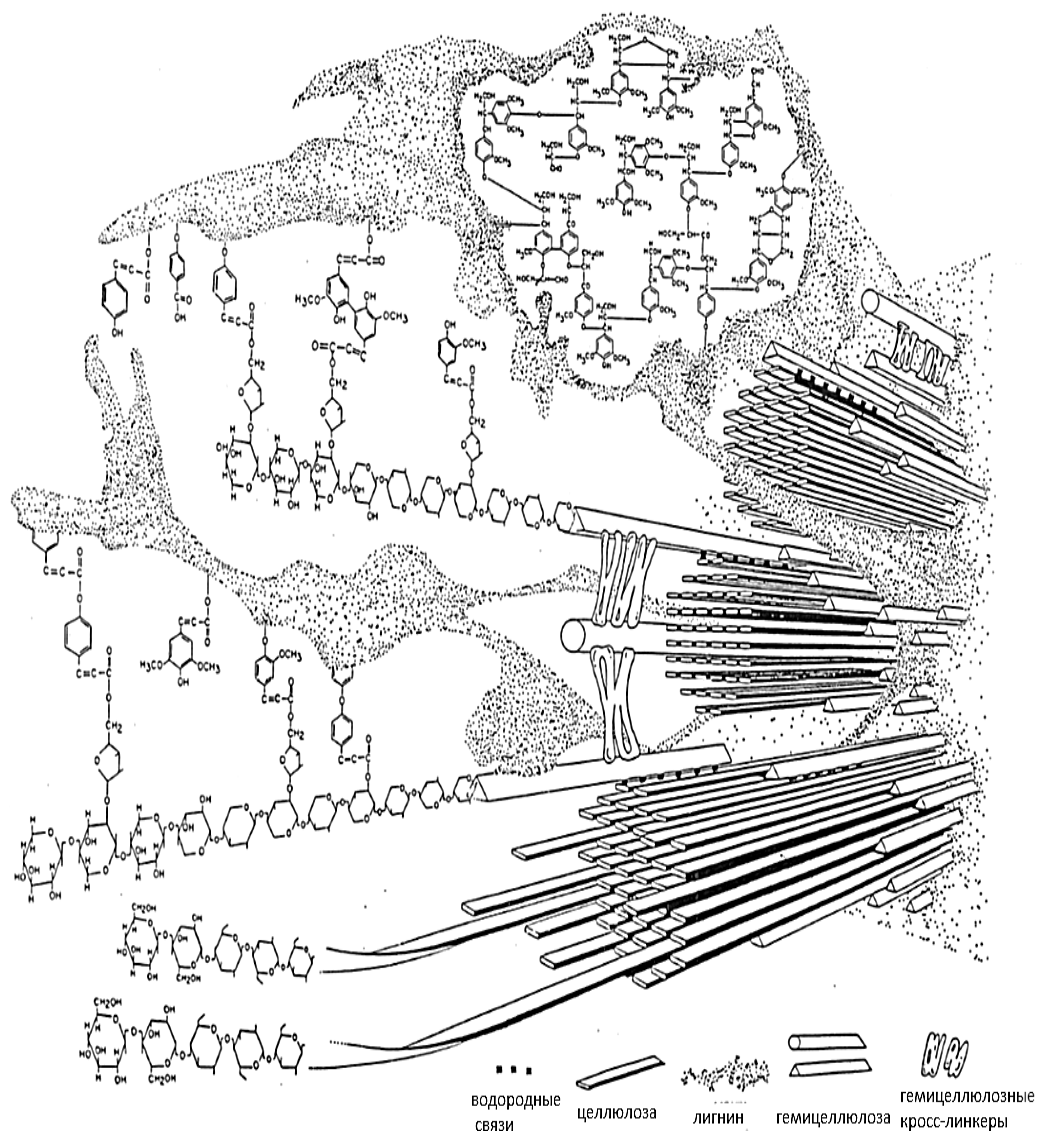


Рисунок 1. Молекулярная структура и межкомпонентная интеграция вторичных клеточных стенок растений (по Janusz et al., 2017)

Именно наличие таких аморфных зон позволяет фибриллам изгибаться, скручиваться, и такие неоднородные участки в первую очередь и подвергаются воздействию химических реагентов и гидролитических ферментов микроорганизмов (Marchessault, Howsmon, 1957; Stone et al., 1969). Целлюлоза нерастворима в воде. Это свойство возникает из-за плотной упаковки её волокон, при которой происходит в том числе и боковая ассоциация отдельных молекул за счет водородных связей (Stone, 2005).

Несмотря на различия в составе и строении клеточных стенок высших растений, содержание целлюлозы в них, как правило, составляет 35-50 % от сухой массы (Lynd et al., 2002). Волокна целлюлозы также входят в состав более сложного биополимера - гемицеллюлозы, которая может достигать от 5 до 35 % от лигноцеллюлозной биомассы растений (Marchessault

and Sundararajan, 1993; Lynd et al., 1999). Гемицеллюлоза представлена в основном замещенными ксиланами, глюканами, маннанами, арабинанами или галактанами (Lynd et al., 1999; Saha, 2003; Pauly and Keegstra, 2008). Основным компонентом гемицеллюлоз твердых древесных пород является глюкуроноксилан, тогда как глюкоманнан входит в состав мягких пород деревьев (рисунок 1).

В состав клеточной стенки растений входят также и другие биополимеры - пектины, полифенольные соединения (лигнины, а также танины), некоторое количество белоксодержащих веществ и крахмала (Lynd et al., 2002). При этом лигнин наряду с целлюлозой является наиболее распространённым природным полимером, придающим растительным клеткам такие свойства, как механическая прочность, непроницаемость и устойчивость к окислительным стрессам и действию микроорганизмов. Именно наличие лигнина влияет на скорость и полноту биоразложения лигноцеллюлозных субстратов: его сложная структура, высокая молекулярная масса и нерастворимость в воде делают его исключительно трудноразлагаемым субстратом (Perez et al., 2002). Структурно лигнин является аморфным гетерополимером, состоящим из фенолпропановых единиц, соединённых различными типами связей (рисунок 2).

В различных видах растительных материалов содержание лигнина может составлять (%): 18-35 - древесина, 30-40 - скорлупа орехов, 10-30 - трава, 0-15 - различного типа бумага, 15 - пшеничная солома, 0 - листья, 18-30 - газета (таблица 1; Sun, Cheng, 2002). Значительное количество лигноцеллюлозной биомассы происходит из отходов сельскохозяйственной и деревообрабатывающей промышленности, а также твердых бытовых отходов.

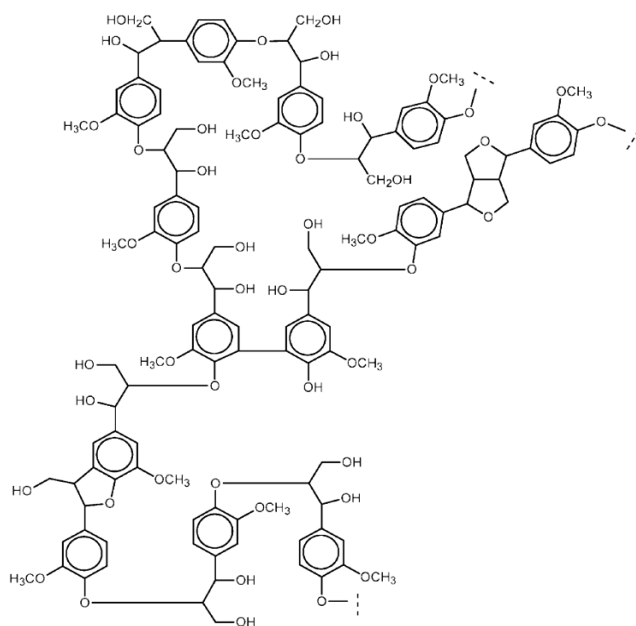


Рисунок 2. Структурная формула фрагмента лигнина из клеточных стенок голосеменных растений; указаны различные типы связей фенолпропановых единиц лигнина (ФПЕ; Perez et al., 2002)

Таблица 1. Содержание целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина в бумажной и сельскохозяйственной продукции и отходах (по Sun and Cheng, 2002)

Тип лигноцеллюлозного субстрата	Содержание целлюлозы, %	Содержание гемицеллюлозы, %	Содержание лигнина, %
Лиственные породы деревьев (стебли)	40-55	24-40	18-25
Хвойные породы деревьев (стебли)	45-50	25-35	25-35
Скорлупа орехов	25-30	25-30	30-40
Початки кукурузы	45	35	15
Трава	25-40	35-50	10-30
Офисная бумага	85-99	0	0-15
Солома пшеницы	30	50	15
ТБО	60	20	20
Листья	15-20	80-85	0
Газетная бумага	40-55	25-40	18-30
Отходы целлюлозно-бумажных комбинатов (пульпа)	60-70	10-20	5-10
Сточные воды	8-15	-	24-29
Твердый навоз крупного рогатого скота	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
Просо, высушенная и измельченная солома	45	31.4	12

Использование биоразложения лигноцеллюлозных субстратов с помощью микроорганизмов, основанного в первую очередь на активности их ферментов, разлагающих основные компоненты растительного сырья (целлюлоза, гемицеллюлоза, лигнин), издавна привлекало внимание. Например, компостирование или добавление ферментов на разных стадиях производства и переработки бумаги, при её отбеливании и предобработке перед пульпированием, что позволило значительно снизить энергопотребление и сократить количество загрязнителей в сточных водах этих отраслей промышленности (Pérez et al., 2002).

1.1.2. Биоразложение лигноцеллюлозных субстратов

В отличие от целлюлозы, образованной линейными цепочками D-глюкозы, и гемицеллюлоз, представленных разветвленными полисахаридами, полимеризация лигнина приводит к формированию сложной трехмерной сети за счет взаимодействий разветвленных цепей радикалов. Формирование такой сети начинается со взаимодействия мономеров - трех оксикоричных спиртов (синаповый, корифериловый и *пара*-кумаровый), которые окисляются растительными пероксидазами с образованием феноксильных радикалов. Взаимодействие радикалов приводит к образованию фенольных димерных структур - фенилпропановых единиц (ФПЕ), которые снова подвергаются ферментативному окислению, в результате чего образуется полимерная сеть из фенольных молекул, взаимодействующих за счет эфирных связей, и нефенольных ароматических остовов (Dashtban et al., 2010; Janusz et al., 2017).

Процесс **биоразложения лигнина** включает следующие стадии: окислительные реакции, трансформирующие боковые цепи лигнина по α - и β -углеродным атомам в кетогруппы и фенольные группы; гидролиз β -О-4 эфирных связей до -ОН и -С₆H₅ структур; разрушение

алкиларильных С-С связей, образование *n*-хиноидных структур и альдегидных или кислотных фрагментов; трансформация ароматического ядра (деметилование и гидроксирование); получение алифатических продуктов (карбоновых кислот) при распаде ароматического кольца (Долгонос и Губернаторова, 2011).

Бактерии, разлагающие лигнин, относятся к трем классам: актинобактерии, α -протеобактерии и γ -протеобактерии. Среди α -протеобактерий ряд штаммов родов *Brucella*, *Ochrobactrum*, *Sphingobium* и *Sphingomonas* способны к деструкции лигнина. Среди γ -протеобактерий наиболее известными деструкторами являются *Pseudomonas fluorescens*, образующий лигнин-пероксидазу (ЛП), *Ps. putida* (пероксидазу семейства DyP и марганец-зависимую пероксидазу МзП), *Enterobacter lignolyticus* (каталазу/пероксидазу НРП), *Escherichia coli* (лакказы). У актиномицетов *Streptomyces viridosporus*, *S. paucimobilis*, *S. coelicolor*, *S. griseus*, *S. psammoticus* и *Rhodococcus jostii* обнаружено около 10 различных ферментов, разрушающих лигнин, среди которых лакказы, ЛП и МзП. (Janusz et al., 2017).

Среди микромицетов выделяют две подгруппы лигниндеструкторов: «грибы белой гнили» (например, *Ganoderma* spp., *Phlebia radiata*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp.) и «грибы коричневой гнили» (например, *Gloeophyllum trabeum*, *Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana*), относящихся к базидиомицетам (Perez et al., 2002; Janusz et al., 2017). Модельным организмом для изучения лигининдеградирующих ферментов является *Phanerochaete chrysosporium* (переименованный в *Phanerodonta chrysosporium*), который выделяет множественные лигнин-пероксидазы и марганец-зависимые пероксидазы, но не образует лакказ (Hattaka, 2005). Также некоторые представители отдела аскомицеты способны к деструкции лигнина, однако, с меньшей эффективностью: среди них *Alternaria alternata*, *Daldinia* sp., *Hypoxylon* sp., *Xylaria* sp., *Eutypella* sp., *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium solani*. В анаэробных условиях деструкция лигнина не возможна, так как для реакций расщепления ароматических колец полимера необходимо присутствие активных форм кислорода (Janusz et al., 2017).

Лигнинразлагающие ферменты классифицируют на фенол-оксидазы (лакказы) и гем-содержащие пероксидазы (лигнин-, марганец- или мультифункциональные). ЛП и МзП охарактеризованы наиболее полно: во многих грибах ЛП присутствуют в виде нескольких изомеров, чей биосинтез опосредован различными генами, и является гликопротеином с гемовой группой в активном центре с молекулярной массой 38-43 kDa (Perez et al., 2002). Этот наиболее активный фермент способен окислять фенольные и нефенольные соединения, амины, ароматические эфиры и полициклические ароматические углеводороды (Kirk and Cullen, 1998). МзП сходны по строению с ЛП, также являются гликозилированными протеинами, но имеют несколько большую молекулярную массу (45-60 kDa). МзП катализирует окисление марганца (II) до марганца (III), который в хелатированной форме способен окислять фенольные соединения в

составе лигнина, но не реагирует с его ароматическими звеньями. МзП участвует в образовании феноксильных радикалов, катализирующих большинство реакций деструкции лигнина.

Мультифункциональные пероксидазы (гибридные, МП) являются более широкоспецифичной формой МзП и сочетают каталитические свойства ЛП и МзП. Они секретируются как комплекс изоферментов с молекулярной массой 40-45 kDa. МП способны окислять типичные для ЛП субстраты, например, метоксибензолы и нефенольные группы лигнина, а также марганец (II) (Долгоносков и Губернаторова, 2011; Garcia-Ruiz et al., 2014). Также МП способны окислять азокрасители и другие нефенольные соединения с высоким окислительно-восстановительным потенциалом в отсутствие посредников (Garcia-Ruiz et al., 2014). МП были обнаружены у представителей родов *Pleurotus*: *Pleurotus eryngii* и *Pl. ostreatus* и *Bjerkandera*: *Bjerkandera adusta* и *B. fumosa* (Dashtban et al., 2010).

Пероксидазы семейства DyP (Dye-decolorizing peroxidase) представляют собой новое семейство гем-содержащих пероксидаз, которое филогенетически не связано с ЛП, МзП и МП (Zamocky et al., 2015). ОП были впервые обнаружены в культуре гриба *B. adusta* и были названы из-за их способности обесцвечивать широкий спектр красителей. Также активность данных ферментов была выявлена и в других грибах, таких как *Termitomyces albuminosus*, *Auricularia auricula-judae*, *Irpex lacteus* и бактерий *Rhodococcus josti*, *Thermobifida fusca* и *Pseudomonas fluorescens* (Janusz et al., 2017). Недавний анализ последовательностей геномов показал, что эти ферменты можно рассматривать как бактериальный эквивалент грибных пероксидаз (Colpa et al., 2014).

Лакказы считаются наиболее важными компонентами лигнинолитического комплекса разрушающих древесину микроорганизмов (Морозова и др., 2007). Субстратами для лакказ являются ароматические соединения, включая фенольные группы лигнина, ароматические амины, бензотиолы и гидроксииндолы, причем молекулярный кислород используется в качестве акцептора электронов. Также лакказы способны окислять неорганические и органические соединения металлов, например, марганец (II) до марганец (III) (Zimmerman et al., 2008). В отличие от других лигнолитических ферментов, лакказы могут быть как внеклеточными, периплазматическими, так и внутриклеточными белками. Лакказы представляют собой металлопротеины, принадлежащие к группе полифенольных оксидаз, и содержат атомы меди в каталитическом центре (Perez et al., 2002).

Помимо перечисленных выше основных ферментов, процесс деградации лигнина катализируется также пулом дополнительных энзимов, таких как глиоксальоксидаза, арилалкогольоксидаза, гем-тиолатгалопероксидаза, глюкозооксидаза и целлобиозодегидрогеназа (Janusz et al., 2017).

Биоразложение гемицеллюлозы приводит к появлению моносахаридов и ацетата. Для разложения ксилана требуется разнообразные ферменты: эндо-1,4- β -ксилаза (эндоксилаза) и 1,4- β -ксилозидаза, первый из которых образует олигосахариды из ксилана, а под действием второго фермента из олигосахаридов образуется ксилоза. Кроме того, при деструкции гемицеллюлозы необходимо несколько дополнительных ферментов: α -L-арабинофуранозидазы, α -глюкуронидазы, ряд эстераз, галактоманназы и глюкоманназы, которые действуют синергично для более эффективного гидролиза древесных ксиланов и маннанов (Sun and Cheng, 2002). Так, например, для разложения *о*-ацетил-4-*о*-метилглюкуронксилаза, наиболее распространённой гемицеллюлозы, необходима активность эндоксилазы, ацетил-эстеразы, α -глюкуронидазы и β -ксилозидазы (Pérez et al., 2002). Некоторые микроорганизмы, например, грибы *Penicillium capsulatum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Talaromyces emersonii*, многие виды из рода *Trichoderma*, а также термофильный актиномицет, *Thermomonospora fusca*, обладают полным набором ксилан-разлагающих ферментов (Saha, 2003). Ксилазы группируют в два семейства с относительно высоким (29-33 kDa) и низким (18-23 kDa) молекулярным весом. Как и целлюлазы (см. раздел «Биоразложение целлюлозы»), ксилазы имеют модульную структуру и состоят из одного или нескольких каталитических и некаталитических доменов. Оптимум pH для грибных гемицеллюлаз лежит в области 4,5-5,5; тогда как бактериальные ферменты активны в более щелочной области: 6,0-7,0. Температурный оптимум для действия ксилаз лежит в области от 40 до 60 °C, причём ферменты бактерий более термостабильны, чем грибные ксилазы (Pérez et al., 2002). Наиболее устойчивыми к высоким температурам являются ксилазы, выделенные из актинобактерий, принадлежащих к родам *Thermomonospora* и *Actinomadura* (George et al., 2001). Ксилан-разлагающая активность отмечена также у штаммов из родов *Bacillus*, *Bacteroides*, *Paenibacillus*, *Ruminococcus*, *Microbacterium* и *Streptomyces* (Okeke and Lu, 2011).

β -ксилозидазы используются реже, чем эндоксилазы, большинство из них являются более крупными, чем эндоксилазы, ферментами (90-122 kDa), прикрепленными к клетке. Они были выделены и описаны для грибов, в частности *P. chrysosporium* и некоторых видов *Trichoderma* (*T. viride*, *T. reesei*; Biely and Tenkanen, 1998). Внеклеточные β -ксилозидазы были описаны у термофильной бактерии *Geobacillus* (*Bacillus*) *stearothermophilus* (Khasin et al., 1993), которые успешно использовали в отбеливании целлюлозы (белении пульпы) при pH 9 и 65 °C.

Эндо- β -манназы - ферменты, относящиеся к семейству гликозил-гидролаз, гидролизующие β -1,4-гликозидную связь в маннанах, галактоманнанах, глюкоманнанах и галактоглюкоманнанах, которые, как и целлюлазы, также имеют мультидоменную структуру. Эти ферменты недостаточно хорошо изучены и были выделены в основном из микромицетов: *T. reesei*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Sclerotium rolfii*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus* sp,

(Biely and Tenkanen, 1998; Kirk and Cullen, 1998). Среди бактерий эндо- β -маннаназы были также выделены из термофильных видов *G. stearothermophilus*, с активностью при 70 °C и в диапазоне pH 5,5-7,5, а также из *Thermotoga neapolitana* с активностью фермента даже при 91 °C (McCutchen et al., 1996).

Биоразложение целлюлозы. К активным деструкторам целлюлозы относятся многие микроорганизмы: среди них встречаются эу- и прокариоты, мезофилы и термофилы, аэробы и анаэробы. Отличительной чертой для продуцентов целлюлаз является высокая экспрессия пула гидролитических ферментов, в которых основную роль играют целлюлазы, осуществляющие гидролиз β -1-4-гликозидных связей в молекулах целлюлозы и относящиеся к семейству гликозил-гидролаз. Различают «свободные» экзоферменты, которые образуются микромицетами, а также прокариотами из группы актиномицетов, осуществляющими гидролиз субстрата растворимыми ферментами без необходимости адгезии микроорганизмов на нем (Lynd et al., 2002). Напротив, для анаэробных бактерий необходимо прикрепление к гидролизуемому субстрату, после которого дальнейшая активность мультиферментного комплекса - целлюлосомы, благодаря модульной организации и наличию субстрат - связывающих модулей, нарушает кристаллическую структуру целлюлозы, делая ее доступной для воздействия целого ряда других гидролитических ферментов анаэробов (Schwarz, 2001). Вообще большинство целлюлолитических ферментов представляют собой мультидоменные белки, содержащие три функционально различных структурных элемента: каталитический домен, целлюлозосвязывающий домен и соединяющий их линкерный участок (Рабинович и Мельник, 2000).

Среди гликозилгидролаз выделяют более 11 семейств целлюлаз по составу их аминокислотных последовательностей, причем между ферментами всех семейств наблюдается высокая степень гомологии их последовательностей (Wilson, 2009). По механизму действия целлюлазы разделяются на 3 типа: эндоглюконазы или эндо-1,4- β -D-глюканазы; экзоглюконазы или целлобиогидролазы, а также β -глюкозидазы (Lynd et al., 2002). Эндоглюканазы расщепляют полисахаридные цепочки внутри аморфных участков целлюлозного волокна, прикрепляясь в любом месте, и образуя олигосахариды различной длины со свободными концами. Экзоглюконазы последовательно воздействуют на восстанавливающие и невосстанавливающие концы полисахаридов, образуя в качестве основного продукта целлобиозу. Глюкозидазы гидролизуют растворимые целлодекстрины и целлобиозу до глюкозы за счёт расщепления β -1,4-гликозидных связей (Birsan et al., 1998; Withers, 2001). Общей чертой большинства целлюлаз является их структурная модульная организация, в которую входят каталитические и углеводсвязывающие модули (USM). Роль USM заключается в пространственном сближении

каталитического домена с нерастворимым участком целлюлозы, а также в инициации активности экзоглюконаз (Teeri et al., 1998).

Выделяют несколько семейств УСМ, основными из которых являются первые три. УСМ эукариот высокоомологичны и представляют единое семейство I. Все углеродсвязывающие модули этого семейства содержат 35-40 аминокислотных остатков, расположенных на С- или N-концах ферментов грибов и имеют клиновидную структуру β -листа, стабилизированную S-S связями (Kraulis et al., 1989; Рабинович и Мельник, 2000).

Семейство II объединяет УСМ разнообразных бактериальных ферментов, принадлежащих аэробным и анаэробным бактериям, а также актиномицетам. Здесь необходимо отметить, что у анаэробов УСМ содержат только целлюлазы, не связанные с целлюлосомой. При этом УСМ обнаруживаются на белке скаффолдине, выполняющем функцию матрикса для закрепления целлюлаз на комплексе (Wilson, 2009). Некоторые бактериальные УСМ, в отличие от грибных, которые способны специфично связываться только с целлюлозой, могут адсорбироваться также на ксилане и хитине. УСМ семейства II обычно состоят из 85-108 аминокислотных остатков, уложенных в антипараллельные β -тяжи, стабилизированные дисульфидной связью (Kilburn et al., 1993; Рабинович и Мельник, 2000).

Семейство III УСМ целлюлозолитических ферментов представлено модулями с более длинной полипептидной цепью - от 131 до 172 аминокислотных остатков. Как и семейство II, оно включает в себя бактериальные УСМ; их отличительным свойством является то, что сюда входят еще и УСМ скаффолдинов клостридий. В основном УСМ этого типа расположены в середине молекулы, однако для УСМ целлюлаз показана возможность их расположения на С-конце, а для УСМ скаффолдинов, специфичных для этого семейства, - на N-конце. Имеют структуру так называемого β -сэндвича и обеспечивают слабое связывание с целлюлозой (Рабинович и Мельник, 2000).

Для целлюлаз известен феномен синергизма - это суммирующий эффект взаимодействия двух или более ферментов, характеризующийся тем, что их активность существенно превосходит эффект каждого отдельного фермента при простом суммировании их активностей. Синергизм возникает только когда две целлюлазы атакуют разные участки молекулы целлюлозы и каждая из них, в свою очередь, создает новые сайты, для воздействия другого фермента (Wilson, 2009). Выделяют 4 типа синергизма: эндо-экзо, когда взаимодействуют эндоглюконаза и экзоглюконаза; экзо-экзо, между двумя экзоглюконазами, воздействующими на разные концы цепочек целлюлозы; между экзоглюконазой и β -глюкозидазой, отщепляющих целлобиозу и целлодекстрины; а также внутримолекулярный - между каталитическим доменом и УСМ (Teeri, 1991).

1.1.3. Микроорганизмы, разлагающие целлюлозосодержащие субстраты в аэробных условиях

Целлюлозолитические ферменты, образуемые грибами, многочисленны, хотя и представляют собой смесь из ограниченного набора энзимов, отличающихся по механизму действия (Рабинович и Мельник, 2000). Целлюлазные системы микромицетов - представителей родов *Trichoderma* (Алимова, 2006), *Penicillium* (Sinitsyn et al., 2014), *Aspergillus* (Matkar et al., 2013), *Fusarium* (Ramanathan et al., 2010), *Phanerochaete* (Wang et al., 2012) и *Sclerotium* (Moussa and Tharwat, 2007) исследуют на протяжении длительного времени. Вышеперечисленные грибы наиболее активно синтезируют экзо- β -1-4-глюкозидазы и эндо- β -1-4-глюкозидазы, β -глюкозидазы (целлобиазы), гемицеллюлазы (эндо-ксилаказы, эндо-маннаказы, β -ксилозидазы, арабиназы, α -галактозидазы, β -галактозидазы), а также пектиназы (пектинлиазы, полигалактуроназы), амилазы (α -амилаза, глюкоамилаза и др.) и инулиназы (эндоинулиназа, экзоинулиназа).

Представители рода *Trichoderma* являются наиболее изученными представителями микромицетов в отношении ферментативного гидролиза целлюлозы. У *Trichoderma reesei* наибольшую активность проявляют две экзоглюконазы (целлобиогидролазы), пять эндоглюконаз и две β -глюкозидазы (Рабинович и Мельник, 2000). Целлобиогидролаза I необходима для деструкции нативной конформации целлюлозы, предполагается, что этот фермент использует свободную энергию гликозидной связи для разрушения кристаллической структуры субстрата, подобно АТФазе миозина (Hespell et al., 1987). Как и эндоглюконазы, принадлежащие к тому же семейству, целлобиогидролаза I (СВН I) сохраняет конфигурацию расщепляемой связи в продуктах реакции и катализирует процессы трансгликозилирования (Wang et al., 1999). Целлобиогидралаза II (СВН II) более специфична и не действует на производные целлоолигосахаридов и лактозы, в отличие от СВН I (Рабинович и Мельник, 2000).

Наличие у триходермы двух экзоглюконаз объясняется их различным действием на восстанавливающие и невосстанавливающие концы на цепочках молекул целлюлозы. Это также проясняет синергизм типа «экзо-экзо» между двумя ферментами (Henrissat et al., 1985; Medve et al., 1994; Nidetzky et al., 1994). Трехмерная структура этих ферментов схожа, они оба состоят из петель, образующих туннель на поверхности, сквозь который идет постепенное расщепление целлюлозных цепей с образованием в качестве основного продукта гидролиза целлобиозы, реже высвобождаются целлотриозы и глюкоза (Divne et al., 1994).

Структура эндоглюконаз представляет собой петли, подобные петлям целлобиогидролаз, которые формируют не туннели, а щелеподобные структуры. В отличие от экзоглюконаз, эндоглюконазы могут не содержать УСМ (Sasaki et al., 1979). Перечисленные энзимы являются основными в ферментной системе *T. reesei* и образуются грибом в соотношении 6: 1,5: 1: 1

одновременно (Teeri et al., 1991), хотя гены, ответственные за их биосинтез, расположены на разных хромосомах. Предполагается, что первыми с целлюлозой взаимодействуют именно эндоглюконазы, предпочитая аморфные участки целлюлозы, уменьшая степень полимеризации цепей, что, в свою очередь, интенсифицирует активность обеих целлобиогидролаз. Был также показан синергизм действия между эндоглюконазами и экзоглюконазами (Lynd et al., 2002). β -глюкозидаза расщепляет образующуюся целлобиозу до глюкозы, при этом именно целлобиоза является конечным продуктом и ингибитором многих целлюлаз.

Среди аэробных бактерий, обладающих целлюлазной активностью, можно выделить представителей родов *Acidothermus*, *Bacillus*, *Caldibacillus*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, *Dyella*, *Erwinia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Sporocytophaga*, *Rhodothermus*, *Thermobifida* (Bergquist et al., 1999; Lynd et al., 1999; Lynd et al., 2002; Wirth and Ulrich, 2002; Haichar et al., 2007; Okeke and Lu, 2011). Наиболее изученными целлюлозолитическими аэробными бактериями являются *Cellulomonas* sp. и *Thermomonospora* sp. Целлюлазная система *Cellulomonas fimi* содержит шесть эндоглюконаз, включая две целлобиогидролазы, а также экзоглюконазу-ксиланазу, расщепляющую как целлюлозу, так и ксилан, а также две ксиланазы (Рабинович и Мельник, 2000; Bayer et al., 2006). Относительно более простая целлюлазная система термофильного актиномицета *Thermomonospora fusca* содержит шесть компонентов: три эндоглюконазы, две экзоглюконазы и специфический фермент, проявляющий эндоглюконазную и экзоглюконазную активности (Рабинович и Мельник, 2000). Оба микроорганизма продуцируют схожие типы целлюлаз и ксиланаз. При этом *Thermomonospora* имеет значительно более упрощенную модульную организацию ферментов, чем *Cellulomonas* sp., у которой все ферменты представлены множественными копиями и состоят из многократно повторяющихся модулей (Bayer et al., 2006).

Комплексы целлюлазных ферментов *Cellulomonas fimi* и других актинобактерий считают промежуточными между комплексами грибов и бактерий. У актиномицетов отсутствуют присутствующие у грибов целлобиогидролазы I и эндоглюканазы I, их функции выполняют аналогичные ферменты, относящиеся к другим семействам, например, экзогидролаза, действующая с восстанавливающего конца. При этом у *T. fusca* и *C. fimi* имеются как экзо-, так и эндоглюканазы, родственные грибной целлобиогидролазе II, специфичные к невозстанавливающему концу (Рабинович и Мельник, 2000).

Помимо нескольких целлюлаз, мананназ и ксиланаз другие бактерии (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Streptomyces*, *Erwinia* sp. и *Thermatoga* sp.) могут содержать и другие гликозилгидролазы - арабинозидазы, лихеназы, амилазы, пуллулаказы, галактаназы, глюкуронидазы и пектатлиазы. Помимо УСМ семейства II,

они могут содержать УСМ семейства III с большим количеством некаталитических доменов (Bayer et al, 2006).

1.1.4. Разложение целлюлозосодержащих субстратов в анаэробных условиях

Среди факультативно анаэробных и анаэробных микроорганизмов целлюлозолитики обнаружены среди представителей родов *Acetivibrio*, *Anaerocellum*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Caldicellulosiruptor*, *Clostridium*, *Desulfurococcus*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fibrobacter*, *Halocella*, *Ruminococcus*, *Spirochaeta*, *Thermotoga* (Цавкелова и Нетрусов, 2012a). В отличие от аэробных бактерий, вынужденных синтезировать и выделять отдельные целлюлозолитические ферменты в высоких концентрациях для полного разложения целлюлозы, строго анаэробные микроорганизмы имеют более экономичную стратегию (Schwarz, 2001), выражающуюся в наличие комплексной системы целлюлаз, в которой объединены основной каталитический домен с УСМ, а также с доменами маннаназы и ксиланазы (Zverlov et al. 1998). Этот сложный комплекс демонстрирует внутримолекулярный синергизм, который обеспечивает высокую целлюлозолитическую активность и эффективность биоразложения целлюлозы, даже при низких концентрациях ферментов (Riedel and Bronnenmeier, 1998).

Другой важной характерной чертой анаэробных целлюлозолитиков является их способность к адгезии на субстрате: внеклеточный матрикс бактерий позволяет микроорганизмам прикрепляться к гидролизуемому субстрату, а также может выполнять структурообразующую роль при формировании биоплёнок и микроколоний, предоставляя защиту для микробных клеток от разного рода физико-химических факторов, и предотвращая диффузию питательных веществ (Олескин и др., 2000; Lynd et al., 2002; Цавкелова и др. 2006).

Наиболее сложная мультиферментативная система и в то же время наиболее изученная представлена у клостридий. У *C. thermocellum* этот комплекс, называемый целлюлосомой, был открыт при изучении адгезии бактерий на микрокристаллической целлюлозе (Bayer et al. 1983). Молекулярная масса некоторых полицеллюлосом достигает 100 МДа. При культивировании бактерий на целлюлозосодержащих субстратах эти ферментные комплексы выступают на поверхности клеточной стенки (Lynd et al., 2002).

Отдельная целлюлосома - это стабильный внеклеточный комплекс ферментов с молекулярной массой около 3 МДа, представляющий собой совокупность из 15-25 различных ферментов (эндо- и экзоглюканазы, маннаназы, ксиланазы, хитиназы, лихеназы), объединенных некаталитическим интегрирующим белком скаффолдином (CipA; Рабинович и Мельник, 2000). Все составляющие комплекс ферменты имеют модули, называемые докериновыми (докерины I). Скаффолдины, в свою очередь, имеют 9 когезиновых модулей I, которые комплементарно

взаимодействуют с консервативными гидрофобными повторами докеринов I, обеспечивая прочное когезин-докериновое взаимодействие, удерживающее вместе весь целлюлосомный комплекс (рисунок 3, Pages et al., 1997). Эти последовательности в значительной степени гликозилированы, что защищает их от воздействия протеаз (Gerwig et al., 1993).

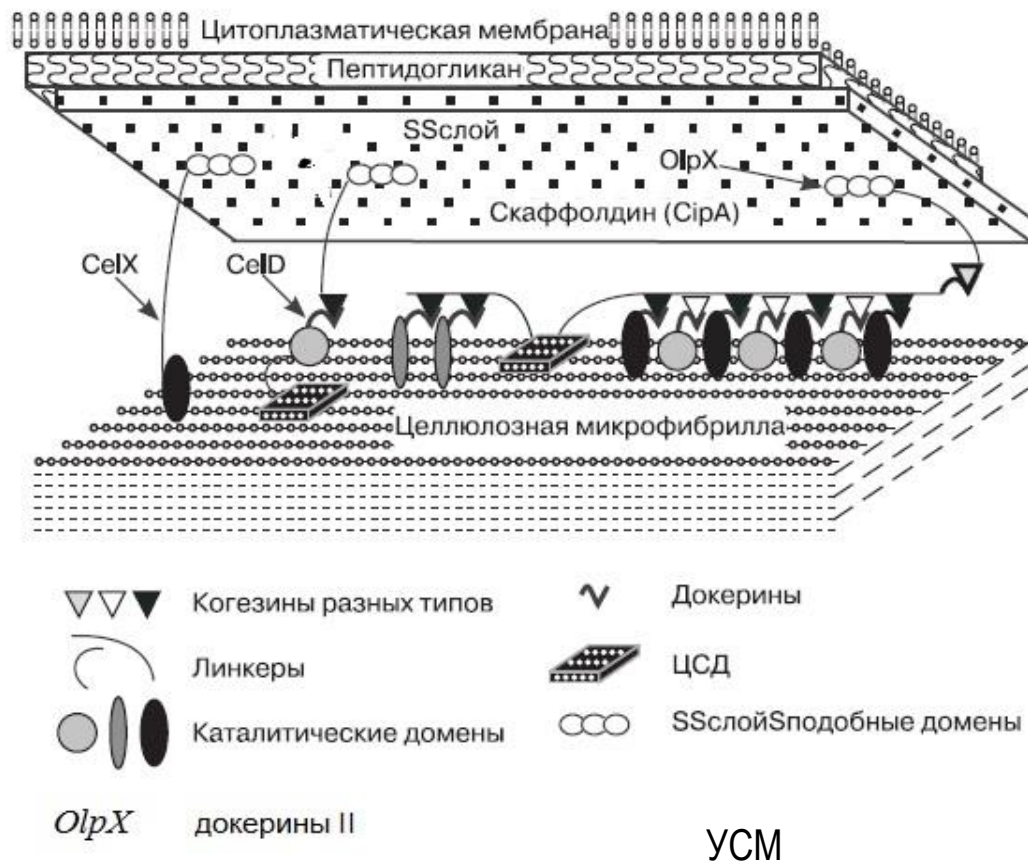


Рисунок 3. Механизм действия целлюлосомных и нецеллюлосомных ферментов *Clostridium* sp. на поверхности целлюлозосодержащего субстрата (по Tomme et al., 1995; Рабинович и Мельник, 2000)

Среди других модулей, входящих в состав целлюлосомы, обнаружены углеводсвязывающие (целлюлозосвязывающие) модули (УСМ), иммуноглобулинподобные модули, гидрофильные модули типа фибронектин III-связывающих доменов, обозначаемые, как Х-модули (Цавкелова и Нетрусов, 2012а). Прикрепление целлюлосомы к кристаллической структуре субстрата, главным образом, обусловлено взаимодействием УСМ семейства III скаффолдина (Schwarz, 2001). Кроме того, скаффолдин содержит модифицированные докерин II типа. Комплементарные им когезины типа II содержатся в белках, принадлежащих S-слою бактериальной клетки, и имеют специфические для S-слоя SLH домены (surface-layer homologous module) (Рабинович и Мельник, 2000; Bayer et al., 2007; Ljungdahl, 2008).

Таким образом, скаффолдин содержит необходимые структурные элементы для сборки целлюлосомы из отдельных ферментов и фиксации этого мультиферментного комплекса на поверхности клетки, а кроме того, для прикрепления целлюлосомы к субстрату (Рабинович и

Мельник, 2000). Наличие целлюлосомы позволяет анаэробным целлюлозолитикам иметь целый ряд преимуществ для эффективного гидролиза целлюлозы (Schwarz, 2001):

1. Оптимизация синергетического действия ферментов.
2. Отсутствие конкуренции ферментов за ограниченное количество сайтов связывания с субстратом благодаря связыванию всего комплекса высокоспецифичным доменом с наиболее активным сайтом.
3. Невозможность полного прекращения процесса гидролиза из-за истощения субстрата одного структурного типа благодаря присутствию ферментов разной специфичности.

Структура целлюлосом может значительно варьировать не только между родами микроорганизмов, но и иметь внутривидовую специфичность, что зависит от числа скаффолдинов, докериновых модулей и УСМ. В то же время среди анаэробных грибов из родов *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, заселяющих желудочно-кишечный тракт травоядных животных (в основном, рубец и слепую кишку жвачных), активно гидролизующих целлюлозу, также обнаружены сходные целлюлосомоподобные белковые комплексы (Ljungdahl, 2008).

В последнее время все больше внимания уделяется поиску новых продуцентов термостабильных целлюлаз. Это связано с тем, что термостабильные ферменты находят широкое применение в биотехнологии, поскольку гидролиз лигноцеллюлозных субстратов при повышенной температуре позволяет увеличить скорость реакции, коэффициент диффузии продуктов и время адсорбции клеток на субстрате (Srivastava et al., 2017). Так, из биогазового реактора была выделена целлюлозолитическая бактерия *Herbinix hemicellulosilytica* с оптимумом активности для фермента 55 °C (Koeck et al., 2015). *Fervidobacterium riparium*, являющийся грамотрицательным термофилом, способен расти на целлюлозе, ксилане и целлобиозе при 65 °C (Podosokorskaya et al., 2011). Помимо выделения новых видов молекулярно-генетические технологии позволяют получить генно-модифицированные штаммы, содержащие целлюлосомы, объединяющие несколько необходимых и высокоактивных ферментов. Более того, плазмиды с генами, ответственными за синтез подобных ферментов, можно вводить в менее требовательный к условиям культивирования микроорганизм, например, *Bacillus* sp. (Bayer et al., 2007). Однако в промышленности наиболее часто используют всё же ферменты, полученные при культивировании грибов, поскольку анаэробные целлюлозолитические бактерии растут крайне медленно и поэтому не удаётся получить большого титра (количества) необходимых энзимов, несмотря на их высокую активность (Sun and Cheng, 2002).

1.2. Биотехнологические аспекты биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов в биотопливо

В современном мире для решения возникающих глобальных экономических и экологических проблем все больше внимания уделяется развитию перспективных технологий в области биотехнологии и альтернативной биоэнергетики. Сокращение запасов традиционных видов топлива (нефть, каменный уголь, природный газ, горючие сланцы и древесина), способы их добычи, транспортировки и использования, приводящие к изменениям в экосистемах, климате и экологии, определяют тенденции в поиске экономически эффективных технологий для получения и использования возобновляемых источников энергии (Цавкелова и Нетрусов, 2012а). Потребление энергии, полученной с помощью различных «зеленых» технологий, увеличивается с каждым годом. Так, среди 300 ГВт электроэнергии, сгенерированной в мире в 2008-2009 г., 140 ГВт было получено с помощью возобновляемой энергетики (ветряной и солнечной; Martinot et al., 2007; Alaswad et al., 2015). Биоэнергетика позволяет использовать в качестве альтернативного топлива продукты жизнедеятельности микроорганизмов в процессе конверсии ряда органических субстратов: биомассы растений, продукции и отходов лесопользования и лесопереработки, сельского хозяйства и животноводства, различных бытовых и промышленных отходов. Микробные биотехнологии используют для получения энергоносителей (биотопливо, биоспирты, газообразные продукты), которые обладают рядом преимуществ: это уменьшение зависимости от импорта нефти, непосредственное использование возобновляемых видов сырья в процессе их образования, получение более экологичного вида топлива (по сравнению с традиционным сырьём, вредные выбросы при их сгорании снижаются почти в 2 раза), а использование биотоплив в смеси с традиционными топливами практически не требует изменений в инфраструктуре топливопотребления (Брагинский, 2008). Кроме того, биотопливо позволяет уменьшить содержание парниковых газов в атмосфере, поскольку оно производится из биомассы растений, фиксирующих двуокись углерода в процессе роста, тем самым обеспечивая уровень нейтральной эмиссии углерода (Araújo et al., 2017).

Лидерами в области переработки и получения биотоплива остаются США, Бразилия, Китай, Индия и ЕС (рисунок 4). Например, производство биоэтанола в 2016 г. составило (в миллиардах галлонов): США - 15,33 (61 %), Бразилия - 7,3 (29 %), ЕС - 1,38 (5 %), Китай - 0,85 (3 %), остальные страны - 0,5 (2 %) (Bulletin «Biofuels factsheet», 2017). В странах ЕС создана инициатива по получению более 10 % энергии с помощью биоэнергетики к 2020 г., а в США принят закон, согласно которому получение энергии из возобновляемого сырья должно достичь 25 % к 2025 г. (Василов, 2007; Antizar-Ladislao and Turrión-Gómez, 2008).

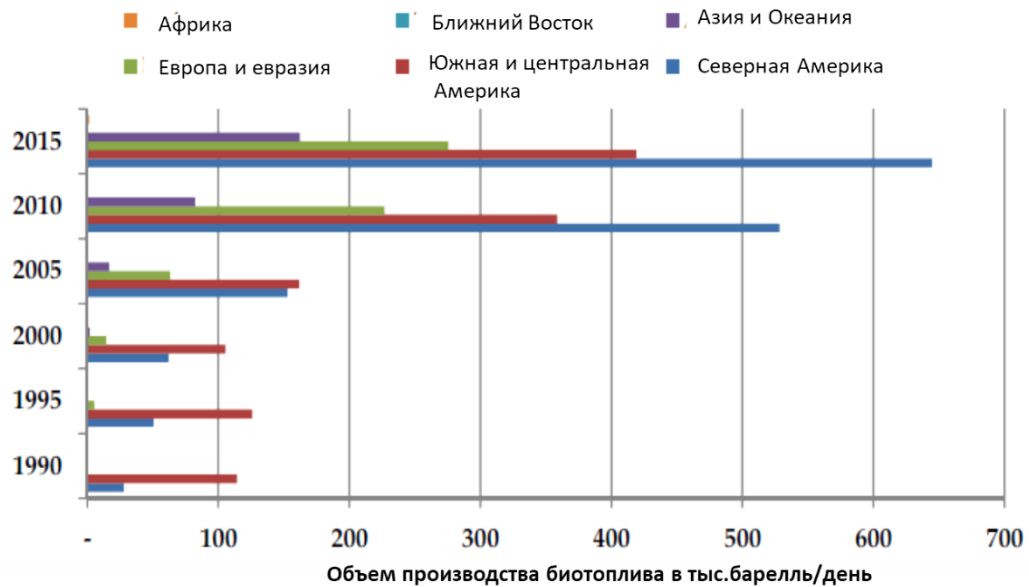


Рисунок 4. Мировое производство биотоплива по регионам (по Araújo et al., 2017)

Основными критериями, определяющими выбор субстратов для их переработки в биотопливо, являются экономическая составляющая (процесс переработки не должен быть дорогим), содержание питательных веществ, прежде всего углеводов для их дальнейшей микробной конверсии, а также возможность их быстрого расщепления, до утилизируемых микроорганизмами мономерных звеньев и возобновляемость для возможности постоянной продукции биотоплива. Одним из субстратов, удовлетворяющих всем вышеназванным критериям, является биомасса растений. Однако существует ряд ограничений по использованию растений для получения биотоплива из биомассы так называемых «энергетических» растений, когда возникает конкуренция за использование пахотных земель и воды для полива, предназначенных для культивирования сельскохозяйственных культур. Поэтому альтернативным субстратом, сбраживание которого также приводит к образованию биотоплива, являются различные органические отходы (Ho et al., 2014; Araújo et al., 2017). Прогнозируемое на 2035 г. использование субстратов для получения биотоплива представлено на рисунке 5.

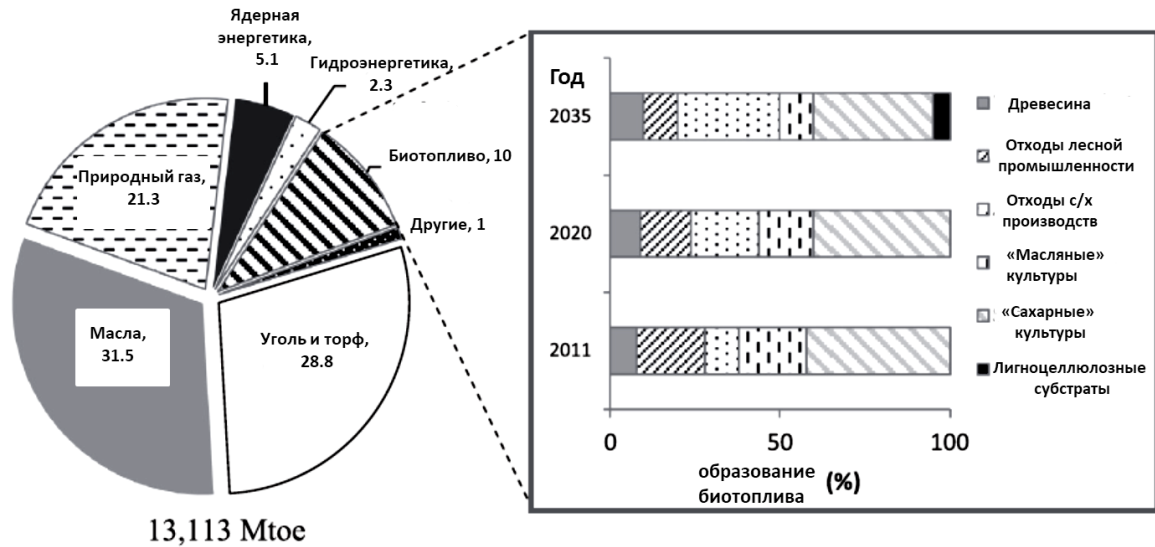


Рисунок 5. Мировые источники энергии на 2011 г., где Mtoe - млн тонн условного топлива в нефтяном эквиваленте (по Ho et al., 2014)

Принято выделять несколько поколений биотоплива (таблица 2) - хотя конечные продукты могут иметь одинаковые характеристикам, основное отличие между ними лежит в исходных субстратах, из которых они были получены в процессе биоконверсии. Так, для **первого поколения биотоплива** субстратами служат продовольственные культуры или сельскохозяйственные растения, из которых, например, получают этанол (путём сбраживания сахаров из сахарного тростника и свёклы, крахмала из початков кукурузы и пшеницы или кассавы, а также пищевого сырья) и биодизель (путём этерификации/переэтерификации со спиртами растительных масел, например, соевого, пальмового, рапсового или животных жиров для получения метиловых эфиров жирных кислот - основного компонента биодизеля; Alaswad et al., 2015; Araujo et al., 2017).

Однако интерес к переработке в биотопливо «энергетических» растений, таких как сахарный тростник, кукуруза, сорго, подсолнечник, мискантус или рапс (Antizar-Ladislao and Turrion-Gomez, 2008) в настоящее время значительно снизился, так как нерациональная организация получения биотоплива из этих растений зачастую приводит к еще большей эмиссии метана в атмосферу (Fargione et al., 2008), а обработка пахотных и пастбищных земель под возделывание «энергетических растений» приводит к сокращению территорий плодородной почвы, необходимой для сельскохозяйственных нужд, что имеет отрицательное влияние на производство продуктов питания и их ценообразование в мировом масштабе (Johansson and Azar, 2007).

Таблица 2. Сравнение моторного топлива и биотоплива первого и второго поколений (по Naik et al., 2010).

Тип топлива	Моторное топливо	Биотопливо 1-ого поколения	Биотопливо 2-ого поколения
Субстраты	природные ископаемые	продовольственные культуры или сельскохозяйственные растения	органические отходы и растительная биомасса
Продукты	бензин, дизель, керосин	биоэтанол, биодизель	биоспирты, биобутанол, жирные кислоты
Проблемы использования	сокращение запасов топлива, экологические загрязнения, рост цен	конкуренция за субстрат при производстве пищи, частично смешиваются с моторным топливом при использовании	в настоящее время нет полномасштабных реакторов для получения, требуются дополнительные разработки
Перспективы использования	является основным типом топлива на сегодня	экологически безопасно	экологически безопасно, технологии, позволяющие увеличить выход биотоплива

Для получения **биотоплива второго поколения** в качестве субстратов используют не употребляемые в пищу культуры (трава, древесина) и разного рода органические отходы. Их используют для дальнейшего пиролиза, гидролиза и микробной ферментации при получении спиртов (биоэтанол, биобутанол), биоводорода, биодизеля и биогаза. Этанол получают преимущественно из целлюлозосодержащих субстратов, причем предварительно проводят необходимый этап предобработки, а ферментация проходит преимущественно с помощью различных штаммов дрожжей. Представители класса *Saccharomycetes*, преимущественно *S. cerevisiae*, используются на промышленных предприятиях, так как позволяют получать высокий выход этанола (> 90 % от теоретического), обладают толерантностью к этому спирту (> 40 г/л) и высокой производительностью (> 1,0 г этанола/л/ч), при этом они растут на недорогих средах и устойчивы к различным ингибиторам. Разные виды и штаммы образуют (в г/л): *Kluyveromyces marxianus* K213 (субстрат - биомасса водяного гиацинта) - 7,3; *Saccharomyces cerevisiae* RL-11 (субстрат - кофейная гуща) - 11,7; *S. cerevisiae* RPRT90 (субстрат - *Ipomea carnea* (сем. вьюнковые) - 29,0; *S. cerevisiae* TMB3400 (субстрат - древесные опилки) - 32,9 (Azhar et al., 2017).

Основной путь получения биобутанола - анаэробное сбраживание бактериями рода *Clostridium* по пути АБЭ (ацетон-бутанол-этанол) брожения. Типовыми микроорганизмами АБЭ процесса являются *Clostridium acetobutylicum* и *C. beijerinckii*, относящиеся к амилаolitikам, поэтому лучшим субстратом для производства бутанола является крахмал и глюкоза, из которых образуется 10,4 г/л и 15,2 г/л бутанола, соответственно (Zheng et al., 2015). При переходе на лигноцеллюлозосодержащее сырье возникает необходимость проведения предварительного гидролиза субстрата или использования дополнительно ко-культуры с микроорганизмами-гидролитиками. Так, на обработанной серной кислотой древесной пульпе *C. beijerinckii* СС 101

образует 9,14 г/л бутанола, а *C. acetobutylicum* IFP 904 на гидролизированных клубнях топинамбура - 13,8 г/л (Kaminski et al., 2011).

Однако для накопления биомассы растений, используемой в качестве субстрата для производства биотоплива 2 поколения, всё еще остаётся потребность в больших территориях с влажной почвой, которые используются для выращивания более необходимых продовольственных и сельскохозяйственных культур. В связи с этим в последнее время стали выделять биотопливо **3 поколения**, которое получают из биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов, культивируемых в водной среде (Alaswad et al., 2015), например, морских водорослей (*Saccorhiza polyschides*, *Laminaria digitata*, *Saccharina latissima*, *Ulva lactuca*), морских и пресноводных микроводорослей (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* spp.) и цианобактерий (*Spirulina* sp.; *Anabaena* sp.) (Gassanova et al., 2006; Montingelli et al., 2015; Петрова и др., 2017). Однако микроводоросли имеют небольшие размеры клеток и низкую концентрацию биомассы в культуре. В биотехнологическом производстве микроводоросли наращивают до концентрации 0,02-0,5 %, а затем в несколько этапов концентрируют до 15-20 %. Сейчас активно разрабатывают различные технологии для культивирования микроводорослей с помощью биореакторов (фотобиореакторов). Наращивание биомассы происходит в специальных ячейках закрытых систем или с использованием открытых прудов. Применение закрытых или искусственных прудов более эффективно, потому что позволяют полностью контролировать производственную среду, свет, испарение воды и возможную контаминацию. Применяемые технологии требуют дальнейших исследований, так как пока не удаётся добиться, чтобы биотопливо, полученной с помощью водорослей, было конкурентно и сопоставимо с моторным топливом (Alaswad et al., 2015).

Помимо использования биомассы водорослей для получения биотоплива, одним из наиболее перспективных источников для его дальнейшей трансформации служат целлюлозосодержащие материалы. Считается, например, что именно целлюлоза и гемицеллюлоза преобладают в твердых органических бытовых отходах (ТБО; Clarke, 2000; Pommier et al., 2010). В последнее время интерес к конверсии бумажного сырья в биогаз возобновился из-за активного введения технологий по раздельному сбору мусора (Цавкелова и Нетрусов, 2012). Кроме того, бумага и картон являются наиболее податливой для биodeградации фракцией ТБО (Pommier et al., 2010). Но основную часть такого сырья составляет лигноцеллюлоза растительного происхождения. И несмотря на широкое распространение этого возобновляемого субстрата и его общую доступность, образование биотоплива из лигноцеллюлозы затруднено. Это связано со структурной организацией лигнина, гидролизовать который может лишь ограниченный круг микроорганизмов.

1.2.1. Предобработка лигноцеллюлозного сырья

Считается, что биоразложению подвергается лишь 2 % от биомассы клеточных стенок растений, поскольку волокна целлюлозы плотно связаны с другими полимерами - гемицеллюлозой и, в особенности, лигнином, что и делает лигноцеллюлозные субстраты крайне устойчивыми к разрушению и затрудняет их биodeградацию (рисунок 6, Sun and Cheng, 2002; Pauly and Keegstra, 2008). Применяют различные и не всегда дешевые способы обработки, которые включают механическое измельчение и перемалывание, пиролиз при температурах выше 300°C, использование гамма- и сверхвысокочастотных (микроволновых) излучений (Teghammar et al., 2010; Ha et al., 2011). В деревообрабатывающей промышленности используют обработку горячим паром - высокотемпературный автогидролиз и гидротермолиз, нередко с добавлением дополнительных агентов в виде неорганических кислот, паров углекислого газа и аммиака (Bjerre et al., 1996; Sun and Cheng, 2002; Saha, 2003). Химические способы предобработки целлюлозосодержащих материалов включают озонолиз, щелочной гидролиз и гидролиз с помощью концентрированных и разбавленных кислот, а также окисление перекисью водорода во влажной атмосфере (Thring et al., 1990; Lynd et al., 2002) и так называемый «органосолв» - процесс, при котором наряду с неорганическими кислотами используются метанол, этанол, ацетон, этиленгликоль, тетрагидрофурфурол, водный фенол, n-бутанол (Akin et al., 1995; Sun and Cheng, 2002; Saha, 2003).

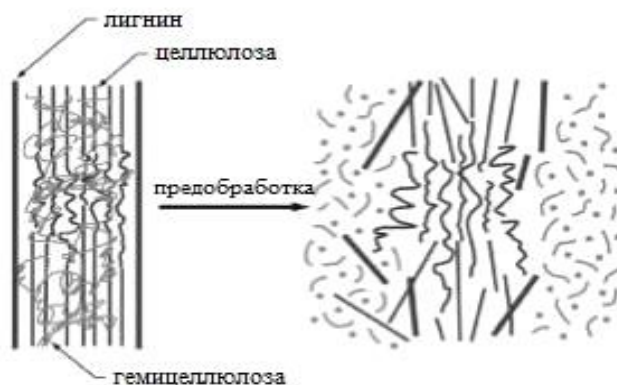


Рисунок 6. Схема предобработки лигноцеллюлозной биомассы (по Zheng et al., 2009)

Все вышеперечисленные технологии имеют свои преимущества и недостатки, а эффективность предобработки обычно характеризуется несколькими критериями: сохранностью целлюлозы, отсутствием или формированием минимального количества ингибирующих рост микроорганизмов при дальнейшей конверсии сырья соединений, в том числе фенольной

природы, сокращением денежных и энергетических затрат, возможностью многократного или повторного использования катализаторов или реагентов, а кроме того, возможностью утилизации образующихся отходов и экологической безопасностью производств (Zheng et al., 2009). Обработка горячим паром позволяет провести трансформацию лигнина, но практически целиком разрушает гемицеллюлозу (Excoffier et al., 1991; Heitz et al., 1991). Механическое размалывание и размельчение биомассы в настоящее время используют значительно реже в качестве предобработки, поскольку является высокзатратным процессом и никак не влияет на содержание лигнина в материале, который сохраняется при данном типе обработки. Использование микроволнового нагрева, ультрафиолетового и гамма-излучений, пульс-электрофореза позволяет снизить уровень полимеризации и кристаллизации структуры целлюлозы, провести гидролиз гемицеллюлозы и частичную деполимеризацию лигнина (Dunlap and Chiang, 1980; Kitchaiya et al., 2003). Однако эти методы дорогостоящи, субстрат-специфичны, а сама обработка занимает длительное время.

Химические методы долгое время использовали в бумажной промышленности для делигнификации целлюлозосодержащих материалов и поэтому наиболее полно изучены. Однако и они имеют ряд недостатков. Так, использование наиболее дешевого и эффективного реагента - серной кислоты (в том числе разбавленной) приводит к коррозии конструкций и материалов, кислотный прегидролизат должен быть нейтрализован для последующей ферментации, а наиболее часто используемый мел или гипс плохо растворимы, особенно при их совместном использовании с гидроксидом кальция, что зачастую применяется в промышленности. Кроме того, для кислотного гидролиза необходимо проводить дополнительно размельчение исходного субстрата. Щелочной гидролиз включает использование различных соединений: гидроокиси натрия, аммония, калия и кальция, в сочетании с водными растворами аммония, перекиси водорода и др. (Foster et al., 2001; Silverstein et al., 2007). Предобработка этими реагентами приводит к разбуханию биомассы за счёт нарушения кристаллической структуры, увеличению областей внутренней поверхности, разложения лигнина и разрыва связей между лигнином и углеводами (Fan et al., 1987). Однако наиболее эффективно обработка щелочным гидролизом проводится на породах дерева и растительной биомассе с малым содержанием лигнина (Vjetre et al., 1996). Кроме того, что щелочной гидролиз - довольно длительный процесс, занимающий до нескольких дней, основным недостатком этой технологии является то, что образуются нерастворимые соли, которые проникают в растительную биомассу, и от которых крайне трудно затем избавиться. Преимуществами обработки горячим жидким аммонием под давлением - AFEX (ammonia fiber/freeze explosion) является отсутствие необходимости в предварительном измельчении субстрата и практическое отсутствие образующихся ингибиторов для последующей ферментативной обработки (Mes-Hartree et al., 1988). Однако такое производство является

вредным для окружающей среды и требует рециклинга используемых химикатов, а соответственно является дорогостоящим и экологически вредным. Кроме того, как и предыдущий тип обработки, данный способ наиболее эффективен на материалах с низким содержанием лигнина и практически непригоден для обработки древесины и газет (Zheng et al., 2009).

Органосольв - процесс с использованием различных органических растворителей, зачастую смешанных с кислотными или щелочными реагентами (Akin et al., 1995; Lynd et al., 2002; Saha, 2003). Несмотря на то, что подобная обработка позволяет получить относительно чистый лигнин в качестве побочного продукта, необходимо проводить дополнительную очистку от используемых растворов, которые содержат значительное количество ингибиторов для последующей ферментативной обработки, а сами растворы крайне вредные для экологии. Также необходим рециклинг реагентов, что делает этот процесс чрезвычайно дорогостоящим и довольно сложным с технологической точки зрения.

К новым технологическим решениям в области химической предобработки лигнобиомассы можно отнести использование ионных жидкостей, например, N-метилморфолин-N-оксид моногидрата (NMMO), 3-метил-N-бутилпиридин хлорида (MBPCL) и ряд других соединений (Heinze et al., 2005), которые обладают низкой гидрофобностью, токсичностью и летучестью, высокой реакционной способностью и, кроме того, оказывают минимальное воздействие на окружающую среду. Воздействие ионных жидкостей на атомы кислорода и водорода, входящих в гидроксильные группы целлюлозы, приводит, в конечном счете, к разрушению водородных связей между цепями фибрилл целлюлозы и растворению целлюлозы. Дальнейшую преципитацию растворенной целлюлозы проводят с помощью воды, этанола, метанола или ацетона. Несмотря на многие преимущества этого метода, он еще недостаточно изучен и не применяется в промышленных масштабах, поскольку используемые вещества крайне дороги и отсутствуют данные об их токсичности (Kuo and Lee, 2009).

Все больше внимания уделяют изучению и улучшению технологий биологической предобработки лигноцеллюлозной биомассы растений и материалов с использованием культур микроорганизмов и ферментов, выделенных из них. Для этих целей наиболее широко применяют грибы белой гнили, принадлежащие главным образом к базидиомицетам. Наиболее активно разрушают лигнин *Trametes versicolor*, *Ceriporia lacerata*, *Stereum hirsutum*, *Polyporus brumalis*, *Phanerochaete chrysosporium* и *Cyathus stercoreus*, которые образуют лигнин-пероксидазы и Mn-зависимые пероксидазы (Sun and Cheng, 2002; Keller et al., 2003; Lee et al., 2007).

Преимуществами предобработки с помощью микромицетов является отсутствие каких-либо вредных химических реагентов, низкая себестоимость процесса и низкие энергетические затраты на его осуществление, и, кроме того, экологическая безопасность. В то же время, это

очень длительный процесс, требующий контроля за динамикой роста и условиями культивирования микроорганизмов, а также большого пространства для их культивирования в промышленном масштабе (Lee et al., 2007). Кроме того, поскольку разложение лигнина происходит при одновременном использовании целлюлозы и/или гемицеллюлозы, - это делает процесс менее привлекательным для биотехнологии. В то же время современные методы молекулярной генетики позволяют получить и использовать генетически-модифицированные штаммы *Phanerochaete chrysosporium* с низкой целлюлазной активностью (Kerem et al., 1992).

1.2.2. Получение биогаза из целлюлозосодержащих субстратов

Преимущество технологий, основанных на природных процессах и механизмах конверсии органических веществ с помощью ферментов или микробных культур, заключается в том, что отходы и побочные продукты таких процессов также могут служить дополнительными источниками сырья, что позволяет создать полностью безотходные технологии (Borjesson and Mattiasson, 2008). Одним из самых энергетически эффективных способов производства биотоплива является получение биогаза (биометана) посредством анаэробной микробной переработки органических субстратов различного происхождения. По сравнению с процессами добычи полезных ископаемых для получения энергетических ресурсов, использование процессов анаэробного сбраживания позволяет использовать и утилизировать легкодоступные и быстро возобновляемые субстраты, например, растительную биомассу и отходы древесного производства, что позволяет уменьшить выброс парниковых газов в окружающую среду (Achinas et al., 2017).

Биогаз состоит, в основном, из метана (55-75 % CH_4) и двуокиси углерода (25-45 % CO_2) со следовыми количествами азота, водорода, сероводорода, кислорода. Для его получения могут быть использованы различные виды органических субстратов, но основным сырьем на промышленных и коммерческих предприятиях остаются навоз сельскохозяйственных животных, а также органическая часть бытовых и промышленных отходов в виде сточных вод и пищевых отходов (Bochiwal et al., 2010; Achinas et al., 2017). Часто используют ко-субстраты в виде «энергетических растений» (кукуруза, сахарный тростник, просо) или древесный подрост, а также растительные «отходы производства». Показано, что выход биогаза при совместном использовании навоза крупного рогатого скота (КРС) и травы, картофельной ботвы, кукурузных стеблей, шелухи подсолнечника и пшеничной соломы может составлять 630, 420, 420, 300, 340 л CH_4 /кг соответственно, в то время как при сбраживании, например, только навоза КРС образуется лишь 250 л/кг (Василов, 2007). В таблице 3 приведено сравнение используемых субстратов для образования биогаза.

Среди европейских стран лидерами по производству биогаза на 2013 г. (Achinas et al., 2017) являлись (в тоннах условного топлива): Германия (6716 т), Великобритания (1824 т), Франция (465 т), Италия (1815 т) и Нидерланды (302 т). Существующие крупномасштабные производства по переработке органических отходов в биогаз показали высокую эффективность создания альтернативного топлива. В этих странах подобные технологии поддерживаются на государственном уровне и регулируются правовыми и налоговыми механизмами, а исследовательские работы в данной области привлекают всё больше внимания. Однако производящие биогаз компании сталкиваются со сложностями регуляции микробных процессов и рисками, связанными с инвестициями в новые технологии. Так, последние исследовательские инициативы сосредотачиваются на изучении использования процессов предобработки органического сырья и способных повысить эффективность процесса биотрансформации субстратов в биогаз (Achinas et al., 2017).

Таблица 3. Энергетический потенциал биомассы и отходов при их биоконверсии в биогаз (по Chynoweth, 2001; Achinas et al., 2017)

Субстрат	ЭДж/год (1ЭДж=10 ¹⁸ Дж=3412*10 ¹⁵ кВт)	Выход биогаза, м ³ /на тонну субстрата
Твердые бытовые отходы	1,5	101,5
Осадки сточных вод и илы	0,8	47
Биодеградируемые промышленные отходы	0,4	н.д.
Сельскохозяйственные отходы (при сборе урожая)	4,1	74
Отходы животноводства	0,4	55-68
«Энергетические» растения (наземные)	22	200
Водоросли	≥100	280-650

*н.д. - нет данных.

Несмотря на обилие всевозможной информации относительно различных аспектов получения биогаза при микробной биоконверсии органических субстратов, до сих пор ощущается недостаток фундаментальных данных о составе и динамике развития микроорганизмов, о механизмах регуляции, протекающих в микробном сообществе, и о влиянии различных факторов на стадии преобразования субстрата в метан, учитывая сложность и многокомпонентность анаэробных метаногенных консорциумов. Остаются нерешенными многие вопросы, касающиеся полноты утилизации субстратов и способов их предобработки, повышения качества и объемов биогаза, его очистки от примесей, а также сохранения стабильности и функциональной активности микробных сообществ (Yadvika et al., 2004; Bochiwal et al., 2010; Цавкелова и Нетрусов, 2012).

1.2.3. Структура метаногенного сообщества

Основной особенностью анаэробного разложения органических субстратов, в том числе и целлюлозы, является сложная структура участвующих в таких превращениях микробных консорциумов, составляющих своеобразную трофическую цепь. Такое сообщество может включать в себя более 60 различных видов бактерий и архей (Заварзин, 1997). Тесные взаимоотношения внутри сообщества основываются, прежде всего, на пищевых потребностях, складывающихся внутри цепи, когда продукты одних процессов становятся субстратами для других без значительного накопления промежуточных соединений. Деградация органических веществ осуществляется при взаимодействии, по меньшей мере, четырех групп микроорганизмов: первичных анаэробов (гидролитики и диссипотрофы), синтрофов, ацетогенов и метаногенов (Angelidaki et al., 2011; Ferry, 2011).

Первичные процессы осуществляют гидролитики и бродильщики, начинающие разложение биомассы с помощью экзоферментов или мембрансвязанных ферментов, и представленные группами бактерий, специализирующихся на различных типах полимеров (полисахариды, белки, липиды, нуклеиновые кислоты и др.). Этап гидролиза и этап брожения тесно связаны: так представители основных гидролитиков, принадлежащих к классу *Clostridia*, зачастую помимо брожения способны к расщеплению различных по своей природе высокомолекулярных веществ. В разложении полисахаридов, представленных целлюлозой и гемицеллюлозой, основную роль играют *Clostridium* spp., а также представители родов *Acetivibrio*, *Fibrobacter*, *Bacteroides*. При этом видовой состав деструкторов целлюлозосодержащих субстратов не является основным для определения скорости гидролиза субстрата, которая зависит прежде всего от способности к адгезии данных микроорганизмов-целлюлозолитиков на субстрате. Среди гидролитиков с протеолитической и липолитической активностями в анаэробных реакторах обнаруживают *Caloramator proteoclasticus*, *Butyivibrio proteoclasticus*, *Coprothermobacter* sp., *Selenomonas lipolytica* (Ножевникова и др., 2016).

Образовавшиеся после биodeградации полимеров олиго- и мономеры (сахара, аминокислоты, пурины, пиримидины, жирные кислоты, глицерол) затем разлагаются первичными анаэробами (гидролитиками и диссипотрофами) с образованием органических спиртов (метанола, этанола, пропанола, бутанола), ароматических соединений, органических кислот (ацетата, пропионата, бутирата, сукцината, лактата, пирувата), а также водорода, углекислого газа и других одноуглеродных соединений, которые могут быть сразу преобразованы в CH_4 и CO_2 (Stams, 1994; Schink, 1997). Синтез ферментов гидролитиками находится в зависимости от концентрации продуктов гидролиза, потребляемых бродильщиками.

При разложении целлюлозы, после действия гидролитиков и бродильщиков, среди основных продуктов также обнаруживают летучие жирные кислоты (ЛЖК), спирты, водород и углекислый газ (рисунок 7). На этом этапе необходим контроль pH среды, так как ее закисление продуктами брожения приведет к остановке биоконверсии субстрата. Хотя не существует ни одного известного анаэробного целлюлозолитика, способного расти (наращивать биомассу) при pH ниже 6, было показано, что процесс утилизации целлюлозы в составе микробных сообществ может происходить и при pH 5. За счет того, что адгезия клеток к субстрату и синтез комплекса целлюлазных ферментов происходит при pH выше 6 (Chyi and Dague, 1994). Среди основных представителей бактерий-бродильщиков, входящих в состав микробных сообществ, развивающихся на широком спектре органических субстратов, были обнаружены представители классов *Clostridia*, *Bacteroidia*, *Actinobacteria*, а также представители родов *Lactobacillus* sp., *Streptococcus bovis* и *Anaerobaculum mobile* (Ножевникова и др., 2016).

Отличительным признаком метаногенного сообщества является обязательное присутствие в нём синтрофных бактерий. Синтрофия представляет собой вид симбиотической кооперации между двумя разными по метаболизму типами микроорганизмов, которые нуждаются друг в друге для разложения определенного субстрата, а такую взаимную зависимость невозможно преодолеть простым добавлением ко-субстрата или иным другим питательным соединением (Stams, 1994; Sieber et al., 2010). Вторичные анаэробы (синтрофы) осуществляют окислительно-восстановительные реакции с участием внешних неорганических акцепторов электронов и также превращают спирты, пропионат и другие короткоцепочечные ЛЖК, некоторые аминокислоты и ароматические соединения в ацетат, CO₂ и H₂, из которых, в свою очередь, в результате ацетокластического или гидрогенотрофного метаногенеза формируется метан (Sieber et al., 2010).

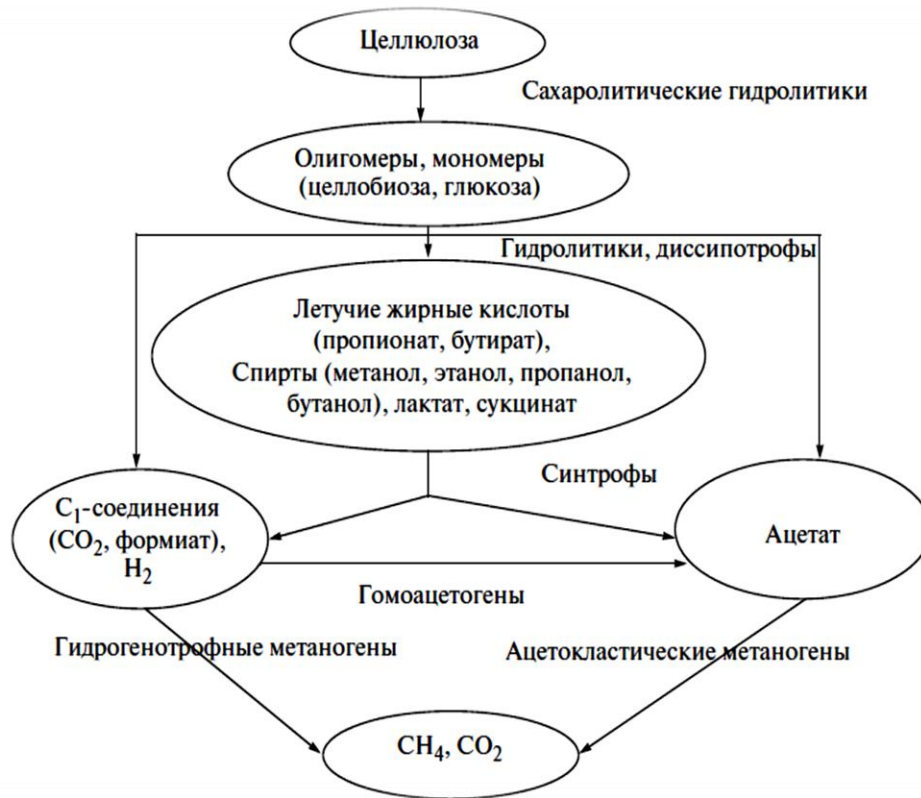


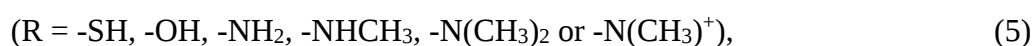
Рисунок 7. Разложение целлюлозы с образованием метана в анаэробном микробном сообществе (по Цавкелова и Нетрусов, 2012)

Отличительные характеристики синтрофии - обязательный обратный транспорт электронов и минимальные изменения свободной энергии (Sieber et al., 2010). В метаногенном сообществе внешним переносчиком электронов помимо водорода может выступать также формиат. Например, синтрофное потребление пропионата *Syntrophobacter fumaroxidans* и бутирата *Syntrophomonas bryantii* происходит только при участии метаногена, который одинаково использует и водород, и формиат, но не с метаногеном, который потребляет исключительно водород (Sieber et al., 2010). Метаногены и синтрофы являются основными компонентами сообщества, поддерживающими концентрации водорода, формиата и ацетата на термодинамически выгодном для бродильщиков и ацетогенов уровне, что необходимо для полного разложения органического вещества. Также метаногены, разлагая ацетат, предотвращают снижение pH в системе, обеспечивая таким образом автономную работу сообщества.

Гомоацетогенные бактерии, в случае если метаногенез подавлен, синтезируют из водорода и углекислого газа ацетат (*Acetobacterium woodi* и *Clostridium thermoaceticum*; Jones and Vandecasteele, 2008), который, в свою очередь, также затем может быть использован ацетокластическими метаногенами (*Methanosarcina* и *Methanosaeta*; Hackstein, 2010) для образования метана. Используя водород для образования ацетата, гомоацетогены могут

конкурировать за него с метаногенами, однако, этого почти не происходит, когда состав сообщества сбалансирован. При этом метаболизм гомоацетогенов может переключаться и на продукцию водорода, необходимого для метаногенов, что происходит при сбраживании органических веществ в условиях, когда идет активный гидрогенотрофный метаногенез (Ножевникова и др., 2016).

Метаногены - это микроорганизмы, которые выделяют метан как конечный продукт анаэробного дыхания. Они принадлежат к археям и относятся к филуму *Euryarchaeota* и включены в семь порядков: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* и *Methanopyrales*, *Methanocellales*, *Methanomassiliicoccales* (Borrel et al., 2013). Распространены они повсеместно и занимают различные анаэробные экониши: морские и пресноводные донные осадки, затопляемые почвы, желудочно-кишечный тракт человека и животных, геотермальные системы, а также разного рода свалки органических отходов и анаэробные системы с использованием ферментеров (Liu, 2010). Их специфическая особенность - наличие уникальных ферментативных комплексов и коферментов. Метаногены могут использовать преимущественно только три типа субстратов: углекислый газ и водород (гидрогенотрофные метаногены), ацетат (ацетокластические метаногены), формиат и другие метил-производные (Robles et al., 2018):



Некоторые могут использовать вторичные спирты (окисляя их до кетонов) и этанол (окисляя его до ацетата; Liu, 2010). Гидрогенотрофным метаногенезом обладают археи, относящиеся к порядкам *Methanobacteriales*, *Methanopyrales*, *Methanococcales*, а также некоторые представители порядков *Methanomicrobiales* и *Methanocellales*. Ацетокластический метаногенез осуществляют *Methanosarcina* и *Methanosaeta* - представители порядка *Methanosarcinales*. Среди архей порядков *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* и *Methanomassiliicoccales* описаны представители метилотрофных метаногенов, облигатно зависящих от наличия молекулярного водорода (Borrel et al., 2013). При анализе метаногенной компоненты в популяциях термофильных анаэробных реакторов было выявлено преобладание гидрогенотрофного пути

метаногенеза над ацетокластическим. При этом общее видовое разнообразие архей обычно выше в мезофильных сообществах (Demirel and Sherer, 2008).

В современных исследованиях активно изучают микробные сообщества, выделяемые из ферментеров по переработке различных отходов. Полученные знания о разнообразии и метаболических способностях сообществ позволят оптимизировать параметры их культивирования в реакторах, подобрать состав микроорганизмов с наиболее широким пулом ферментов и в конечном счете увеличить выход получаемого биотоплива (Kallistova et al., 2014)

1.3. Бутанол как альтернативный источник биотоплива

Активный поиск альтернативных источников энергии и использования возобновляемых ресурсов в современном обществе стремительно возрастает. Так, для получения жидкого биотоплива (например, биобутанола, биоэтанола или биодизеля) наибольший интерес представляют технологии, основанные на микробной ферментации непищевого сырья и органических, в том числе целлюлозосодержащих, отходов (Carere et al., 2008; Green, 2011; Корке and Dürre, 2011). Бутиловый спирт (бутанол, C_4H_9OH), помимо его применения в качестве автомобильного топлива или добавок к нему, используется как растворитель в косметической и фармацевтической промышленности, при синтезе антибиотиков, гормонов и витаминов химическим способом, а также для получения некоторых органических соединений, например, акрилатных каучуков - бутилакрилата и метилакрилата (Garcia et al., 2011).

В качестве моторного топлива бутанол обладает рядом преимуществ по сравнению с этанолом и дизелем. Так, бутанол безопаснее в использовании, поскольку является менее летучим и взрывоопасным веществом, чем этанол; имеет более высокую температуру вспышки и более низкое давление пара (Dürre, 2007), он может быть использован для бензинового двигателя автомобилей отдельно или в смеси с бензином и дизелем, с которыми он полностью смешивается (Garcia et al., 2011). Бутанол имеет низкую гигроскопичность, а по энергоёмкости (27 МДж/л) он практически соответствует бензину (32 МДж/л). Кроме того, бутанол при горении не образует оксидов серы или азота, негативно воздействующих на окружающую среду (Dürre, 2007; Swana et al., 2011).

Основным способом получения бутанола в современной промышленности является его химический синтез на основе оксо-процесса - на первом этапе происходит взаимодействие пропилена и синтез-газа (монооксид углерода и водород) на кобальтсодержащем катализаторе с получением альдегидов (1). На втором этапе (2) проводят восстановление катализатора и реакции гидрирования полученных масляных альдегидов, в результате чего получают бутиловый и

изобутиловый спирты с небольшой примесью побочных продуктов (Андреас и Греббе, 1973; Garcia et al., 2011; Green, 2011):



Микробный биосинтез бутанола был впервые показан Л. Пастером в 1861 году, когда он выделил культуру, которую назвал *Vibrion butyrique*. Согласно представленному Пастером описанию микроорганизма существует предположение о том, что на самом деле *Vibrion butyrique* представляла собой ко-культуру *Clostridium acetobutylicum* и *Clostridium butyricum* (Dürre, 2007). Несколькими годами позднее А. Фиц выделил первую чистую культуру продуцента бутанола и бутирата, названную им *Bacillus butylicus* (Dürre, 1998), а М. Бейеринк, также изучавший этот процесс, выделил две образующие бутанол бактерии - *Granulobacter butylicus* и *Granulobacter saccharobutyricum*. В 1913 г. Х. Вейцман выделил штамм, который позднее был назван *Clostridium acetobutylicum* и стал использоваться как модельный штамм для изучения этого типа бактериального брожения, которое по образуемым продуктам называли ацетоно-бутиловым (в русской традиции) или ацетон-бутанол-этанольным (acetone-butanol-ethanol, ABE в англоязычной литературе) процессом.

1.3.1. Продуценты биобутанола - клостридии

Род *Clostridium* впервые был описан в 1880 А. Празмовски, а микроорганизм *C. butyricum* является типовым видом рода. Однако в то время разделение таксонов осуществляли исключительно по физиологическим характеристикам, и в своей работе Празмовски разделил род *Clostridium* и род *Bacillus*, выделив отдельно грамположительные строго анаэробные палочки, способные образовывать терминальные эндоспores (Prazmowski, 1880; Minton and Clarke, 1989). Но в 1970-х годах одно из ранних исследований в области молекулярного анализа в таксономии показало, что группа клостридий не является однородной и монофилетической (Johnson and Francis, 1975). Как следствие, согласно анализу последовательностей 16S рРНК, эта классификация была пересмотрена несколько раз (Dworkin et al., 2006). М. Коллинз одним из первых предложил иерархическую структуру внутри группы клостридий, выделив 19 новых кластеров внутри единого рода, причем кластер I, содержащий типовой вид *C. butyricum*, включил в себя «истинных» представителей *Clostridium* (группа *Clostridium sensu stricto*), что привело к описанию типовых видов новых родов (*Caloramator*, *Filifactor*, *Moorella*, *Oxalophagus*,

Oxobacter) и переносу некоторых видов в другой род (*Eubacterium*, *Paenibacillus*, *Sporohalobacter*, *Syntrophospora*, *Thermoanaerobacterium*; Collins et al., 1994; Stackebrandt et al., 1999).

Согласно «Руководству по систематике бактерий» Берджи (2009) семейство *Clostridiaceae* включает в себя следующие рода: *Clostridium*, *Alkaliphilus*, *Anaerobacter*, *Anoxynatronum*, *Caloramator*, *Caloranaerobacter*, *Caminicella*, *Natronincola*, *Oxobacter*, *Sarcina*, *Thermobrachium*, *Thermohalobacter* и *Tindallia*. Род *Clostridium* объединяет в себе 168 описанных видов, но только 77 из них имеют сиквенсы 16S рРНК, согласно которым они относятся к кластеру I (*Clostridium sensu stricto*), остальные 81 вид относятся к другим кластерам, согласно их G+C составу (De Vos et al., 2009).

Род *Clostridium* относится к семейству *Clostridiaceae* порядка *Clostridiales* класса *Clostridia* и филуму (отделу) *Firmicutes* домена *Bacteria*. Семейство *Clostridiaceae* представлено гетерогенной группой микроорганизмов, объединенных общими фенотипическими характеристиками: они являются анаэробными, грамположительными, спорообразующими микроорганизмами, неспособными осуществлять диссимиляционное восстановление сульфата. Преимущественно, клетки имеют форму палочек, однако, встречаются также кокки, сарцины и полиморфные клетки. Для представителей рода *Clostridium sensu stricto* показано наличие мезо-диаминопимелиновой кислоты в составе пептидогликана. При этом для многих термофильных видов характерно окрашивание по грамотрицательному типу, что связано с более тонким слоем пептидогликана в клеточной стенке. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК составляет от 21 до 54 %, что говорит о чрезвычайной гетерогенности видов этого рода (De Vos et al., 2009).

Среди представителей семейства выделяют виды, относящиеся к нейтрофилам, несколько алкалофильных и ацидофильных видов и галофилов. По отношению к температуре среди клостридий выделяют все группы - от психрофилов до термофилов, при этом большинство относится к мезофильным организмам с оптимумом роста между 30 °C и 40 °C.

Большая часть видов рода *Clostridium sensu stricto* является гетеротрофами, но встречаются также и хемолитоавтотрофы, осуществляющие гомоацетатное брожение, в процессе которого происходит фиксация CO₂. По типу используемых субстратов принято выделять следующие группы клостридий: сахаролитики, среди которых в отдельную группу можно выделить целлюлозолитические микроорганизмы, пептолитики, пуринолитики и виды, растущие на C-2 (этанол и ацетат) и C-1 соединениях. Конечными продуктами брожения являются различные органические кислоты и спирты, при этом для большинства видов рода *Clostridium*, способных к маслянокислому брожению, бутанол является основным (Bahl and Dürre, 2001; Dworkin et al., 2006; De Vos et al., 2009).

Ведущими специалистами в изучении этого типа клостридиального брожения отечественной школы микробиологии стали С.Н. Виноградский и В.Н. Шапошников

(Шапошников и др., 1939; Виноградский, 1952; Bahl and Dürre, 2001; Dürre, 2011). В период с 20-го по 80-й годы двадцатого века многие страны проводили масштабирование процесса АБЭ-брожения и разрабатывали технологии получения биобутанола в промышленных масштабах. В СССР крупнейшие микробиологические производства АБЭ-продуктов находились в Докшукино (Кабардино-Балкарская республика) и г. Грозном (Чеченская республика), где проводили поиск новых активных штаммов-продуцентов, подбор субстратов, оптимизацию процессов культивирования анаэробных микроорганизмов и разработку непрерывного культивирования (Шапошников, 1948; Zverlov et al., 2006; Егоров, 2011).

В 1990 году в работах группы немецких исследователей (Bahl and Dürre, 2001; Dürre, 2011), изучавших активность различных видов образующих бутанол клостридий, в качестве наиболее эффективных в этом отношении видов для использования в промышленности были предложены *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* и *C. saccharoperbutylacetonicum*. Среди последних отечественных разработок можно выделить создание опытно-промышленной установки под руководством ОАО «Корпорация Биотехнологии» для синтеза бутанола *C. acetobutylicum* из углеводсодержащего сырья (Давидов и др., 2008; URL: <http://www.abercade.ru>). Для увеличения продуктивности исходного дикого типа *C. acetobutylicum* были получены новые штаммы с использованием мутагенеза, например, штамм *C. acetobutylicum* ВКПМ В-10289, который был получен после облучения ультрафиолетом. При росте на средах с ржаной мукой он образовывал до 14 г/л *n*-бутанола и обладал повышенной устойчивостью к продуктам маслянокислого брожения, в том числе при последовательном сбраживании субстрата в ко-культуре с *C. tyrobutyricum* ВКПМ В-10406 или *C. butyricum* ВКПМ В-9619 (Сушкова и Яроцкий, 2011). Другой штамм *C. acetobutylicum* ВКМ В-2512D используют в качестве продуцента *n*-бутанола, ацетона и этанола при росте на мучных средах. При этом по сравнению со штаммом-прототипом он синтезирует в 6 раз больше *n*-бутанола, в 2 раза - ацетона и в 6 раз - этанола (Поляков и др., 2008).

1.3.2. Ацетоно-бутиловое брожение клостридий

Механизм АБЭ-брожения подробно изучен и описан для различных видов клостридий. Схема микробиологического биосинтеза бутанола представлена на рисунке 8.

У сахаролитических клостридий начальным этапом расщепления гексоз является гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса), а пентоз - окислительный пентозофосфатный путь (путь Варбурга-Диккенса-Хоррекера). Далее образованный пируват расщепляется до CO₂ и ацетил-КоА пируват-ферредоксин-оксидоредуктазой с образованием восстановленного ферредоксина.

Брожение *C. acetobutylicum*, как и других сахаролитических сольвентогенных клостридий (*C. beijerinckii*, *C. saccharoacetobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*), характеризуется двухфазностью процесса: в экспоненциальной фазе роста бактерий наблюдают накопление органических кислот - образование ацетата, бутирата, CO_2 и H_2 , за счет чего pH среды в ацетогенной фазе снижается (до pH 5 и ниже).

Тиолаза осуществляет конденсацию двух молекул ацетил-КоА с образованием ацетоацетил-КоА, образующего в процессе восстановления β -оксибутирил-КоА. Затем после отщепления молекулы воды с помощью 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназы образуется кротонил-КоА. Бутирил-КоА дегидрогеназа восстанавливает кротонил-КоА до бутирил-КоА, в результате переноса молекулы КоА с которого на ацетат образуется масляная кислота (бутират). Образованный ацетил-КоА возвращается в метаболический поток и может быть использован для синтеза АТФ в реакциях образования ацетата (Minton and Clarke, 1989; Bahl and Dürre, 2001; Нетрусов и Котова, 2017).

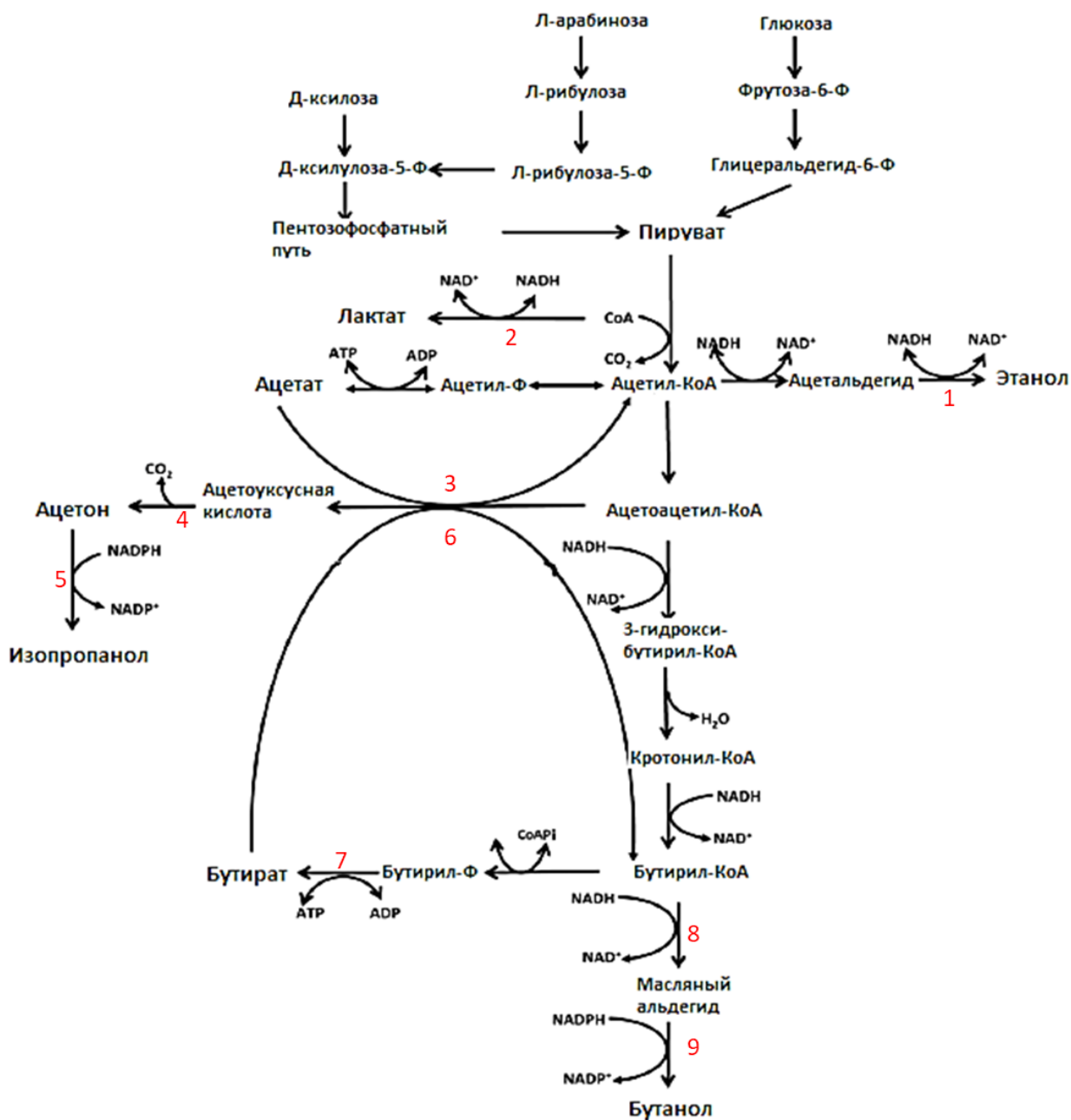


Рисунок 8. Схема образования продуктов в ацетоно-бутиловом брожении (с изменениями по Torto-Alalibo et al., 2014). Цифрами обозначены основные ферменты: 1 - алкогольдегидрогеназа; 2 - L-лактат-дегидрогеназа; 3 - ацетат-КоА-трансфераза; 4 - ацетоацетатдекарбоксилаза; 5 - изопропанолдегидрогеназа; 6 - бутиратацетоацетат-КоА-трансфераза; 7 - бутираткиназа; 8 - бутириральдегиддегидрогеназа; 9 - бутанолдегидрогеназа

При переходе культуры в стационарную фазу роста и в течение фазы II потребность в восстановительных эквивалентах для конструктивного метаболизма уменьшается, а НАДН расходуется в реакциях образования нейтральных соединений, в том числе бутилового спирта, который образуется путём восстановления бутирил-КоА с помощью двух молекул НАДН. Синтез молекулы ацетона происходит при переносе кофермента-А с ацетоацетил-КоА на ацетат с последующим декарбоксилированием образованной ацетоуксусной кислоты с помощью

фермента ацетоацетатдекарбоксилазы. Образование этанола происходит также из ацетата через ацетил-КоА с использованием двух восстановленных эквивалентов. Таким образом, в результате сброса избыточных восстановителей на кислые продукты фазы I pH среды нормализуется за счёт конверсии кислот в нейтральные продукты (Minton and Clarke, 1989; Bahl and Dürre, 2001; Нетрусов и Котова, 2017).

Стехиометрическое отношение между образуемыми конечными продуктами брожения: ацетоном, бутанолом и этанолом составляет 3:6:1 (Бехтерева, 1939; Шапошников, 1948; Bahl and Dürre, 2001). Максимальный теоретический выход бутанола составляет 0,441 г на 1 г глюкозы (Nakayama et al., 2011; Shi et al., 2016). Однако известно, что бутанол оказывает токсическое действие на некоторые мембранные белки и 0,15 М бутанола ингибирует рост *C. acetobutylicum* ATCC 824 на 50 %, поэтому при высоких концентрациях бутанола в среде культура переходит к спорообразованию (Moreira et al., 1981). В связи с этим большое внимание в биотехнологическом процессе получения биобутанола уделяют разработке методов экстракции продуктов АБЭ-брожения из среды при непрерывном культивировании продуцентов (Сушкова и Яроцкий, 2011; Тепляков и др., 2017). Выделяют следующие основные методы экстракции: продувка культуральной жидкости, жидкостная экстракция, молекулярная адсорбция и фильтрация с использованием мембран (обратный осмос, первапорация; Ezeji et al., 2003; Сушкова и Яроцкий, 2011; Kujawska et al., 2015).

Продувку культуральной жидкости газом можно осуществлять в процессе ферментации или уже после его окончания. Так, при культивировании *C. beijerinckii* BA101 на глюкозе с концентрациями 60, 161 и 500 г/л проводили продувку азотом и образующимися газами при брожении (CO₂ и H₂) непосредственно в биореакторе. При этом удалось увеличить выход растворителей с 0,39 до 0,47 г/г субстрата, а степень извлечения растворителей составила от 59,7 до 97 % (Ezeji et al., 2003). Данная методика имеет низкую стоимость, может быть использована параллельно с наращиванием биомассы микроорганизмов и позволяет выводить из сферы реакции только конечные продукты (бутанол, этанол, ацетон), при этом кислые продукты брожения остаются в культуральной жидкости и метаболизируются до АБЭ, что позволяет увеличить общий выход продуктов. Однако данный метод пока широко не используется в промышленности, так как при длительном культивировании в биореакторе необходимо вносить большое количество пеногасителя, который может оказывать токсическое действие на клетки (Kujawska et al., 2015).

Жидкостная экстракция включает в себя процесс выделения растворенных АБЭ-продуктов из смеси с помощью экстрагентов, среди которых наиболее часто используют растительные масла (например, пальмовое), бензол, толуол, гексан, октан, алифатические амины, олеиловый, н-октиловый спирты (Сушкова и Яроцкий, 2011). Так, экстракцию продуктов брожения культуры

C. saccharoperbutylacetonicum N1-4 (биореактор, субстрат глюкоза 90 г/л) проводили олеиловым спиртом и пальмовым маслом. При этом выход растворителей и продуктивность процесса составили соответственно 0,38 г/г субстрата и 0,52 г/(л*ч) бутанола; и 0,40 г/г субстрата и 0,55 г/(л*ч) бутанола, соответственно (Ishizaki et al., 2009). Проблемами данной методики, однако, являются образование эмульсий и токсичность экстрагентов по отношению к клеткам микроорганизмов, поэтому наиболее часто такой подход применяется совместно с процессами адсорбции или дистилляции (Kaminski et al., 2011).

Метод молекулярной адсорбции используют для выделения растворителей в процессе ацетоно-бутилового брожения за счет закрепления молекул растворителя на твердом носителе. В качестве носителей чаще всего используют цеолиты, смолы, активированный или древесный угли, различные полимеры (например, поливинилпиридин). Используют две основные схемы выделения растворителей: первая - адсорбция в биореакторе, однако, в этом случае бактериальные клетки могут прикрепиться к поверхности сорбента, тем самым снизив эффективность процесса, а другая технология связана с адсорбцией АБЭ-продуктов на колоннах с мембранной фильтрацией клеток бактерий и последующей рециркуляцией культуральной жидкости в биореакторе (Сушкова и Яроцкий, 2011; Kujawska et al., 2015). При использовании в качестве адсорбента смолы (КА-I) удалось эффективно выделить *n*-бутанол из смеси ацетона, этанола, *n*-бутанола и воды (Lin et al., 2012). Причем было показано, что увеличение температуры усиливает адсорбцию бутанола, а его максимальный выход (в пересчете на массу смолы) составил 139 мг/г при 10 °С и 304 мг/г при 37 °С. Это также превысило показатели для некоторых других адсорбентов: цеолитов CBV28014 (116 мг/г) и ZSM-5 (160,8 мг/г) и силикалита (97 мг/г; Lin et al., 2012). В другой работе при использовании данной смолы при непосредственной адсорбции с мембранной фильтрацией продуктивность процесса составила 1,5 г/(л*ч), а выход растворителей - 0,33 г/г (Liu et al., 2014).

Первапарация представляет собой мембранную фильтрацию за счет разницы химических потенциалов вокруг мембраны, которая возникает за счет увеличения температуры, создания вакуума или за счет десорбции газами (Сушкова и Яроцкий, 2011; Borisov et al., 2018). В качестве мембран используют полимерные материалы: политриметилсилилпропин (ПТМСП), полидиметилсилаксан (ПДМС), политетрафлуорэтилен (ПТФЭ), полипропилен и другие. Эффективность процесса оценивают с помощью показателей коэффициента разделения и производительности. При фильтрации *n*-бутанола через мембрану ПТФЭ с помощью десорбции газом удаётся добиться производительности 1300 г/(ч*м²), однако, селективность мембраны значительно снижается уже через несколько часов использования (Plaza et al., 2013). При вакуумной первапарации через модифицированную ПДМС мембрану смеси *n*-бутанола и воды

производительность процесса составила 220 г/(ч*м²), а коэффициент разделения - 35 (Liu et al., 2014).

Обратный осмос - это мембранная технология, используемая в основном в процессах опреснения и очистки воды, которая подходит также для концентрирования продуктов ацетон-бутилового брожения. Для этого используются полупроницаемые мембраны, разделяющие раствор на пермеат (очищенную воду) и концентрат. При использовании полиамидной мембраны производительность процесса достигает 0,6 дм³/(м²*мин) с высоким (98 %) показателем экстракции (Garcia et al., 1986).

Разработка методов экстракции продуктов АБЭ-брожения позволяет повысить эффективность за счет более быстрого выведения токсичных продуктов из культуральной жидкости, а также снизить затраты на энергообеспечение процессов очистки. Однако, максимальный выход бутанола (концентрация бутанола среди продуктов - до 20 % по весу) пока что удается получить только в промышленном процессе дистилляции (Сушкова и Яроцкий, 2011; Borisov et al., 2018). В настоящее время получение ацетона, бутанола и этанола, прежде всего, осуществляется химическим синтезом. Тем не менее, исследования в отношении подбора продуцентов и создания на базе диких типов новых высокоэффективных штаммов, оптимизация сред и условий культивирования, а также изучение возможностей для увеличения выхода АБЭ-продуктов при микробном биосинтезе остаются актуальными. Наибольший интерес к микробиологическому синтезу АБЭ-продуктов связан с экологическими технологиями, позволяющими утилизировать и проводить биоконверсию целого ряда органических отходов, в том числе лигноцеллюлозы, в жидкое биотопливо.

1.3.3. Биотехнологические аспекты получения биобутанола

Среди большого числа видов клостридий, способных к АБЭ брожению, в промышленности, в основном, известны *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* и *C. saccharoperbutylacetonicum*, а также *C. butylicum* и *C. tetanomorphum* (Qureshi, 2010; Patakova et al., 2013). Наиболее изученным в отношении биотехнологического применения остаётся *C. acetobutylicum*, разные штаммы которого используют с середины прошлого века для получения промышленных объемов АБЭ-продуктов (Jones and Woods, 1986; Bahl and Dürre, 2001). Многие сольвентогенные клостридии не используют в макротоннажном производстве, так как, либо образуют *n*-бутанол в незначительных количествах (*C. pasteurianum* и *C. ljungdahli*), либо в эквимольных количествах с ацетоном и этанолом (*C. puniceum* и *C. tetanomorphum*; Березина и др., 2011).

Сахаролитические клостридии потребляют широкий спектр субстратов от различных моносахаров до сложных по структуре полисахаридов. В качестве источника углерода и энергии

они расщепляют глюкозу, фруктозу, маннозу, сахарозу, лактозу, галактозу, ксилозу, арабинозу, раффинозу, а также крахмал, декстрин и инулин (De Vos et al., 2009). Традиционно в качестве основных субстратов для ацетоно-бутилового брожения использовали зерно, картофель, кукурузу (Gutierrez et al., 1998; Qureshi and Blaschek, 2001) и мелассу (Шапошников и др., 1939). Благодаря высокой амилолитической активности клостридий преобладающим типом субстрата для их промышленного культивирования является крахмалсодержащее сырье.

В начале 1930-х годов активное развитие сахарной индустрии, производящей помимо основного продукта значительное количество отходов в виде мелассы, привело к введению этого более дешевого (в 2,3-2,6 раз по сравнению с кукурузой) компонента в процесс получения АБЭ-продуктов микробного происхождения (Jones and Keis, 1995; Ni et al., 2012). Для производства бутанола в СССР использовали пшеничную и ржаную муку, а также заторы, состоящие из обдирной муки (около 30 %), свекловичной мелассы и продуктов гидролиза кукурузных кочерыжек и лузги подсолнечника (около 70 %) (Логоткин, 1958). В зарубежных производствах использовали мелассу, картофель, кукурузу, батат, кассаву и сахарный тростник (Березина и др., 2011; Ni et al., 2012).

Максимальные выходы АБЭ-продуктов получают при культивировании продуцентов на крахмале зернового сырья и продуктах частичного кислотного или ферментативного гидролиза крахмала (патока или мальтодекстрин; Березина и др., 2011; Сушкова и др., 2013). Так, эффективность использования частично гидролизованного картофельного крахмала была продемонстрирована на примере *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 (Nimcevic, 1998). В другой работе (Gutierrez et al., 1998) было показано, что некоторые штаммы *C. acetobutylicum* могут использовать картофель без его предварительного гидролиза не менее эффективно и, например, штаммы DSM 1731, NCIMB 8052 и NRRL 595, образовывали суммарно растворителей в количестве 12,1 г/л, 8,9 г/л и 9,4 г/л, соответственно, тогда как после обработки амилазами (Termamyl®) эти же штаммы образовывали 11,4 г/л, 7,2 г/л и 9,3 г/л. При использовании кукурузного экстракта для сбраживания продуктивность *C. beijerinckii* P260 составила 0,31 г/л*ч, а суммарный выход АБЭ-продуктов - 26,3 г/л (Qureshi et al., 2010). Сбраживание мелассы культурой *C. saccharobutylicum* DSM 13864 приводило к образованию 19,8 г/л АБЭ-продуктов, из них *n*-бутанола - 13,4 г/л (Ni et al., 2012).

По данным некоторых авторов (Jones and Keis, 1995) при сбраживании картофельного крахмала выход АБЭ-продуктов у *C. acetobutylicum* может составлять 28-30 % (Jones and Keis, 1995). При этом другие авторы (Сушкова и др., 2013) указывают, что выход *n*-бутанола у этого вида обычно составляет не более 20-22 %, а сумма растворителей - не более 35-37 %, что ниже теоретически рассчитанных величин (с образованием 26,6 % бутанола и 43,24 % суммарных растворителей от сброженного крахмала). Негативную роль в этом процессе играет

ингибирование роста и развития самого продуцента образующимися продуктами брожения: подавление развития культуры происходит при 12-13 г/л *n*-бутанола и 6 г/л бутирата в среде культивирования (Логоткин, 1958; Сушкова и др., 2013). Применение методов экстракции АБЭ-продуктов в процессе ферментации увеличивает суммарный выход растворителей до 20-45 г/л (Сушкова и др., 2013). В качестве подходов, призванных увеличить выход растворителей, также в биореакторах используют иммобилизацию клеток *C. acetobutylicum* (Friedl et al., 1991) и *C. beijerinckii* (Lienhardt et al., 2002).

В настоящее время производство биобутанола на традиционном виде топлива существует, например, в Китае, где в качестве субстрата для сбраживания *C. acetobutylicum* используют крахмал кассавы и кукурузу (Ni et al., 2009). Однако современные тенденции связаны со стратегией замены пищевых продуктов для производства биотоплива на возобновляемое сырьё. Поэтому промышленное производство на таких сахаросодержащих субстратах как свёкла и патока (меласса), а также крахмалосодержащие зерносмеси, отруби и овощные культуры в промышленных масштабах уже практически не функционируют. Использование для производства топлива растений, пригодных в пищу, таких как кукуруза, картофель и сахарный тростник также занимает пахотные земли для их культивирования и значительно повышает себестоимость конечных продуктов брожения. Это привело к поиску альтернативных субстратов для АБЭ-ферментации, среди которых рассматривают целлюлозосодержащие отходы сельскохозяйственного и древесного производств: солома злаков, пожнивные остатки, шелуха семян и скорлупа орехов, а также бытовые отходы и отходы производств растительных масел и молочной промышленности (Jesse et al., 2002; Березина и др., 2008; Березина и др., 2011).

Среди клостридий есть несколько видов (*C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum* и *C. thermocellum*), обладающих высокоэффективным комплексом целлюлозолитических ферментов (раздел 1.1.4), и предлагаемых к использованию в ко-культурах с клостридиями - АБЭ-продуцентами (таблица 7). Использование целлюлозосодержащих субстратов для получения биобутанола является перспективным современным направлением в биотехнологии (Qureshi et al., 2010; Kumar and Gayen, 2011). При этом необходимым этапом при сбраживании лигноцеллюлозных субстратов является их предварительная делигнификация, поскольку у анаэробных микроорганизмов нет комплекса ферментов для эффективной деструкции лигнина (способы предобработки описаны в разделе 1.2.1). Состав некоторых целлюлозосодержащих и органических субстратов, используемых в ацетоно-бутиловом брожении, приведен в таблице 4.

Таблица 4. Состав органических и растительных субстратов для биосинтеза биобутанола клостридиями (с изменениями по Kumar and Gayen, 2011)

Субстрат	Состав субстрата	Пред-обработка	Микроорганизм
Ячменная солома	42 % целлюлоза, 28 % гемицеллюлоза, 7 % лигнин, 11 % неорганический остаток	+	<i>C. beijerinckii</i>
Пшеничная солома	38 % целлюлоза, 29 % гемицеллюлоза, 24 % лигнин, 6 % неорганический остаток	+	<i>C. beijerinckii</i>
Кукурузная солома	38 % целлюлоза, 26 % гемицеллюлоза, 23 % лигнин, 6 % неорганический остаток	+	<i>C. beijerinckii</i>
Просо	37 % целлюлоза, 29 % гемицеллюлоза, 19 % лигнин	+	<i>C. beijerinckii</i>
Органические отходы	59 % сахара, 13 % лигнин, 17 % неорганический остаток	+	<i>C. acetobutylicum</i>
Кукурузная мука	73 % крахмал, 13 % протеины, 3 % неорганический остаток	+	<i>C. beijerinckii</i>
Экструдированная кукуруза	61 % крахмал, 8 % протеины, 11,2 % целлюлоза, 3,8 % кукурузное масло	+	<i>C. acetobutylicum</i>
Сывороточный белок	5 % лактоза, 0,86 % протеины, 0,34 % жиры	-	<i>C. acetobutylicum</i>

Процесс микробной трансформации целлюлозосодержащих субстратов (ЦСС) в биотопливо, в том числе биобутанол, можно условно разделить на три этапа, включающих в себя следующие энзиматические реакции: 1) синтез целлюлаз и гемицеллюлаз микроорганизмами (например, штаммами дикого типа *C. thermocellum* и *C. cellulolyticum*, или рекомбинатными штаммами *Escherichia coli*, или же микромицетами, например, *Trichoderma reesei* и *Fusarium oxysporum*), 2) последующий гидролиз субстрата и 3) сбраживание образовавшихся гексоз (глюкоза, манноза, галактоза) и пентоз (ксилоза и арабиноза) с образованием конечных продуктов (Brethauer and Studer, 2014). Кроме того, в современной промышленности выделяют несколько стратегий обработки ЦСС (рисунок 9): i) разделение этапов гидролиза целлюлозы и сбраживания образовавшихся сахаров (РГС); ii) их совместный гидролиз и сбраживание при котором в одном ферментёре происходит одновременный гидролиз целлюлозы и сбраживание гексоз (СГС), iii) совместный гидролиз и ко-ферментация (СГК), когда одновременно происходит гидролиз целлюлозы и сбраживание (ко-ферментация) гексоз, а также пентоз и iv) консолидированный биопроцессинг (КБ), при котором все три этапа микробной трансформации ЦСС протекают одновременно внутри одного ферментера за счет ко-культуры микроорганизмов или моно-культуры (Lynd et al., 2002).

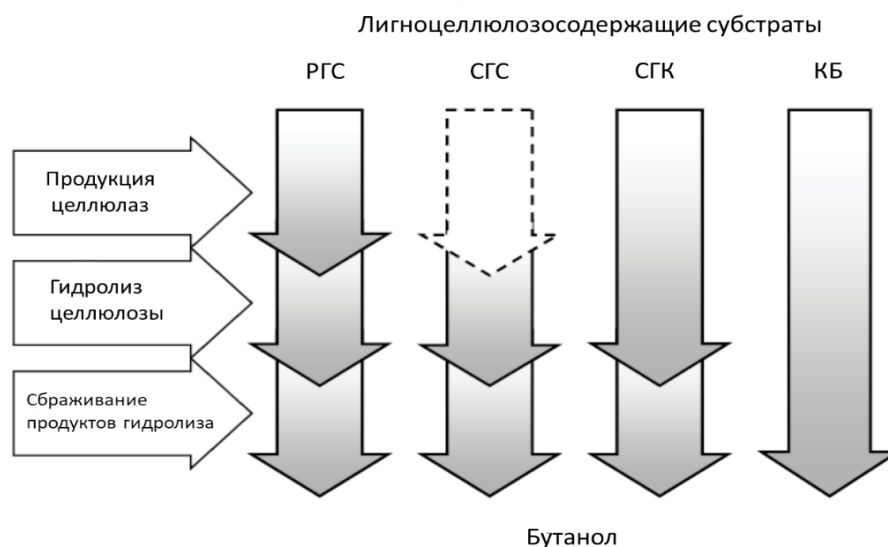


Рисунок 9. Биотехнологические стратегии микробного биосинтеза биобутанола из целлюлозосодержащих субстратов (с изменениями по Cao et al., 2016)

Для процессов РГС, СГС и СГК на этапе гидролиза ЦСС необходимым условием является внесение комплекса ферментов, включающего целлюлазы, β -глюкозидазы, эндоглюконазы и ксиланазы (Scott et al., 2013). РГС-процесс проводят в трех отдельных ферментерах (гидролиз ЦСС субстрата; сбраживание образующихся гексоз; сбраживание образующихся пентоз), осуществляемое различными видами микроорганизмов). В СГС и СГК на первом этапе гидролиза помимо ферментных препаратов также используют живые культуры целлюлозолитических микроорганизмов. При этом в СГС-процессе одновременно с гидролизом происходит сбраживание продуктов гидролиза ЦСС сахаролитическими бактериями, а в СГК-процессе сбраживание гексоз происходит совместно с гидролизом и отдельной стадией становится сбраживание пентоз (используется отдельный ферментер). В консолидированном биопроцессинге все перечисленные выше процессы протекают одновременно (Brethauer and Studer, 2014; Cao et al., 2016).

Сравнительный анализ используемых технологий СГС, СГК и КБ продемонстрировал, что в этих процессах происходит сглаживание эффекта ингибирования активностей целлюлазы и β -глюкозидазы конечными продуктами, что позволяет уменьшить инвестиционные затраты на масштабирование этих технологий по сравнению с использованием трёхэтапного РГС-процесса (Olofsson et al., 2008). Однако, одним из существенных преимуществ последнего является то, что стадия гидролиза ЦСС протекает при температуре около 50 °С, оптимальной для действия целлюлаз и образующих их целлюлозолитиков, прежде всего термофильных клостридий, а последующее сбраживание образованных углеводов в АБЭ-продукты проходит при температурах 30-35 °С, при которых наиболее активны сольвентогенные продуценты. Таким

образом, использование отдельных систем ферментеров позволяет поддерживать оптимальные условия и осуществлять более эффективный биотехнологический процесс конверсии ЦСС в биобутанол (Cao et al., 2016). Кроме того, необходимо отметить также возможность проведения рециркуляции используемых ферментов и культур микроорганизмов, что не удаётся сделать, например, для процесса СГК, поскольку обе стадии гидролиза и сбраживания сахаров проходят в одном биореакторе (Olofsson et al., 2008). Таким образом, для промышленного получения биобутанола из лигноцеллюлозного сырья РГС-процесс используется и исследуется наиболее часто (таблица 5).

Таблица 5. Образование биобутанола из ЦСС в РГС и СГК процессах (по Cao et al., 2016)

Микроорганизм	Процесс	Субстрат	Концентрация бутанола, г/л	Выход бутанола, г/г субстрата	Ссылка
<i>C. beijerinckii</i> BA101	РГС	Кукуруза	6,4	0,138	Zhang et al., 2012
<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052	РГС	Кукурузные початки	5,6	0,13	Hipolito et al., 2007
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	РГС	Крахмал из саговой пальмы	10,4	0,29	Ranjan, Moholkar, 2013
<i>C. acetobutylicum</i> MTCC 481	РГС	Рисовая солома	2,1	1,04	Zhao et al., 2011
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	СГК	Сведа (сем. <i>Amaranthaceae</i>)	3,5	0,101	Qureshi et al., 2008
<i>C. beijerinckii</i> P260	РГС	Солома пшеницы	7,4	0,113	Lynd et al., 2005
	СГК		8,09	0,085	
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	РГС	Солома пшеницы	7,05	0,141	Wang et al., 2013
	СГК		5,05	0,08	

КБ-процесс - это консолидированный биопроцессинг, при котором образование целлюлаз, гидролиз ЦСС и сбраживание продуктов гидролиза протекает в одном ферментере с использованием как монокультур (в основном рекомбинантных микроорганизмов), так и при ко-культивировании двух или нескольких различных микроорганизмов. Консолидированный биопроцессинг позволяет минимизировать количество используемых реакторов (ферментеров) и упростить режим культивирования микроорганизмов, особенно в случае их сходного отношения к абиотическим факторам (температура, перемешивание, аэрация) и составу среды. Например, при использовании мезофильной клостридиальной бинарной культуры *C. beijerinckii* и *C. cellulovorans* гидролиз и ферментация происходят одновременно при 37 °C (Wen et al., 2017). Сравнительный анализ образования цен при использовании технологии КБ и СГК на примере производства биоэтанола показал, что с учетом затрат, связанных с работой производства (оплата электроэнергии и водоснабжения), стоимость биотоплива за галлон (около 3,7 л) составила 0,04 USD при использовании КБ-процесса и 0,19 USD - при работе производства по СГК схеме (Aden et al., 2002; Lynd et al., 2005).

Ключевым вопросом в развитии технологии консолидированного биопроцессинга остается поиск микроорганизмов, отличающихся способностью к высокоэффективной утилизации целлюлолозосодержащих субстратов и образованию АБЭ-продуктов. Различают две основные стратегии по подбору штаммов микроорганизмов, трансформирующих ЦСС в биотопливо: первая, «нативная», заключается в селекции природных активных видов и штаммов целлюлозолитиков, с возможным последующим редактированием их свойств с помощью направленного мутагенеза или трансформации с целью получения, например, культур с повышенной устойчивостью к конечным продуктам и органическим кислотам; вторая стратегия, «рекомбинантная», заключается в модификации геномов не целлюлозолитических микроорганизмов, например за счет гетерологичной экспрессии целлюлаз. Так, образующий этанол штамм *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* за счет экспрессии генов, ответственных за синтез CipA (cellulosome integrating protein) из целлюлосомы *C. thermocellum* приобрел способность к эффективному разложению гемицеллюлозы (Lynd et al., 2002; Akinosho et al., 2014; Mbaneme-Smith and Chinn, 2015).

У *C. acetobutylicum* имеется 11 белков, ответственных за синтез компонентов целлюлосом (Sabathe et al., 2002). Большинство этих генов (CAC910-CAC919) организовано в кластер, гомологичный последовательностям генов целлюлозолитических видов *C. cellulolytic* и *C. cellulovorans*. Показано, что гликогидролаза CAC3469 является гомологом эндоглюконазы EngE *C. cellulovorans*, а когезиновые модули CAC914 и CAC 910 являются ортологами скаффолдинов HbrA и CbrA. Помимо этого, вне кластера, кодирующего гены целлюлосом, были обнаружены гены внеклеточных ферментов семейства гликозилгидролаз: эндо-1,4-β-глюконаза (GH5), α-глюкозидаза (GH31) и целлобиогидролазы (GH48). Предполагают, что одной из причин отсутствия роста культуры *C. acetobutylicum* на целлюлозосодержащих субстратах является разница в уровнях экспрессии генов целлюлозолитического комплекса. Это также подтверждает отсутствие у штамма способности образовывать целлюлосомы (Nolling et al., 2001; Lopez-Contreras et al., 2003). Оверэкспрессия отдельных белков, например, гликозилгидролаз Cel8A и Cel9B, привела к увеличению синергизма действия комплекса ферментов, однако, рост культуры на лигноцеллюлозосодержащих субстратах (пшеничная солома) отмечен не был (Kovacs et al., 2013). Интеграция в клеточную стенку синтетического комплекса мини-целлюлосомы за счет экспрессии генов целлюлаз Cel9G и Cel48F, хитиназы Xyn10A, а также оверэкспрессии генов, ответственных за синтез поверхностных белков сортаз (SrtA), ковалентно связывающих другие ферменты, также не привела к положительному результату по деградации *C. acetobutylicum* лигноцеллюлозных субстратов (Willson et al., 2016).

Более перспективными выглядят результаты исследований по включению генов «бутанольного» метаболизма в геном целлюлозолитических штаммов (таблица 6) и работы в

области составления многокомпонентных микробных сообществ, способных синтезировать АБЭ-продукты из ЦСС (Xin et al., 2018).

Таблица 6. Монокультуры рекомбинантных микроорганизмов, используемые в консолидированном биопроцессинге для образования биотоплива (изменено по Brethauer and Studer, 2014; Tsvetanova et al., 2018)

Микроорганизм	Субстрат, г/л	Продукт (г/л)	Ссылка
<i>C. acetobutylicum</i> GS4-3	Маниок (клубни), 90	<i>n</i> -бутанол (20,1)	Li et al., 2016
<i>S. cerevisiae</i> Y294[CEL5]	Целлюлоза, гидролизованная фосфорной кислотой, 10	этанол (1,0)	Yamada et al., 2011
<i>C. cellulolyticum</i> ldh/mdh	Целлюлоза Avicel, 10	этанол (2,6)	Li et al., 2012
<i>C. thermocellum</i> M1570	Целлюлоза Avicel, 40	этанол (14,0)	Argyros et al., 2011
<i>C. cellulovorans</i>	Целлюлоза	<i>n</i> -бутанол (1,4)	Yang et al., 2015
<i>T. saccharolyticum</i> Δldh, ermR	Ксилоза, 10	<i>n</i> -бутанол (1,0)	Bhandiwad et al., 2014
<i>C. cellulolyticum</i> H10 kinv yqhD alsS ilvCD	Целлюлоза Avicel, 10	изобутанол (0,7)	Higashide et al., 2011
<i>E. coli</i> LY01/pRE1H-AEB	Целлюлоза, гидролизованная фосфорной кислотой, 10	этанол (3,6)	Ryu, Karim, 2011

Среди рекомбинантных штаммов, указанных в таблице 6, можно выделить культуру *C. acetobutylicum* GS4-3, полученную в результате мутагенеза и рекомбинации геномов *C. acetobutylicum* GX01 и *Lactobacillus mucosae* M26, в результате чего полученный штамм обладает более высокой амилолитической активностью и в оптимальных условиях культивирования способен образовывать *n*-бутанол с выходом до 20 г/л и продуктивностью 0,35 г/(л*ч), тогда как дикий тип *C. acetobutylicum* GX01 в этих же условиях образует лишь 16 г/л, а его продуктивность составляет 0,25 г/(л*ч) (Li et al., 2016).

По сравнению с монокультурами отдельных бактерий, использование ко-культур микроорганизмов (таблица 7) позволяет расширить спектр используемых ими субстратов за счет большего разнообразия продуцируемых ферментов, однако, составление бинарных культур требует тщательного подбора оптимальных условий совместного культивирования микроорганизмов (Nakayama et al., 2011; Brethauer and Studer, 2014). Для получения из ЦСС таких продуктов, как этанол и *n*-бутанол, например, подобраны консорциумы на основе различных групп микроорганизмов, где партнёрами выступают бактерии-бактерии, микромицеты-бактерии, микромицеты-дрожжи-бактерии (Wen et al., 2017). Несмотря на то, что наиболее известные продуценты целлюлаз - микромицеты из родов *Trichoderma* sp. и *Aspergillus* sp. практически не используются в КБ-процессах для получения *n*-бутанола при ко-культивировании с кластридиями (которым в отличие от грибов необходимы анаэробные условия для роста, а, следовательно, и дополнительный ферментёр), возможным становится использование микромицетов для получения этанола. Совместное культивирование целлюлозолитического мицелиального гриба *T. reesei* и дрожжей, образующих этанол *Saccharomyces cerevisiae* и

Scheffersomyces (Pichia) stipites, позволило повысить выход этанола с 7,2 г/л до 9,8 г/л, что значительно превышает продуктивность многих известных монокультур, использующих целлюлозосодержащие субстраты (таблица 5; Brethauer and Studer, 2014).

Таблица 7. Сравнение продуктивности различных ко-культур, трансформирующих целлюлозосодержащие субстраты в продукты АБЭ-брожения

Ко-культура	Субстрат	Бутанол	Ацетон	Этанол	Ссылка
<i>C. thermocellum</i> + <u><i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4</u>	целлюлоза (Avicel)	7,9 г/л	< 1 г/л	< 2 г/л	Nakayama et al., 2011
<i>C. thermocellum</i> + <u><i>C. saccharoperbutylacetonicum</i></u>	Делигнифицированная рисовая солома	5,5 г/л	-	< 1 г/л	Kyioshi et al., 2015
<i>C. thermocellum</i> + <u><i>C. acetobutylicum</i></u>	Целлюлоза (Solka-Flock)	0,3 г/л		1 г/л	Yu et al., 1985
<i>C. celevecrescens</i> N3-2 + <u><i>C. acetobutylicum</i> 824</u>	Фильтровальная бумага	2,69 г/л	-	0,89 г/л	Wang et al., 2015
<i>C. cellulovorans</i> + <u><i>C. beijerinckii</i></u>	Кукурузные початки, после щелочного гидролиза	8,3 г/л	2,64 г/л	0,87 г/л	Wen et al., 2014
<i>C. thermocellum</i> + <u><i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i></u>	Целлюлоза	-	-	38 г/л	Argyros et al., 2011
<i>C. thermocellum</i> + <u><i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> X514</u>	Целлюлоза	-	-	12,2 г/л	He et al., 2011

Обозначения: **жирным** шрифтом выделены целлюлозолитические микроорганизмы, подчеркнутым - АБЭ-продуценты.

Поскольку ко-культуры составлены искусственно, регуляция активности ферментов и синергизм их действия в таких системах требуют более детального изучения (Wen et al., 2017). В таблице 7 приведены примеры клостридиальных бинарных культур, используемых в КБ-процессе. Количественный выход АБЭ-продуктов таких бинарных культур значительно варьирует (от 0,3 г/л до 8,3 г/л бутанола и от 0,87 г/л до 38 г/л этанола) в зависимости от используемых микроорганизмов, типа субстрата и его исходной концентрации. Все это свидетельствует о необходимости всестороннего и более глубокого изучения условий культивирования, включая способы инокуляции, соотношение и плотность клеток обоих штаммов, подбор температурных режимов, изучение взаимодействий между штаммами и образующимися соединениями, а также разработку методов генной инженерии для улучшения путей биоконверсии целлюлозы в биобутанол (Wen et al., 2017; Xin et al., 2018). При этом работы по составлению бинарных или смешанных ко-культур представляют одинаковый интерес как для биотехнологических, так и для фундаментальных исследований взаимодействия микроорганизмов, что может приводить к изменению уровня экспрессии основных ферментов и перестройке их метаболизма.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Микроорганизмы и условия их культивирования

Изучение целлюлозолитической активности грибов проводили на культурах микромицетов *Aspergillus terreus* штамм № 2 из коллекции кафедры микробиологии МГУ и *Trichoderma viride*, ранее выделенной из ризопланы *Dendrobium moschatum* (Buch. - Ham.) Swartz. (Цавкелова и др., 2003). Грибы культивировали на минеральной среде Чапека-Докса. В качестве источника углерода вносили сахарозу в количестве 30,0 г/л или целлюлозосодержащие материалы: обеззоленные фильтры МРТУ 6-06-2411-65, журнальную, газетную и офисную бумагу с черно-белой печатью и гофрированный картон, которые предварительно разрезали на кусочки 0,5 см². Для получения посевного материала культуры грибов предварительно подращивали на агаризованной (1,5 %) среде Чапека-Докса в течение 7 суток. Инокулят вносили либо в виде фрагментов (0,2 - 0,5 см) мицелия из расчета 2 см²/100 мл среды, либо в виде суспензии спор, для чего с выросших на скошенном агаре колоний проводили смыв стерильной водопроводной водой (3 мл на 100 мл среды). Для культивирования на роторном шейкере (150 об/мин) посевной материал вносили в 100 мл среды в качалочные колбы. Инкубацию проводили при 28-30 °С в темноте в течение 3-10 суток на качалке (180 об/мин).

Культивирование анаэробных микробных сообществ, образующих биогаз, проводили на среде следующего состава (г/л): K₂HPO₄ - 1,0; KH₂PO₄ - 1,0; NH₄Cl - 2,5; MgSO₄ * 7H₂O - 0,5; CaCl₂ * 6H₂O - 0,1; NaCl - 0,1; CaCO₃ - 1,0; NaHCO₃ - 5,0; дрожжевой экстракт - 2,0; пептон - 1,0; раствор микроэлементов - 1 мл; резазурин - 0,5 мг/л; вода дистиллированная - 1000 мл; pH = 7,0-7,5. Раствор микроэлементов содержал (мг/л): ZnCl₂ - 70,0; MnCl₂ * 4H₂O - 100,0; CoCl₂ * 6H₂O - 190,0; H₃BO₃ - 6,0; Na₂MoO₄ * 2H₂O - 36,0; CuCl₂ * 2H₂O - 2,0; NiCl₂ * 6H₂O - 24,0; Na₂WO₄ * 2H₂O - 15,0; FeSO₄ * 7H₂O - 1,0 г/л. Сульфат железа предварительно растворяли в 10 мл 25 % HCl; вода дистиллированная - 990 мл; pH среды = 7,0.

В качестве субстрата использовали отдельно взятые целлюлозосодержащие материалы или смесь бумажной продукции, состоящую из картона, фильтровальной, журнальной, газетной и офисной бумаг. В качестве офисной бумаги использовали нехлорированную бумагу 80 г/м² «SvetoCopy» и «Снегурочка» с черной печатью (лазерный монохромный принтер Samsung Xpress SL-M2070, чернила Samsung/Xerox universal type JLT-037UP). Кроме того, использовали фитомассу - высушенные и размельченные листья и стебли топинабура (*Helianthus tuberosus* L.), которые вносили в количестве 10-15 г/л в зависимости от целей эксперимента. Бумагу

предварительно измельчали (разрезали) на фрагменты 0,5 см², а фитомассу топинамбура после высушивания измельчали в гомогенизаторе на фрагменты длиной 1 см.

Для селекции метаногенных целлюлозоразлагающих микробных сообществ посевной материал для их культивирования вносили в 30 мл питательной среды во флаконы объёмом 100 мл в количестве 10 % (об/об). В качестве инокулята использовали навоз крупного рогатого скота, копытных животных и грызунов, донные осадки водоёмов, а также ранее полученные микробные сообщества, также выделенные из различных природных и антропогенных источников (Цавкелова и др., 2012), некоторые для получения наиболее эффективных комбинаций объединяли вместе. Так, суммарное микробное сообщество, обозначенное как «Σ4» состояло из исходных микробных сообществ № 6, 17, 19 и 21 (таблица 8), изолированных из навоза КРС, донных осадков и помёта зебры и антилопы.

Таблица 8. Источники посевного материала для некоторых используемых сообществ (Цавкелова и др., 2012б)

№ сообществ	Названия места (источника) отбора проб
1	Компостная куча № 1 (Московская обл.)
3	Жом красного винограда (Дагестан)
6	Навоз крупного рогатого скота (КРС) №1 (Московская обл.)
17	Донные осадки пруда №2 (Тверская обл.)
19	Навоз зебры (Зоопарк, Москва)
20	Навоз пони (Зоопарк, Москва)
21	Навоз антилопы гну (Зоопарк, Москва)
22	Навоз черной антилопы (Зоопарк, Москва)

Сообщество «Σ7» дополнительно содержало инокулят из жома красного винограда, навоза пони и черной антилопы (исходные сообщества № 3, 20 и 22, соответственно). Для получения накопительных культур с целью выделения активных сообществ, утилизирующих пивную дробину пивоваренного завода (Московская обл.) в качестве инокулята использовали навоз КРС, лошадей, перегной из компоста (Конаковский район, Тверская область), опавшие прелые листья (Московская область), навоз кроликов и грызунов (морские свинки, крысы, шиншиллы). Пивную дробину вносили в количестве 15, 50, 100, 200 и 500 г/л среды. В ряде случаев также добавляли косубстрат (фитомассу топинамбура) в количестве 10 % от объема среды (Malakhova et al., 2015).

Флаконы герметично закрывали резиновой пробкой, закатывали алюминиевым колпачком и заменяли воздушную газовую фазу на аргон (Ar). Культуры инкубировали в темноте при температуре 55 °С (термофильные сообщества) и 30 °С (мезофильные сообщества) в термостате (Binder BD 115, Германия). Активность микроорганизмов определяли по приросту метана в составе биогаза. Стабильность выбранных сообществ проверяли пересевом на свежую питательную среду после достижения сообществом максимальной продукции биогаза с последующим выходом на плато или уменьшением количеств образуемого биогаза.

Для изучения влияния предобработки целлюлозосодержащих материалов с помощью грибов, биомассу *A. terreus*, полученную после предкультивирования микромицетов на среде Чапека-Докса с офисной бумагой (15 г/л) в течение 10 суток и отделённую фильтрованием, использовали для последующего её дображивания микробными анаэробными сообществами. Грибную биомассу вносили в культивационные флаконы для микробных сообществ в соответствии с таблицей 9. Для определения влияния состава питательной среды на активность *A. terreus* помимо целлюлозосодержащих субстратов (офисная бумага, 15 г/л), в питательную среду дополнительно вносили (+), либо нет (-) косубстрат - углевод сахарозу в количестве 30 г/л, который согласно Matkar с соавторами (2013) повышает экспрессию целлюлаз у микромицетов. Для определения возможного влияния способа инокуляции на последующую активность микромицета проводили засев суспензией спор или фрагментами мицелия (как описано выше). В качестве дополнительной термической обработки, помимо нативной биомассы микромицета, отделённой фильтрованием после его культивирования на офисной бумаге, использовали ту же биомассу, дополнительно подвергнутую термической обработке (автоклавирование при 1 атм, 121 °С, 30 мин). Биомассу, которую предполагалось использовать для дальнейшего дображивания анаэробными сообществами, вносили во флаконы в жидком виде вместе с культуральной жидкостью (КЖ; конечный объем 30 мл), либо разбавляли в два раза питательной средой для метаногенов (15 мл). Флаконы для культивирования микробных сообществ герметично закрывали и проводили замену газовой фазы на Ar, инокуляцию анаэробными микробными сообществами проводили шприцами в количестве (3 мл) и культивировали при температуре 55 °С.

Таблица 9. Условия культивирования микромицета *Aspergillus terreus* и способ обработки его биомассы после биоразложения целлюлозосодержащих субстратов

Дополнительный источник углерода (сахароза) в среде культивирования гриба	Способ засева (инокулят)	Количество субстрата (грибная биомасса +КЖ), для внесения во флаконы, мл	Тип биомассы
- сахароза ¹	Фрагмент мицелия	30	нативная ²
			термически обработанная (ТО)
		15	нативная
			ТО
	Суспензия спор	30	нативная
		15	
+ сахароза (30 г/л)	Фрагмент мицелия	30	нативная
			ТО
		15	нативная
			ТО
	Суспензия спор	30	нативная
		15	

Для изучения влияния предобработки субстрата и динамики культивирования другого микромицета, *T. viride*, на эффективность биоразложения целлюлозосодержащих субстратов (офисная бумага, смесь бумаг и фитомасса топинамбура) использовали следующую схему эксперимента: гриб культивировали на среде Чапека-Докса без внесения сахарозы в течение 9 суток, при этом отбор проб для последующего дображивания анаэробными микробными сообществами проводили в начальной (нулевой) точке, а также на 3, 5 и 9 сутки культивирования микромицета. Для этого 15 мл культуры гриба после выращивания на целлюлозосодержащем субстрате центрифугировали (7000 об/мин, в течение 20 мин) и осадок переносили во флакон для анаэробных сообществ, добавляли 30 мл среды для метаногенных сообществ, проводили замену газовой фазы, как описано выше, и засевали посевным материалом в количестве 10 % (по объему). Культивирование микробных сообществ проводили в термофильных условиях при 55 °С.

Для **создания бинарно-последовательных культур** с биотехнологическим потенциалом для сопряженной биоконверсии целлюлозы в бутанол использовали дикие штаммы *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 и *C. thermocellum* DSM 1237 из коллекции лаборатории профессора Х. Баля (Ростокский университет, Германия) и коллекции микроорганизмов DSMZ, соответственно. Кроме того, был использован трансгенный штамм *C. acetobutylicum* rex:int, отличающийся инактивацией гена CAC2713, кодирующего Red-Ox чувствительный транскрипционный репрессор Rex, и также любезно предоставленный проф. Х. Балем.

Примечания:

¹ «- сахароза» - сахарозу в среду не вносили; «+ сахароза (30 г/л)» - в среду дополнительно вносили источник углеводов - сахарозу в количестве 30 г/л.

² нативная - живая биомасса микромицетов, в отличие от проавтоклавированной («убитой») биомассы (1 атм, 121°C, 30 мин).

Для поддержания роста *C. acetobutylicum* DSMZ 824 использовали среду CGM (clostridial growth medium), г/л: дрожжевой экстракт - 5,0; $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ - 0,75; KH_2PO_4 - 0,75; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ - 0,71; $MnSO_4 \cdot H_2O$ - 0,01; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ - 0,01; NaCl - 1,0; аспарагин - 2,0; $(NH_4)_2SO_4$ - 2,0; резазурин - 0,5 мг/л; вода дистиллированная - до 1 л. Раствор глюкозы в концентрации 50 г/100 мл готовили и стерилизовали отдельно, и добавляли к среде после стерилизации из расчёта 100 мл на 1 л среды. Для увеличения количества клеток, содержащих споры, использовали среду MS-MES (medium synthetique, синтетическая среда с использованием буфера MES [2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота]), г/л: глюкоза - 60,0; K_2HPO_4 - 0,55; KH_2PO_4 - 0,55; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ - 0,22; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ - 0,011; уксусная кислота - 2,3 мл; затем подводили pH до 6,6 с помощью NH_4OH , после чего добавляли витамины: пара-аминобензойную кислоту (ПАБК) - 10 мл (8 мг/л) и биотин - 1 мл (0,08 мг/л); MES - 21,23; резазурин - 0,5 мг/л и доводили дистиллированной водой до конечного объёма 1 л. Для культивирования мутантного штамма *C. acetobutylicum* rex:nt в среду добавляли антибиотик эритромицин в концентрации 30 мкг/мл.

Среду предварительно кипятили для удаления остаточного кислорода и разливали во флаконы объёмом 200 мл или пробирки Хангейта объёмом 10 мл, которые закрывали резиновыми пробками и алюминиевыми или пластиковыми колпачками, а газовую фазу заменяли на азот продуванием. Культивирование этого вида мезофильных клостридий проводили в анаэробных условиях при 37 °C, посевной материал вносили в количестве 10 % от объема среды и пастеризовали 15 минут при 80 °C. Для хранения культуру выращивали на MS-MES среде в течение 5 суток, после чего хранили при -20 °C.

Для культивирования термофильного вида целлюлозолитических клостридий, *C. thermocellum* DSM 1237, а также для выделения других целлюлозолитических бактерий из накопительных культур анаэробных микробных сообществ была использована среда GS2 (Johnson et al., 1981), г/л: дрожжевой экстракт - 6,0; K_2HPO_4 - 2,9; мочевины - 2,1; KH_2PO_4 - 1,5; $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ - 2,9; MOPS - 10,0; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 0,1; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 0,015; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,01 мг; резазурин - 0,01 %; вода дистиллированная. Также использовали среду CM3 (Atlas, 1946; среда № 520 из коллекции DSMZ), г/л: $(NH_4)_2SO_4$ - 1,3; KH_2PO_4 - 1,5; $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ - 2,9; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ - 0,1мг; раствор микроэлементов SL-10 - 1,00 мл; дрожжевой экстракт - 2,0; резазурин - 0,5 мг/л; $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ - 0,2; $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ - 0,075; вода дистиллированная; pH = 7,2. Состав раствора микроэлементов (SL-10, среда № 320 из коллекции DSMZ), мг/л: HCl (25 %; 7,7 М) - 10,0 мл; $FeCl_2 \cdot 4 H_2O$ - 1,5 г; $ZnCl_2$ - 70,0; $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ - 100,0; H_3BO_3 - 6,0; $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ - 190,0; $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$ - 2,0; $NiCl_2 \cdot 6 H_2O$ - 24,0; $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ - 36,0; вода дистиллированная.

В ходе работы были также исследованы бинарно-последовательные культуры: *C. acetobutylicum* и *C. thermocellum*, а также проведено сопряжённое культивирование микробного сообщества и *C. acetobutylicum*. В англоязычной литературе при описании экспериментов по совместному культивированию нескольких микроорганизмов или консорциумов в консолидированном биопроцессинге применяют термины «бинарная культура», «смешанная культура», «ко-культивирование» и последовательное ко-культивирование (от англ. sequential co-culture). При этом культивирование проводится в одном ферментере при едином температурном режиме (Wen et al., 2017), или же это может быть последовательное культивирование двух микроорганизмов в термофильном и мезофильном режимах с целью повышения полноты утилизации субстрата (Nakayama et al., 2011). В контексте данной работы мы используем термины - смешанное последовательное культивирование, бинарно-последовательные культуры и ко-культивирование для описания двухстадийного процесса биоконверсии ЦСС в продукты ацетоно-бутилового брожения. Для этих целей были отобраны селектированные нами в процессе работы микробные сообщества $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$, имеющие высокую активность в отношении эффективной утилизации ЦСС (глава 3.3), а также исходное сообщество микроорганизмов, выделенное из навоза крупного рогатого скота (КРС), которые были использованы как компоненты комплексных (бинарных смешанных) культур с клостридиями, осуществляющими ацетоно-бутиловое брожение.

Согласно методике (Yanling et al., 1991), все микробные сообщества были предварительно подвергнуты тепловой обработке (10 мин, 90 °C), что позволило элиминировать метанобразующих архей. Полученные целлюлозолитические консорциумы выращивали на минеральной среде CM3, в качестве субстрата использовали фильтровальную бумагу в количестве 15 и 20 г/л. Посевной материал вносили в количестве 10 % от объема среды (10 мл на 100 мл среды). После инкубации в течение 15 суток при температуре 55 °C проводили инокуляцию мезофильным штаммом *C. acetobutylicum* 824 (10 % от объема среды) и продолжали культивирование при 37 °C в течение 10-11 суток.

Для культивирования бинарно-последовательной культуры *C. thermocellum* предварительно выращивали на среде GS2 (субстрат – 10 г/л фильтровальной бумаги) при 60 °C, а *C. acetobutylicum* - на среде CGM с глюкозой при 37 °C. Так как штаммы имеют разные температурные оптимумы, культивирование проводили в два этапа: на первом этапе - культивировали *C. thermocellum* до полной деструкции целлюлозы (6-7 суток) при 60 °C, осуществляя контроль pH (7,0), на втором этапе - инокулировали *C. acetobutylicum*, меняли условия культивирования (температура – 37 °C, pH перед инокуляцией доводили до 6,5; во время культивирования pH не подводили). В качестве среды была выбрана CM3, культивирование проводили в 100 мл в анаэробных флаконах на 200 мл. Посевной материал отбирали в

экспоненциальной фазе роста и вносили в количестве 10 % от объема среды. В качестве ЦСС использовали фильтровальную бумагу в количестве 10, 15, 20 и 40 г/л.

Для увеличения выхода продуктов ацетоно-бутилового брожения дополнительно был проведен эксперимент по вторичному засеву (реинокуляция) смешанной культуры штаммом *C. acetobutylicum*. Для этого по описанной выше методике были подготовлены ко-культуры, при этом в качестве контроля использовали бинарно-последовательную культуру без реинокуляции. Субстратом служила фильтровальная бумага в концентрации 20 г/л. На 6 сутки совместного культивирования *C. thermocellum* и *C. acetobutylicum* подводили pH до 6,5 и повторно вносили инокулят *C. acetobutylicum* (10 % по объему), кроме контрольной ко-культуры, куда вносили в том же объеме среду.

2.2. Выделение чистых культур целлюлозолитических бактерий из анаэробных микробных сообществ

Для получения отдельных изолятов микроорганизмов из накопительной культуры термофильного целлюлозолитического анаэробного микробного сообщества были сделаны высевы из последовательных десятикратных разведений исходных культур (до 10^{-10}) в толщу агаризованных минеральных сред CM3 и GS2, содержащих в качестве субстрата микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ, «Macherey-Nagel», Германия) в концентрации 5 г/л или целлобиозу в концентрации 10 г/л. Посевной материал в объеме 100 мкл вносили в расплавленную и охлажденную среду, перемешивали и разливали в чашки Петри. Культивирование засеянных чашек Петри проводили в анаэробном боксе в течение 2-3 суток при 55 °С. После появления единичных колоний их пересекали в жидкую среду с фильтровальной бумагой в качестве субстрата. Из пробирок, в которых наблюдали деградацию субстрата делали дополнительные посевы на чашки, а полученные колонии культивировали в жидкой среде в течение не менее трех пассажей для того, чтобы убедиться, что культуры не теряют способность к деградации целлюлозы (по Koeck et al., 2015).

Для получения отдельных колоний также использовали способ посева на двухслойные агаризованные среды (Lv and Yu, 2012), при котором в качестве нижнего слоя использовали минеральную среду с 2 %-ым «голодным агар-агаром» без источника углерода, а верхний слой содержал 0,8 % CM3-агар с МКЦ или PASC (phosphoric acid swollen cellulose, целлюлоза, гидролизованная с помощью фосфорной кислоты по Zhang et al., 2006). Посевной материал в объеме 100 мкл вносили в расплавленный и охлажденный верхний слой, перемешивали и заливали в чашки Петри с уже застывшим нижним слоем. Отдельные колонии после их появления отбирали с помощью иглки шприца или носиком для автоматической

пипетки и высевали в жидкую среду с фильтровальной бумагой в качестве субстрата, после чего культуру поддерживали пересевами в течение не менее трех пассажей.

2.3. Газовая хроматография

Определение концентраций метана (CH_4), углекислого газа (CO_2) и водорода (H_2) осуществляли методом газовой хроматографии на хроматографе Кристалл 2000 М («Хроматэк», Россия), оснащенном микрокапиллярной колонкой ZB-FFAP (Zebron, USA (15 000 мм * 0,25 мм * 0,25 мкм), газ-носитель - аргон, расход 15 мл/мин с пламенно-ионизационным детектором, температура детектора 200 °С, температурный градиент в термостате - от 70 до 160 °С. Результаты хроматографии обрабатывали с помощью программного обеспечения Chromatec Analytic 2,5 («Хроматэк», Россия). Активность газообразования оценивали, измеряя избыточное давление в герметично закрытых флаконах с культивируемым сообществом в динамике в течение всего периода культивирования. Концентрации газов в смеси и кумулятивное содержание метана определяли при нормальных условиях температуры (0 °С) и давления (1 атм) по следующей формуле:

$$A = (\sum V_{\text{газа}} / \sum V_{\text{смеси}}) * 100, \quad (9)$$

где $\sum V_{\text{газа}}$ - суммарный объем индивидуального газа, определяемый с учётом потерь при отборе проб для хроматографического определения состава газовой смеси;

$\sum V_{\text{смеси}}$ - суммарный (кумулятивный) объём смеси газов, образовавшихся за период культивирования, также с учётом потерь;

$V_{\text{газа}}$ при нормальных условиях ($p = 1 \text{ атм}$, $t = 273,15 \text{ К} = 0 \text{ °С}$) определяли, используя уравнение состояния идеального газа (уравнение Клайперона-Менделеева), устанавливающее зависимость между давлением, молярным объемом и абсолютной температурой идеального газа.

В случае постоянной массы газа уравнение можно записать в виде

$$p * V / T = \text{const.} \quad (10)$$

$$V_{\text{газа}} = (p * V_{\text{ф}} * T_{\text{ну}} * a) / (p_{\text{ну}} * T * 100), \quad (11)$$

где a - концентрация газа, измеренная на хроматографе (%);

p - давление во флаконе (бар);

$p_{\text{ну}}$ - давление при нормальных условиях;

T - температура культивирования;

$T_{\text{нy}}$ - температура при нормальных условиях;

$V_{\text{ф}}$ - объём газовой фазы во флаконе с культивируемым сообществом.

Используя следствие из закона Авогадро, что при нормальных условиях один моль любого газа занимает объём, равный 22,4 л, можно определить количество молей вещества синтезированного газа $v = V_{\text{газ}}/22,4$.

Определение концентраций спиртов (этанол, ацетон и бутанол) и органических кислот (уксусная, масляная) осуществляли методом газовой хроматографии на хроматографе Agilent 7890A («Agilent Technologies», США), оснащённом колонкой Chromosorb 101 («Agilent», США (2 м × 2 мм), газ-носитель - азот, расход 30 мл/мин с пламенно-ионизационным детектором, температура детектора 230 °C, температурный градиент в колонке - от 155 до 197 °C. Результаты хроматографии обрабатывали с помощью программного обеспечения E2ChromElite («Agilent», США) и Microsoft Excel.

2.4. Оценка роста и развития микроорганизмов

Рост анаэробных микробных сообществ оценивали визуально по изменению цвета и мутности, изменению pH, образованию биогаза и разложению целлюлозосодержащих субстратов. При культивировании микромицетов определяли удельное содержание белка по методам Бредфорда (Bradford, 1976) или Лоури (Lowry et al., 1951). В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин. Для *A. terreus* определение проводили по методу Бредфорда. Для этого пробы фильтровали через фильтр Millipore и отбирали аликвоту, равную 120 мкл. К пробе добавляли 950 мкл реагента кумасси G250, растворённого в 95 % этаноле и 80 % ортофосфорной кислоте, инкубировали при комнатной температуре 2 минуты. Определение светопоглощения проводили при длине волны 595 нм на спектрофотометре (Hitachi 200-20, Япония). Для *T. viride* определение проводили по методу Лоури, поскольку среди образуемых этим грибом метаболитов были вещества, ингибирующие развитие окраски в случае определения содержания белка по методу Бредфорда. Пробы также фильтровали через фильтр Millipore и отбирали аликвоту, в которой содержание белка должно было составлять 4-40 мкг. Доводили объём раствора деионизованной водой до 0,3 мл и добавляли равное количество карбонатного буфера, инкубировали 10 мин при 50 °C, добавили 0,33 мкл щелочного раствора тартрата меди и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Затем вносили 1 мл реактива Фолина-Чокалтеу и инкубировали ещё 10 мин при 50 °C. Определение светопоглощения проводили при длине волны 650 нм на спектрофотометре (Hitachi 200-20, Япония).

Оценку содержания в культуральной жидкости редуцирующих сахаров проводили согласно методу Миллера (Miller, 1959). В качестве стандарта использовали глюкозу. После отбора аликвоты культуральной жидкости (1 мл) её смешивали с 3 мл динитросалициловой кислоты (ДНСК), инкубировали при 100 °С в течение 5 мин и измеряли светопоглощение при длине волны 540 нм на спектрофотометре (Hitachi 200-20, Япония).

2.5. Микроскопия

Для наблюдения за составом микробных сообществ и изменениями, происходящими в процессе культивирования микроорганизмов, использовали оптический световой микроскоп Nikon Eclipse E100 с фотонасадкой DS-Fi1 («Nikon», ФРГ). Для этого использовали фиксированные окрашенные препараты сообществ: аликвоту (100 мкл) отбирали стерильным шприцем, наносили на площадь 1,5 см² предметного стекла, высушивали, термически фиксировали и окрашивали водным раствором фуксина в течение 3 мин, промывали водой, высушивали и рассматривали под иммерсионным маслом при увеличении x900.

Также состав микробных сообществ анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для этого аликвоты культур на 3 и 10 сутки инкубации наносили на поверхность покровного стекла, высушивали на воздухе и фиксировали 2,5 % раствором глутарового альдегида в буфере PBS в течение 12 часов, после чего промывали водой и затем дегидратировали в растворах этанола с возрастающими концентрациями. После окончательного обезвоживания пробы помещали в абсолютный этанол, с последующим переносом и выдерживанием в течение ночи в 100 % ацетоне. Затем образцы высушивали углекислым газом в критической точке с использованием устройства HCP-2 (Hitachi, Япония), напыляли Au-Pd (ионный носитель Eiko IB-3, Hitachi, Япония) и микроскопировали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (Jeol, Япония).

2.6. Определение целлюлазной активности микроорганизмов

Определение целлюлазной активности микромицетов проводили в культуральной жидкости, для чего отбирали 5 мл культуры и фильтровали через фильтр Millipore с диаметром пор 0,45 мкм. Для определения β -1,4-эндоглюконазной активности использовали карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ). К 0,5 мл культуральной жидкости добавляли 0,5 мл раствора КМЦ и инкубировали 60 мин при 50 °С (Lakshmi and Narasimha, 2012). В качестве контроля использовали культуральную жидкость, которую в течение 30 с кипятили при 100 °С (для инактивации ферментов). Затем все пробы остужали, центрифугировали 2 мин при 4000 g. К 1

мл надосадочной жидкости приливали 3 мл ДНСК и инкубировали 5 мин при 100 °С. Полученный раствор колориметрировали при длине волны 540 нм на спектрофотометре (Hitachi 200-20, Япония).

Для определения общей целлюлазной активности использовали метод определения с фильтровальной бумагой (filter paper assay, Lakshmi and Narasimha, 2012). В пробирки эппендорф вносили 1 мл ацетатного буфера и фильтровальную бумагу (1*6 см), сложенную «гармошкой», после чего добавляли 0,5 мл культуральной жидкости, и инкубировали 60 мин при 50 °С. Приготовление контрольных образцов и проведение определения с ДНСК проводили, как описано выше.

2.7. Молекулярно-генетические методы изучения состава микробных сообществ

Для изучения структуры анаэробных целлюлозолитических метаногенных сообществ в работе использовали такие методы молекулярной биологии, как проведение различных типов ПЦР (полимеразная цепная реакция), DGGE-анализ (denaturing gradient gel electrophoresis; денатурирующий градиентный гель-электрофорез) и метагеномный анализ с помощью HTS (high-throughput sequencing) высокопроизводительного секвенирования на базе системы Illumina MiSeq.

2.7.1. Выделение (экстракция) ДНК

Для выделения ДНК 5 мл культур центрифугировали при 12000 *g* 5 мин, супернатант сливали, а биомассу замораживали при -20 °С. Далее к биомассе добавляли 500 мкл TNE буфера состава (100 mM Tris-HCl, pH=8; 150 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH=8) и 200 мг стеклянных шариков (0,1 мм в диаметре, Sigma, США). Клетки разрушали на приборе «Mini beadbeater-1» (BioSpec Products, США) в течение 3 минут при максимальной интенсивности, после чего к пробам добавляли 20 % SDS из расчета 10 мкл на 100 мл содержимого, перемешивали на вортексе и инкубировали при 50 °С 40 минут и 10 минут при 65 °С, центрифугировали при 6000 *g* в течение 5 мин при 4 °С. Супернатант переносили в новую пробирку и добавляли равный объем смеси фенол : хлороформ (1:1), перемешивали, не встряхивая, и центрифугировали 10 мин при 10 000 *g* и 4 °С. Супернатант (верхнюю фракцию) переносили в новую пробирку эппендорф и добавляли равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1), центрифугировали 10 мин при 10000 *g* и 4 °С. Верхнюю фазу переносили в новую пробирку и приливали равный объем 5 М ацетата калия. К одному объёму пробы добавляли 0,6 объема 80 % изопропанола, перемешивали не встряхивая, оставляли при комнатной температуре на 40-60 мин,

центрифугировали 10 мин при 4 °C и 10000 *g*. Супернатант сливали и промывали осадок 500 мкл 70 % этанола (10 мин при 4 °C и 10000 *g*). Супернатант сливали, осадок высушивали, после чего добавляли к нему 50 мкл воды MilliQ.

Также выделение ДНК проводили с помощью готового кита - набора FastDNA SPIN Kit for Soil (MP, США). Для этого после инкубирования супернатанта с 20 % SDS переходили к протоколу производителя.

Для анаэробных сообществ, выращиваемых на картонной и журнальной бумагах, дополнительно использовали модифицированную методику: начальные этапы проводили по описанной выше методике. После разрушения клеток на приборе «Mini beadbeater-1» (BioSpec Products, США) в течение 2 минут при максимальной интенсивности, добавили 40 мкл 20 % SDS и встряхивали ещё 5 сек. Инкубировали 1 час при 65 °C. Пробирки со смесью центрифугировали в течение 5 мин при 6000 *g*, супернатант переносили в новую пробирку эппендорф. Осадок ресуспендировали в 400 мкл TE (10мМ Трис-HCl, 1 мМ Na-ЭДТА) буфера, инкубировали 5 мин при 65 °C, затем центрифугировали 10 мин при 6000 *g*. К одной части объединенного супернатанта (~400 мкл) добавляли 0,5 объема (200 мкл) раствора NaCl (1,6 М) и инкубировали 2 часа при комнатной температуре (~22 °C). Смесью центрифугировали 10 мин при 10 000 *g*, сливали надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 300 мкл TE буфера. Затем добавляли ацетат калия (3 М) до конечной концентрации 0,5 М (60 мкл) и выдерживали на льду 5 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 16000 *g* и 4 °C. Водную фазу экстрагировали последовательно 300 мкл смеси фенол : хлороформ (1:1) и 300 мкл хлороформ : изоамиловый спирт (24:1), после чего продолжали выделение ДНК по описанной выше методике.

2.7.2. Электрофорез в агарозном геле

Для проведения электрофореза использовали 1 % агарозный гель. ДНК, полученную после экстракции или в результате проведения ПЦР, в объеме 5 мкл смешивали со стандартным красителем (бромфеноловый синий в глицерине) в соотношении 1:6 и полученную смесь наносили в лунки. В качестве маркера использовали коммерческие наборы GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder и Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Fermentas, Литва) в соответствии с инструкцией производителя. Разделение проводили в 1xTAE при 80 В 30 минут. Визуализацию полос ДНК проводили при 310 нм после окрашивания в интеркалирующем красителе SYBR Green I. Количественное содержание ДНК в образце измеряли на спектрофотометре Drop Sense-96 (Trinean, Belgium).

2.7.3. Условия проведения ПЦР

В качестве матрицы использовали геномную ДНК. Были подобраны универсальные праймеры, а также праймеры, специфичные для доменов архей и бактерий (таблица 10). Для вложенной ПЦР (nested PCR) использовали праймеры 63F-1387R для бактерий и 38F-1381R для архей, амплифицирующих почти полную длину 16S-ДНК. Для более четкого разделения ампликонов при последующем проведении ДГГЭ-анализа, к 5'-концу праймеров был добавлен олигонуклеотидный участок, так называемый, GC-кламп: к бактериальным Univ518F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GGT GBC AGC MGC CGC GGT AA-3') и Com1GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCA GCA GCC GCG GTA ATA C - 3'), а также архейному прайммеру Arch344F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GC GGG GGC ACG GGG GGA CGG GGY GCA GCA GGC GCG A-3').

Другим способом для DGGE-анализа было проведение one-step ПЦР с праймером Bact907R и праймером, содержащим GC-кламп, - Com1GC. Амплификацию проводили с использованием амплификатора «GeneAmp PCR System 9700» (Applied Biosystem, ФРГ), используя различные полимеразы: 5U / мкл Taq ДНК-полимеразу (Евроген, Россия) и полимеразу высокой точности Fusion (Thermo Scientific, США). ПЦР-смесь (25 мкл) содержала следующие компоненты (для Taq / Phusion, соответственно): 2,5 мкл 10 * / 5,0 мкл 5 * буфера, 2,5 mM / 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM / 0,2 mM каждого dNTP, 0,2 мкМ / 0,4 мкМ каждого праймера, 0,06 U / мкл Taq / 0,02 U / мкл Phusion DNA полимеразы) и 5-10 нг ДНК.

Таблица 10. Праймеры, использованные в работе

Праймер	Позиция	5'-3'	Специфичность	Ссылка
Bact 907R	907-926	CCGTCAATTCMTTTGAGTTT	бактериальная 16S rRNA	Muyzer, Smalla, 1998
Univ515F	515-533	GTGBCAGCMGCCGCGGTAA	универсальный	Kublanov et al., 2009
Com1	519-536	CAGCAGCCGCGGTAATAC	универсальный	Lane et al., 1985
Arch915R	934-915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	архейная 16S rRNA	Stahl, Amann, 1991
63F	63-83	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	бактериальная 16S rRNA	Stahl, Amann, 1991
1387R	1404-1387	GGGCGWGTGTACAAGGC	бактериальная 16S rRNA	Marchesi et al., 1998
Arch338F	338-359	GGCCCTAYGGGGYGCASCAGGC	архейная 16S rRNA	Kublanov et al., 2009
Arch1381R	1381-1402	GCGGTGTGTGCAAGGRGCAGGG	архейная 16S rRNA	Kublanov et al., 2009
Arch344F	344-363	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA	архейная 16S rRNA	Raskin et al., 1994

Условия проведения ПЦР были следующими (для Taq / Phusion, соответственно): денатурация двухцепочечной ДНК при 94 °С в течение 5 минут / 98 °С в течение 1 минуты, затем 25 циклов денатурации по 30 с/10 с при 94 °С/98 °С, 30 с отжиг праймеров в соответствии с таблицей 11, с последующим удлинением цепи в течение 1 минуты при 72 °С и на последнем этапе - элонгация 7 минут при 72 °С. Для one-step ПЦР был использован протокол touchdown-PCR: температура отжига (таблица 11) была увеличена на 10 °С, затем ее постепенно уменьшали на 1 °С с каждым вторым циклом ПЦР. Дополнительно проводили 10 циклов отжига и удлинения.

Таблица 11. Условия проведения ПЦР в соответствии с используемыми парами праймеров

Пары праймеров	Температура отжига, °С (Taq/Phusion polymerases)	Время элонгации, сек (Taq/Phusion polymerases)
Com1-Bact907R	50/60	30/30
63F-1387R	56/65	60/30
Arch338F-Arch1381R	62/72	45/30
Arch344F-Arch915R	60/70	40/30
Com1GC-Bact907R	50/60	30/30
Arch344F-Arch915R	60/70	40/30
Univ515F-Bact907R	55/-	30/-
Univ515F-Arch915R	65/-	30/-
Univ518F-GC-Bact907R	55/-	30/-
Univ515F-GC-Arch915R	55/-	30/-

Примечание: (-) - ПЦР с данными праймерами и полимеразой не проводили

2.7.4. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ, DGGE)

Разделение ампликонов, полученных после проведения ПЦР проводили на приборе TV400-DGGE (SCIE-PLAS, Англия) в полиакриламидном геле в градиенте концентраций денатурирующих агентов (мочевина и формамид) от 40 до 65 % в соответствии с методиками (Muyzer et al., 1998). Для приготовления геля использовали 50 мл раствора А, не содержащего денатурирующих агентов, который готовили смешиванием 10 мл 40 % акриламид-N,N'-метиленабисакриламида и 0,5 мл 50х ТАЕ, до конечного объема раствор доводили бидистиллированной водой. Раствор В, содержащий 100 % денатурирующих агентов, готовили в объеме 50 мл смешиванием 10 мл 40 % акриламид-N,N'-метиленабисакриламида, 0,5 мл 50х ТАЕ, 20 мл 40 % деионизированного формамида и 21 г мочевины (конечный объем доводили бидистиллированной водой). Оба раствора заливали для формирования градиента (для 40-65 %). Разделение проходило в течение 18-22 часов при температуре 60 °С и напряжении 70 В. После проведения электрофореза гель промывали бидистиллированной водой и окрашивали SYBR Green I (BioDye, Россия) в течение 40 мин в темноте, затем просматривали на трансиллюминаторе с длиной волны 470 нм. Полученные на фореграмме полосы вырезали стерильным скальпелем и помещали в 50 мкл дистиллированной воды MilliQ, оставляя на 18 ч при температуре 4 °С для

элюирования ДНК. Затем с ДНК, полученной из отдельной полосы, проводили ПЦР с соответствующими для реамплификации праймерами и визуализировали полученные ампликоны в 1,5 % агарозном геле. Из геля полосы вырезали и очищали с помощью набора «Cleanup Standard» (Евроген, Россия). Секвенирование по Сэнгеру очищенных проб 16S рРНК проводили в компании «Евроген» (Россия). Полученные частичные последовательности генов 16S рРНК депонировали в Gen-Bank и проводили сравнение с описанными ранее последовательностями, используя базу данных BLAST [NCBI (Национальный центр биотехнологии, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)].

В качестве контрольного образца ДНК при проведении DGGE анализа использовали смесь ДНК нескольких культур: *Zymomonas mobilis*, *Caulobacter bacteroides*, *Bacillus cereus*, *Azotobacter vinelandii*, *Propionibacterium shermanii*, *Escherichia coli* и *Streptomyces griseus*, которые были получены из коллекции кафедры микробиологии. Выделение ДНК из этих культур проводили стандартным фенол-хлороформным способом, условия проведения пробоподготовки, ПЦР и DGGE анализа были такими же, как описано выше.

2.7.5. Метагеномный анализ микробного сообщества

Для подготовки образца для метагеномного секвенирования была выделена тотальная ДНК из Σ4 МС, как наиболее активного из исследуемых МС, культивируемого на офисной бумаге (в третьем пассаже). Для этого регион-специфические V3-V4 участки гена 16S рРНК были амплифицированы и создана стандартная библиотека фрагментов, согласно литературным данным (Fadrosh et al., 2014). Подбор праймеров и условий амплификации был выполнен согласно описанному ранее протоколу (Merkel et al., 2016).

Каждый образец амплифицировали в двух повторностях, затем их смешивали для увеличения концентрации и вносили в 2 % агарозный гель для проведения фореа. Из геля полосы вырезали и очищали с помощью набора «Cleanup Standard» (Евроген, Россия). В полученных пробах концентрацию ДНК измеряли с помощью флуорометра Qubit 2.0 с помощью набора для двухцепочечной ДНК «HS (High Sensitivity) Assay Kit» (Life Technologies, USA). Перед секвенированием одинаковые количества каждого ампликона были собраны в единый образец (библиотеку), который затем довели до концентрации 4 нМ, согласно протоколу производителя «Illumina Sample Preparation Guide». Денатурацию и загрузку образцов проводили с помощью набора «MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов)» (Illumina). Секвенирование осуществляли на платформе Illumina MiSeq. Анализ полученных данных, осуществляли с помощью программы QIIME (версия 1.9.1) и онлайн сервиса по оценке данных рибосомальной базы данных SILVA.

2.8. Молекулярно-генетические методы для определения выделенных целлюлозолитических культур

Выделение ДНК из полученных чистых культур, активно разлагающих целлюлозу, проводили с помощью фенол-хлороформного метода (Sambrook et al., 2001) или с использованием наборов (Blood/Genomic DNA Purification Mini Spin Column Kit «Genaxxon», ФРГ). Для амплификации участка гена 16S рРНК использовали систему универсальных праймеров EUB1 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и EUB2 (5'- AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), занимающих позиции 27-45 и 1542-1561 (по геному *E.coli*), соответственно (Lane, 1991), и набор реактивов «DreamTaq Green PCR Master Mix» (Thermo Scientific). Рабочая смесь (60 мкМ) для ПЦР составляла 25 мкл DreamTaq Green PCR Master Mix, с содержащимися в буферном растворе смесью нуклеотидов, $MgCl_2$ и полимеразой DreamTaq DNA Polymerase, а также 50 мкл (10 мкМ) каждого праймера и 1 мкл матричной ДНК (100 нг); до требуемого объема доводили стерильной MQ водой. Последовательность циклов нагревания-охлаждения использовали следующую: начальную денатурирующую стадию проводили при 94 °C 5 мин, далее в каждом цикле (9) денатурацию проводили при 94 °C 20 сек, отжиг - при 48 °C в течение 30 сек и элонгацию - при 72 °C в течение 2 мин. В последующих циклах (19) денатурацию проводили при 94 °C 20 сек, отжиг - при 45 °C в течение 30 сек и элонгацию - при 72 °C в течение 1 мин. После проведения ПЦР-продукты амплификации (1 мкл) просматривали на агарозном 0,8 % геле, в качестве маркера использовали DNA-Marker 1 kb (MassRuler «Thermo Fisher», ФРГ).

Полученные ПЦР-продукты (около 1500 п.н.) очищали на колонках согласно протоколу с помощью набора «NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up» («Machery-Nagel», ФРГ), и секвенировали в компании «LGC Genomics GmbH» (ФРГ). Полученные последовательности генов 16S рРНК обрабатывали в программе «UGENE» (Okonechnikov et al., 2012). Анализ и сравнение полученных сиквенсов проводили с описанными ранее последовательностями, используя базу данных BLAST [NCBI (Национальный центр биотехнологии, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)]. Сравнение контигов и гомологичных участков последовательностей полных геномов проводили в программе «UGENE» с помощью метода выравнивая по алгоритму «Muscle». Для построения филогенетического дерева использовали программу «MegaX» (Kumar et al., 2018) и алгоритм «Neighbour-joining». Оценку достоверности топологии дендрограммы осуществляли с помощью «bootstrap» анализа 1000 альтернативных деревьев в той же программе.

2.9. Биотест с растениями

Для определения возможности полной утилизации ферментированного остатка, после конверсии пивной дробины анаэробным микробным сообществом в биогаз, полученная биомасса микроорганизмов и остатки дробины были использованы как биоудобрение. Для проведения биотеста по определению влияния этого биоудобрения на рост и развитие растений кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) почву, в которой проращивали семена салата, смешивали с переработанной пивной дробинкой в соотношении 5, 10 и 20 % (по массе). Семена в количестве 20 штук на один горшок засевали на глубину 0,5 - 0,7 см. Инкубировали при температуре 24 °C со светопериодом - 12 часов и ежедневным поливом водопроводной водой. Оценку роста и развития растений по сравнению с контрольными (необработанными) вариантами проводили путем измерения высоты надземной части растений, а также определением сырой массы проростков.

2.10. Обработка результатов

Все эксперименты проводили в трех-пяти повторностях, данные в таблицах представлены средним арифметическим значением с учетом стандартного отклонения. Гистограммы построены с учетом пределов погрешностей полученных значений. Обработку данных проводили в программах Excel и STATISTICA.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ³

3.1. Биоконверсия лигноцеллюлозосодержащего сырья в биогаз на примере пивной дробины

Одним из повсеместно распространённых органических целлюлозосодержащих отходов является пивная дробина (ПД), составляющая до 85 % побочных продуктов пивоваренной промышленности, чье ежегодное мировое производство может составлять более $38,6 \cdot 10^6$ т (таблица 12, по Mussatto, 2014). В России накапливается около $1,2-2,0 \cdot 10^6$ т ПД в год, которая не утилизируется и захоранивается на полигонах ТБО (Воробьева и др., 2005). ПД состоит из 15-30 % белка, 19-28 % полисахаридов, 9-25 % целлюлозы, 7-28 % лигнина и содержит около 10 % липидов, а также различных минеральных веществ и витаминов (Stojceska et al., 2008).

Помимо белков (аминокислот), больше половины от сухой массы ПД составляют углеводы, однако их доступность для микробиологической конверсии снижена из-за присутствия лигнина. Поскольку ПД производится в больших количествах, имеет низкую стоимость и высокий энергетический потенциал, она представляет собой перспективный субстрат для получения второго поколения биотоплива, например, биогаза при использовании целлюлозоразлагающих микроорганизмов (Malakhova et al., 2015).

³ Основные результаты, описанные в главе, представлены в публикациях:

Malakhova D. V., Egorova M. A., Prokudina (Popova) L. I., Netrusov A. I., Tsavkelova E. A. The biotransformation of brewer's spent grain into biogas by anaerobic microbial communities. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Т. 31. – №. 12. — С. 2015–2023.

Прокудина (Попова) Л. И., Осмоловский А. А., Егорова М. А., Нетрусов А.И., Цавкелова Е.А. Биоразложение целлюлозосодержащих субстратов микромицетами с последующей биоконверсией в биогаз. // Прикладная биохимия и микробиология. — 2016. — Т. 52, № 2. — С. 200–209.

Tsavkelova E., Prokudina (Popova) L., Egorova M., Leontieva M., Malakhova D., Netrusov A. The structure of the anaerobic thermophilic microbial community for the bioconversion of the cellulose-containing substrates into biogas. // Process Biochemistry. – 2017. – Т. 66. – С. 183-196.

Таблица 12. Химический состав пивной дробины (с изменениями по Mussatto, 2014)

	Mussatto and Roberto	Meneses et al.
Компоненты (г/кг сухого веса)		
Целлюлоза (глюкан)	168	217
Гемицеллюлоза	284	192
Ксилан	199	136
Арабинан	85	56
Лигнин	278	194
Ацильные группы	14	NR
Белок	153	247
Зольные вещества	46	42
Экстрагируемые вещества	58	107
Минеральные в-ва (мг/кг)		
Si	10740	NR
P	5186	6000
Ca	3515	3600
Mg	1958	1900
S	1980	2900
K	258.1	600
Na	309.3	137.1
Fe	193.4	154.9
Zn	178.0	82.1
Al	36.0	81.2
Mn	51.4	40.9
Co	NR	17.8
Cu	18.0	11.4
Sr	12.7	10.4
I	NR	11.0
Ba	13.6	8.6
Cr	5.9	<0.5
Mo	NR	1.4
B	NR	3.2

Примечания: Mussatto and Roberto, 2006; Meneses et al., 2013

Исходно эксперименты по выделению активных микробных сообществ (МС), утилизирующих ПД с образованием биогаза, проводили на субстрате с различными его концентрациями (15, 50, 100 и 500 г/л) с целью определения оптимального содержания ПД в среде для наиболее эффективной её конверсии в биогаз. На примере ряда субстратов, содержащих высокое содержание азота, известно, что использование ко-субстратов, например «энергетических» растений (сахарный тростник, кукуруза, просо, подсолнечник, рапс) позволяет улучшить баланс питательных веществ в среде и оптимизировать соотношение C:N, а также уменьшить влияние ингибирующих промежуточных продуктов на развитие метаногенного микробного сообщества, позволяя увеличить выход биогаза на 40-80 % (Weiland 2010; Sebola et al., 2014). В нашей работе мы также использовали несколько вариантов биоконверсии с ко-субстратом. Помимо навоза травоядных животных (который одновременно служил инокулятом) в качестве ко-субстрата нами была выбрана фитомасса (листья и стебли) топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.). Топинамбур - это многолетнее травянистое растение высотой до 2 м, клубни которого содержат около 3 % белка, растворимый полисахарид инулин (16-18 %), фруктозу, микроэлементы, азотистые вещества, общий азот, фосфор, витамины группы В, С, каротин (Дорофеева и др., 1998; Gunnarsson et al., 2014). Из-за высокого содержания инулина в клубнях существует мнение, что их использование для получения из них биотоплива малоперспективно

из-за низкой степени гидролиза инулина (существует ограниченное разнообразие микроорганизмов, которые способны его расщеплять с последующей трансформацией до моносахаридов) и его низкой энергетической составляющей (Cheng et al., 2009; Li et al., 2013). В то же время, фитомасса (воздушные части) растения не имеет таких ограничений и может быть использована для получения биоэтанола и биогаза (Menon and Rao, 2012; Malakhova et al., 2015). Схема эксперимента представлена в таблице 13, где отображены условия культивирования и варианты, использованные для засева инокулятов.

Таблица 13. Варианты селекции микробных сообществ, подобранные с учетом количества внесённой ПД, температуры культивирования, использования ко-субстрата и состава инокулята (по Malakhova et al., 2015)

Номер сообщества	Условия культивирования и селекции сообществ			
	t (°C)	ПД (г/л)	Инокулят	Добавление ко-субстрата фитомассы <i>H. tuberosus</i>
1T	55	15	Σ навоз	-
2T	55	50	Σ навоз	-
3T	55	100	Σ навоз	-
4T	55	500	Σ навоз	-
5T	55	100	Σ7	-
6T	55	100	3	-
7T	55	100	Σ7	+
8T	55	15	Σ навоз	+
9T	55	50	Σ навоз	+
10T	55	100	Σ навоз	+
11T	55	500	Σ навоз	+
12T	55	100	3	+
13M	30	100	Σ навоз	-
14M	30	100	Σ навоз	+
15M	30	100	1	-
16M	30	100	1+21	-
17M	30	100	1	+
18M	30	100	1+21	+

Условные обозначения: Т - термофильные условия (55°C); М - мезофильные условия (30°C); Σ навоз - навоз, полученный от различных животных (пони, лошади, кролики, морские свинки, крысы, шиншиллы); сообщества 1 и 3, сообщество Σ7 - суммарное термофильное МС) и 1+21 - суммарное мезофильное МС; составлены из МС, полученных ранее при селекции различных метаногенных сообществ, образующих биогаз из целлюлозосодержащих материалов (Цавкелова и др., 2012).

При культивировании термофильных МС на пивной дробине в количестве 500 г/л в газовой фазе был отмечен высокий выход водорода (18 %), а также быстрое закисление среды до pH 3,5. Даже при постоянной нейтрализации pH до значений 7,0 выход метана для сообществ 4Т и 11Т не превышал 1,5 % и дальнейшего преобразования субстрата в биогаз не происходило. При использовании ПД в количестве 200 г/л, выход метана к 14 суткам культивирования составил лишь 5-10 %. Наилучшую биоконверсию ПД в биогаз наблюдали в термофильных сообществах при использовании концентрации субстрата 100 г/л с добавлением в качестве ко-субстрата фитомассы топинамбура (сообщества 3Т и 10Т). Содержание метана в биогазе в этих условиях составило 61 % (для 10Т), причем без добавления ко-субстрата (3Т) - только 53,6 %.

В дальнейших экспериментах мы использовали концентрацию дробины в количестве 50-100 г/л среды. Для одного мезофильного сообщества, культивируемого без добавления (16М) и с добавлением ко-субстрата (18М) также показана стимуляция образования биогаза при добавлении к ПД фитомассы топинамбура: для МС 16М и 18М образование биогаза с содержанием в нём метана составляло 50,2 % и 54,9 %, соответственно (рисунок 10). Однако в отличие от термофильных сообществ, где биоконверсия субстрата проходила за 15 дней, аналогичный процесс в мезофильных культурах занимал значительно более длительное время (30-44 сут).

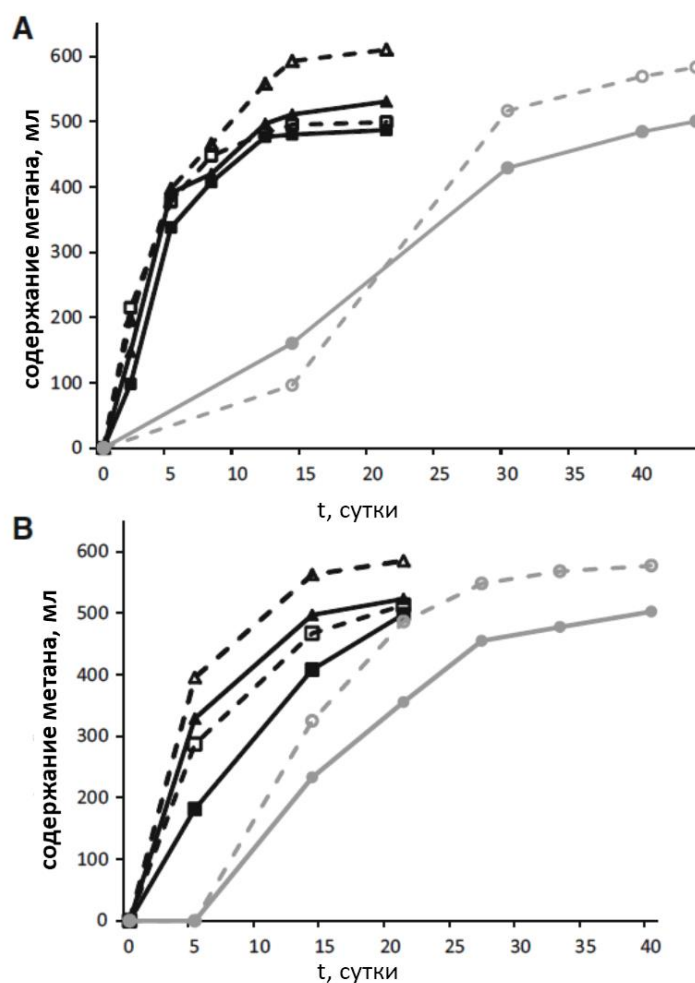


Рисунок 10. Динамика образования метана (мл/л) анаэробными термофильными (черный цвет линий) и мезофильными (серый цвет линий) МС в первом (А) и пятом (В) пассажах. Культивирование на субстрате ПД (сплошная линия) и ПД с добавлением ко-субстрата фитомассы топинамбура (пунктиром). Термофильные сообщества (черный): 2Т (закрашенный квадрат), 9Т (незакрашенный квадрат), 3Т (закрашенный треугольник), 10Т (незакрашенный треугольник); мезофильные сообщества (серые): 13М (закрашенный круг), 14М (незакрашенный круг). Эксперименты повторяли в трёх повторностях, на графике отражены средние значения; вариации в пределах значений составляют менее 5 %

Для того чтобы отобрать стабильные МС, образующие постоянное количество биогаза в подобранных условиях, их культивировали в течение 5-6 пассажей в течение года. Так в исходном первом пассаже кумулятивное содержание метана в термофильных сообществах 2Т,

3Т, 9Т, 10Т составляло 8,2; 6,2; 10,8 и 8,6 л $\text{CH}_4/100$ г ПД, соответственно. Через год культивирования образование метана немного уменьшилось, но сообщества сохранили свою активность, образуя 7,4; 5,6; 10,0 и 6,1 л метана/100 г ПД. В наиболее активных мезофильных сообществах образовалось метана почти в два раза меньше по сравнению с термофильными: 4,8 и 5,8 л $\text{CH}_4/100$ г ПД после 1 пассажа и 3,5 и 6,0 л $\text{CH}_4/100$ г ПД после 5 пассажа. Таким образом были отобраны наиболее активные и стабильные МС, среди термофильных - 2Т, 3Т, 9Т, 10Т, а среди мезофильных - 13М и 14М, при этом выход метана в них на момент заключительного культивирования составлял 50-59 % и 50-57 % соответственно (рисунок 11).

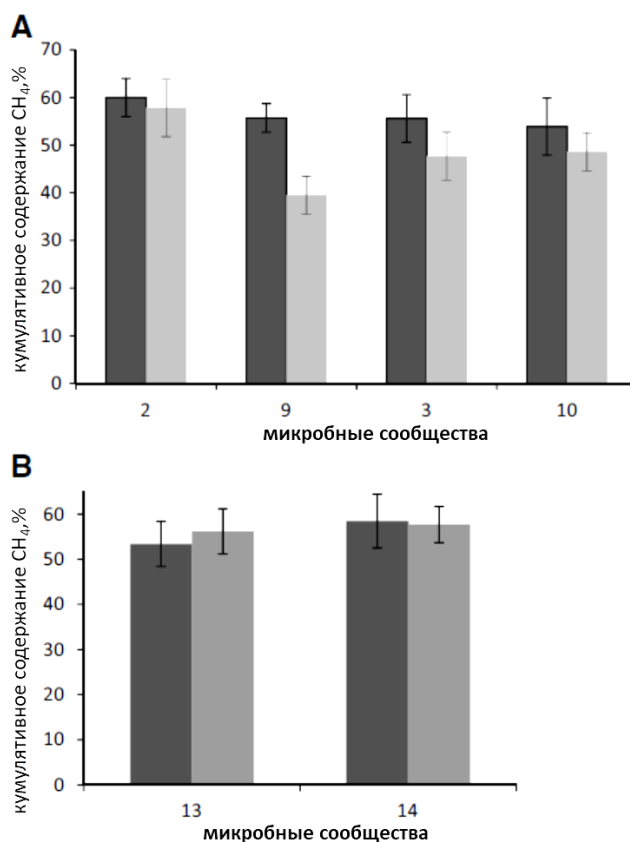


Рисунок 11. Максимальное значение кумулятивного содержания метана, полученное при культивировании термофильных (А) и мезофильных (В) МС в первом (черный столбец) и пятом (серый столбец) пассажах без добавления ко-субстрата (сообщества № 2, 3 и 13) и с добавлением ко-субстрата (сообщества № 9, 10 и 14).

Термофильные (5Т и 6Т) и мезофильные (15М и 16М) микробные сообщества, выделенные ранее (Цавкелова и др., 2012) и образующие биогаз на целлюлозосодержащих материалах (например, фильтровальной бумаге), не показали высокой продуктивности при биоконверсии пивной дробины, что подтверждает необходимость селекции микробных сообществ на предпочитаемом субстрате.

Полученные нами данные соотносятся с литературными сведениями: так, одновременная, анаэробная трансформация ПД совместно с куриным пометом и содержимым рубца коров в качестве инокулята, приводила к образованию 3,5 л биогаза на 100 г ПД после 15 дней инкубации (Ezeonu and Окака, 1996). Также известно, что топинамбур может служить самостоятельным субстратом для получения биогаза, из его наземных побегов удалось получить 480-680 л биогаза на кг органического вещества (Gunnarson et al., 1985). В работе Uzodinma and Ofoefule (2008) ПД сбраживали совместно со стоками со скотобойни, что увеличило выход биогаза в 3,3 раза по сравнению с отдельным сбраживанием ПД, а при трансформации ПД совместно с рисовой шелухой в мезофильных условиях в течение 47 дней было получено 150 л биогаза, при этом выход метана составил 52,3 % (Ezekoye and Okeke, 2006). По нашим данным максимальное значение содержания метана, образованного при конверсии ПД совместно с топинамбуром термофильным МС (9Т), составило - 10,8 л $\text{CH}_4/100$ г ПД. Полученные данные доказывают эффективность использования ко-субстрата, на примере фитомассы *Helianthus tuberosus* L., для увеличения образования биогаза МС, а также подтверждают, что ПД является субстратом с высоким энергетическим потенциалом для получения биотоплива.

Остатки ПД после её разложения анаэробными микробными сообществами -продуцентами биогаза, были проанализированы в биотесте с растениями кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) на возможность полной утилизации и использования остатков как биоудобрения. Для этого к почве, в которой выращивали семена кресс-салата, добавляли в разном количестве остатки ПД после её использования микробными сообществами (ТД - трансформированная дробина). Стимуляция роста и развития семян кресс-салата была зафиксирована при добавлении к почве этого субстрата в количестве 1, 5, 10 и 20 (%): биомасса проростков составила в опытных образцах $0,40 \pm 0,05$ г (сырой вес), $0,42 \pm 0,05$ г, $0,50 \pm 0,04$ г и $0,37 \pm 0,06$ г, соответственно. В контрольном варианте биомасса проростков составила $0,36 \pm 0,06$ г. Таким образом, добавление в качестве биоудобрения остатков биоконверсии пивной дробины способствовало увеличению биомассы растений на 10-20 % по сравнению с контролем (рисунок 12), с наилучшими показателями при 10 % добавленного субстрата. Кроме того, при добавлении 10 % ТД к почве количество взошедших семян на вторые сутки инкубирования на 15 % превышало контрольный вариант (данные не представлены). Оставшиеся семена в контроле поросли только на следующие сутки.

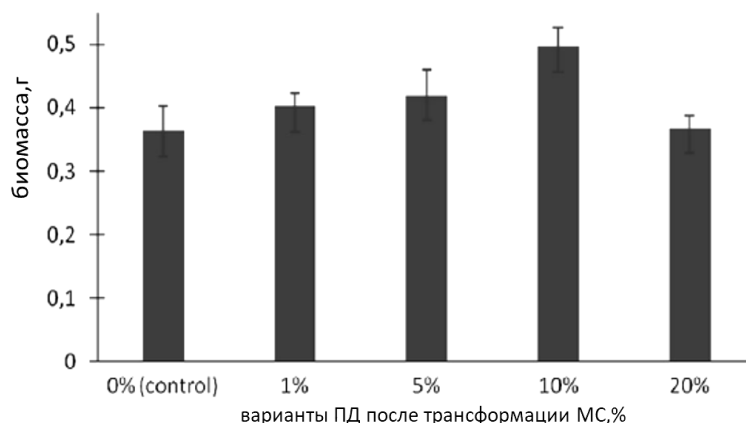


Рисунок 12. Биомасса (сырой вес) кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) при обработке почвы ТД. Условные обозначения: контроль - почва без добавления ТД; 1 %, 5 %, 10 %, 20 % (по массе) - образцы, где в почве содержится данное количество внесенной ТД

Таким образом, анаэробная микробная трансформация дробины в биогаз позволяет не только эффективно утилизировать остатки пивоваренных предприятий и получить биотопливо, но и делает возможным ее полную утилизацию в качестве органического удобрения и стимулятора роста растений.

3.2. Биоконверсия целлюлозосодержащих субстратов в биогаз с помощью микромицетов и метаногенных сообществ

Для изучения возможности совмещения биологической предобработки лигноцеллюлозных субстратов с последующей их конверсией в биогаз мы исследовали активность целлюлозолитических микромицетов. Для сравнения эффективности их использования было изучено биоразложение нескольких типов бумажной продукции: фильтровальной, газетной и журнальной бумаг, офисной бумаги с черно-белой печатью, картона и смеси всех бумаг, а также дополнительное использование ко-субстрата в виде фитомассы топинамбура. Согласно литературным данным (Кураков и Болобова, 1999; Sajith et al., 2016), одними из наиболее активных продуцентов целлюлаз являются представители родов *Trichoderma* и *Aspergillus*. Поэтому для изучения биоразложения целлюлозосодержащих субстратов нами были выбраны представители *Trichoderma viride* и *Aspergillus terreus*.

3.2.1. Изучение целлюлозолитической активности микромицетов *Trichoderma viride* и *Aspergillus terreus*

Для определения активности целлюлаз, образуемых микромицетами *T. viride* и *A. terreus*, была выбрана минеральная среда Чапека-Докса, поскольку известно, что именно на небогатых по составу питательных средах образуются большее количество целлюлозолитических ферментов (Padmavathi et al., 2012). Было показано, что при добавлении дополнительного источника углерода, например легкоразлагаемых углеводов, у микромицетов также повышается экспрессия целлюлаз (Matkar et al., 2013). Исходя из этих данных, культивирование грибов проводили на минеральной среде с (+) и без (-) добавления ко-субстрата (сахарозы). В результате, было показано, что наибольшие показатели целлюлозолитической активности были получены на 3-7 сутки культивирования (рисунки 13-16). На офисной бумаге *T. viride* достигала максимума активности к 3 суткам, и он составил 0,8 U/мл/мин (или 10,2 U/мл/мин/мг белка). Наибольшее значение активности при культивировании *T. viride* на смеси бумаг наблюдали к 7 суткам: 0,73 U/мл/мин (или 2,9 U/мл/мин/мг). При сравнении эндогликоназной активности этого микромицета высокие показатели были отмечены на офисной бумаге (0,3 U/мл/мин или 3,7 U/мл/мин/мг белка) и смеси бумаг (0,25 U/мл/мин или 0,9 U/мл/мин/мг белка), а также на картоне (0,28 U/мл/мин или 0,86 U/мл/мин/мг белка) (рисунки 15-16).

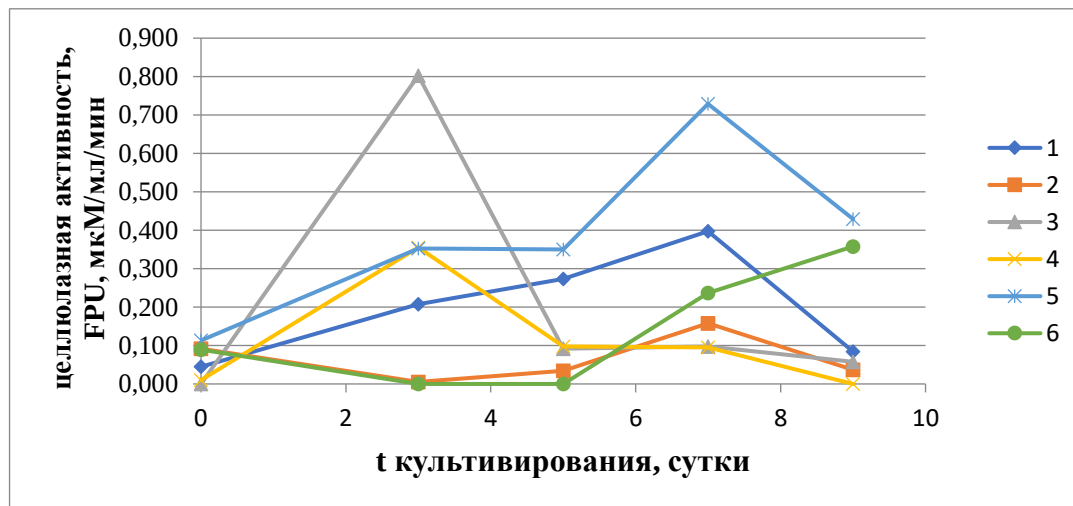


Рисунок 13. Общая целлюлозолитическая активность *T. viride* при культивировании на фильтровальной и офисной бумагах, а также на смеси бумаг без и с добавлением сахарозы. 1- фильтровальная бумага (- сахароза); 2- фильтровальная бумага (+ сахароза); 3- офисная бумага (- сахароза); 4-офисная бумага (+ сахароза); 5- смесь бумаг (- сахароза); 6- смесь бумаг (+ сахароза). FPU - filter paper unit, международные единицы активности целлюлаз

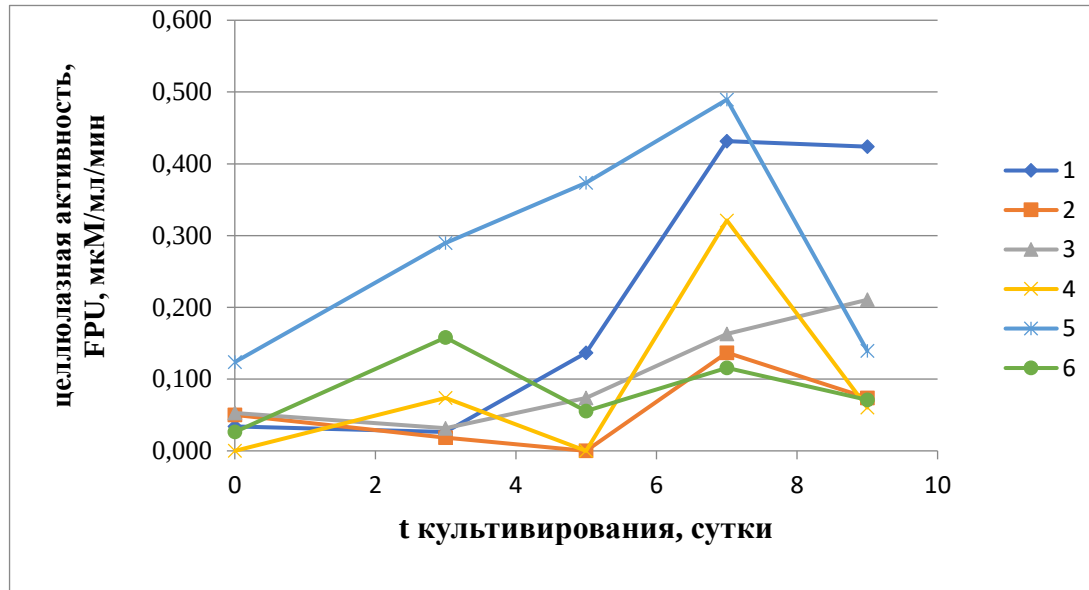


Рисунок 14. Общая целлюлолитическая активность *T. viride* при культивировании на журнальной и газетной бумагах. 1 - журнал (- сахароза); 2 - журнал (+ сахароза); 3 - газета (- сахароза); 4 - газета (+ сахароза); 5 - картон (- сахароза); 6 - картон (+ сахароза). FPU - filter paper unit, международные единицы активности целлюлаз

Согласно литературным данным, при культивировании представителей триходермы на целлюлозосодержащих субстратах на среде с растительной биомассой *T. viride* образует комплекс целлюлаз, активность которого составляет 0,8 U/мл/мин, а *T. reesei* при росте на среде с порошковой целлюлозой имеет эндоглюканазную активность, равную 0,4-0,5 U/мл/мин, что подтверждает полученные нами данные по культивированию *T. viride* на бумажных субстратах (Peitersen, 1975; Kubicek, 1981).

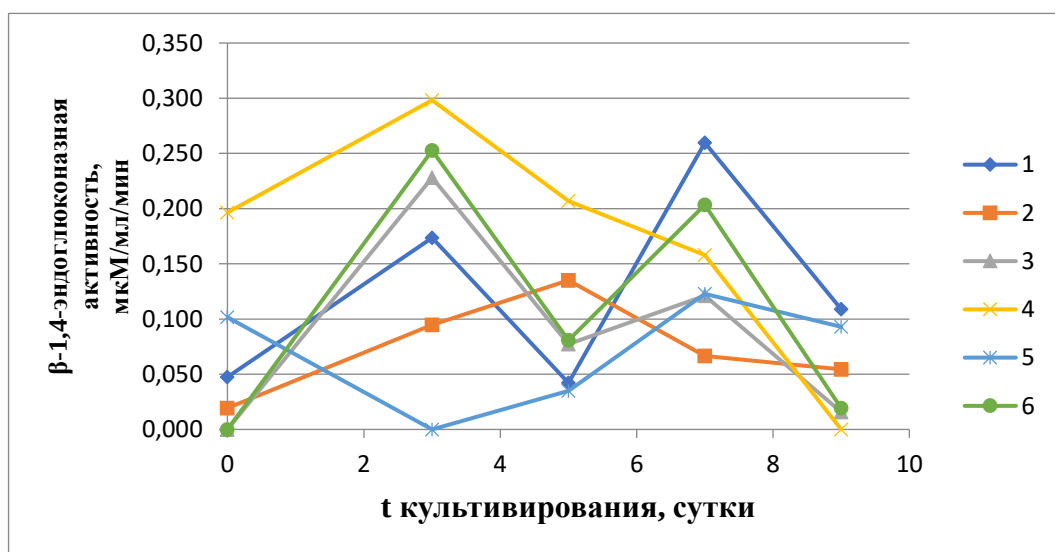


Рисунок 15. Образование β-1,4-эндоглюконазы *T. viride* при культивировании на фильтровальной и офисной бумагах, а также на смеси бумаг. 1 - фильтровальная бумага (- сахароза); 2 - фильтровальная бумага (+ сахароза); 3 - офисная бумага, (- сахароза); 4 - офисная бумага (+ сахароза); 5 - смесь бумаг (- сахароза); 6 - смесь бумаг (+ сахароза)

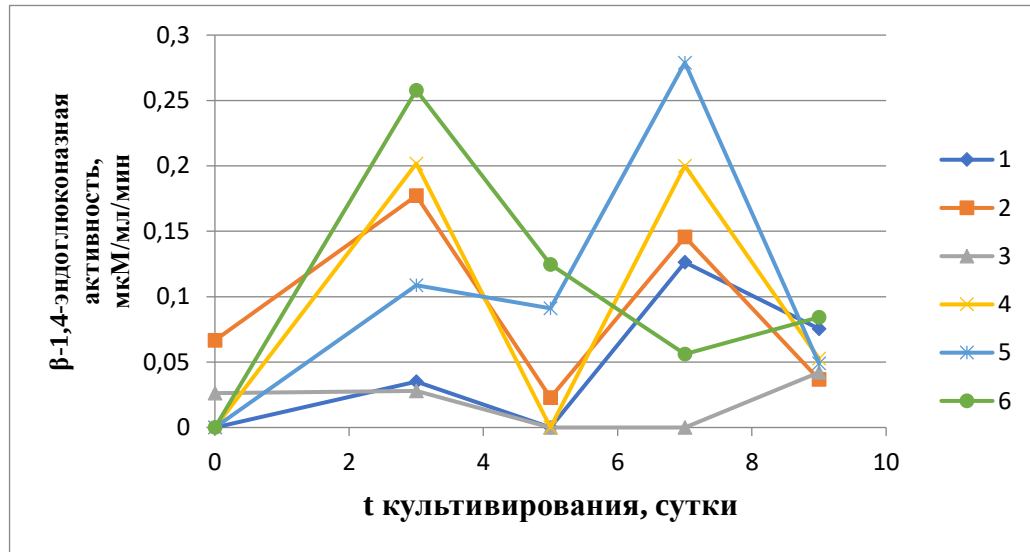


Рисунок 16. Образование β-1,4-эндоглюконазы *T. viride* при культивировании на картоне, газетной и журнальной бумагах. 1 - журнал (- сахароза); 2 - журнал (+ сахароза); 3 - газета (- сахароза); 4 - газета (+ сахароза); 5 - картон (- сахароза); 6 - картон (+ сахароза)

Образование целлюлозолитических ферментов является индуцибельным процессом. В ряде случаев (на примере *T. viride*) было показано, что сахароза, как дополнительный источник углерода, не являлась индуктором целлюлаз в то время, как наличие в среде глюкозы стимулировало этот процесс (Mandel and Reese, 1957). В то же время, другие авторы (Matkar et al., 2013) указывают на то, что сахароза, смешанная с субстратом в соотношении 1:1 из расчета 15 г/л, приводит к наращиванию биомассы гриба, что, в свою очередь, увеличивает образование синтезируемых целлюлаз, что было показано на примере *Aspergillus sydowii*. На рисунках 13 и 14 можно увидеть, что при добавлении сахарозы максимальная активность β-1,4-эндоглюконазы *T. viride* повышалась при использовании следующих типов бумаг: офисной - в 1,3 раза, журнальной - в 1,4 раз, а газетной - в 5 раз и смеси бумаг - в 2 раза. Наибольшая эффективность была отмечена для наиболее трудноразлагаемых лигноцеллюлозных субстратов: газетной и журнальной бумаг. Одним из существенных различий в вариантах без и с добавлением ко-субстрата является то, что достижение максимальных значений активности фермента происходило за более короткий период (рисунки 15, 16).

При определении общей целлюлазной активности, её значения на среде без сахарозы, наоборот, в 2-3,2 раза превышали те же показатели при культивировании гриба на среде с ко-субстратом (рисунок 17). Исключением являются более высокие показатели для *T. viride*, разлагающей газетную бумагу, что вероятнее всего связано со значительным увеличением активности β-1,4-эндоглюконазы в этом варианте.

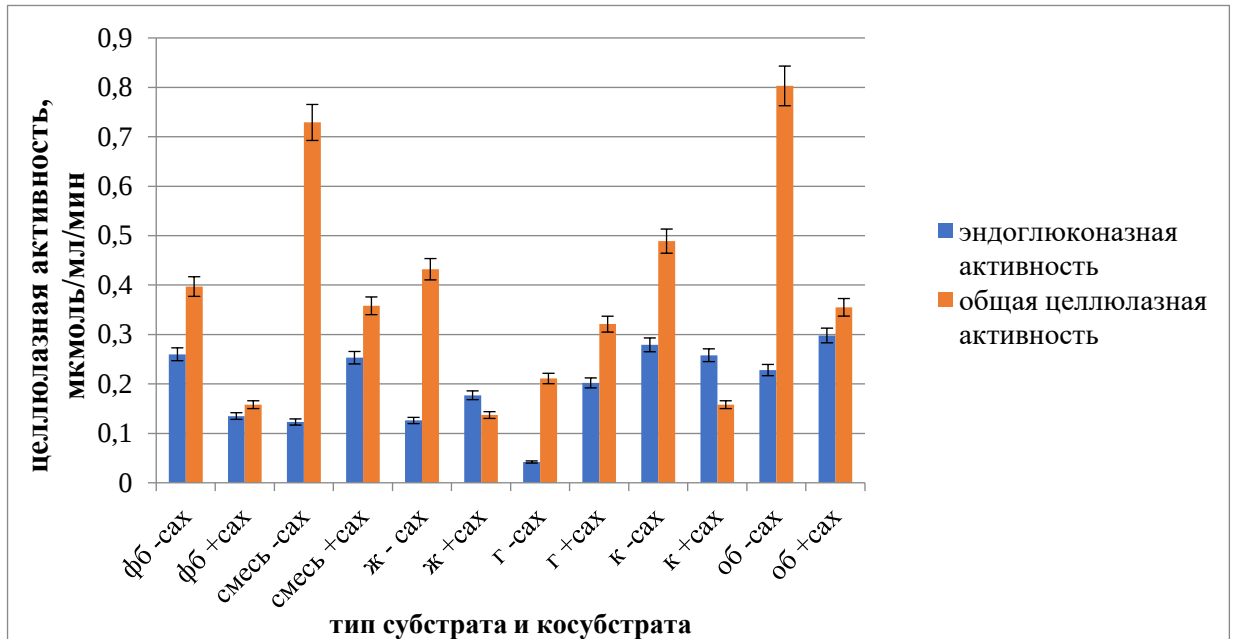


Рисунок 17. Общая целлюлазная активность и активность β -1,4-эндоглюконазы (максимальные значения) *T. viride* при культивировании на различных типах бумажной продукции без и с добавлением сахарозы

Результаты экспериментов по биоразложению бумажной продукции другим микромицетом, *A. terreus* № 2, представлены на рисунках 18-22.

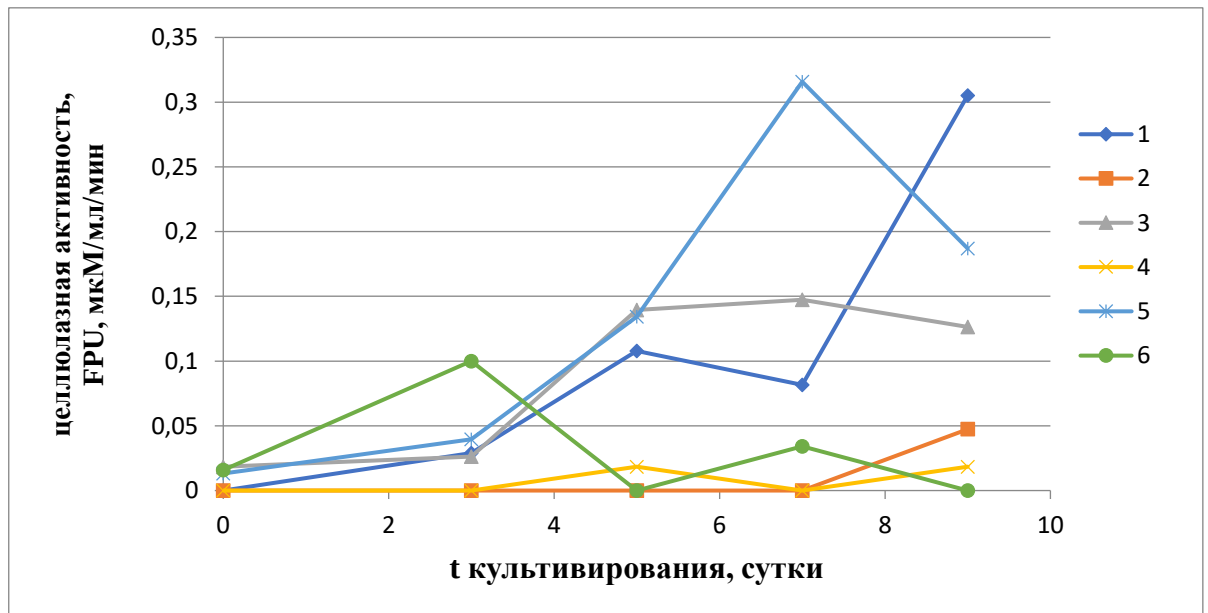


Рисунок 18. Общая целлюлозолитическая активность *A. terreus* при культивировании на фильтровальной и офисной бумагах и на смеси бумаг. 1 - офисная бумага (- сахароза); 2 - офисная бумага (+ сахароза); 3 - фильтровальная бумага (- сахароза); 4 - фильтровальная бумага (+ сахароза); 5 - смесь бумаг (- сахароза); 6 - смесь бумаг (+ сахароза). FPU - filter paper unit, международные единицы активности целлюлаз

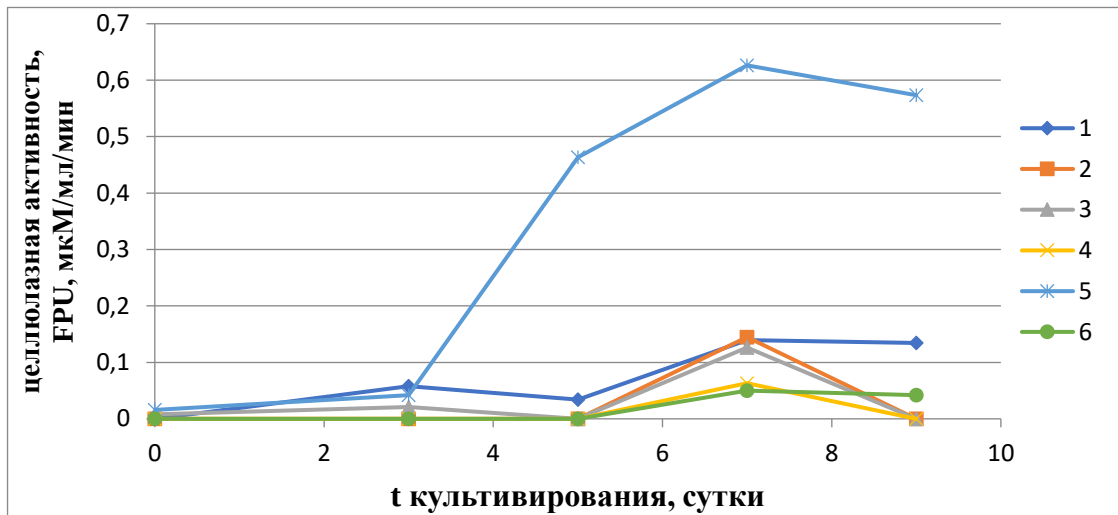


Рисунок 19. Общая целлюлозолитическая активность *A. terreus* при культивировании на журнальной и газетной бумагах и картоне. 1 - журнал (- сахароза); 2 - журнал (+ сахароза); 3 - газета (- сахароза); 4 - газета (+ сахароза); 5 - картон (- сахароза); 6 - картон (+ сахароза). FPU - filter paper unit, международные единицы активности целлюлаз

Максимальные значения общей целлюлазной активности *A. terreus* были получены при его культивировании в течение 7 суток на картоне - 0,63 U/мл/мин (или 1,6 U/мл/мин/мг белка); в два раза меньшая активность была отмечена на смеси бумаг - 0,32 U/мл/мин (0,7 U/мл/мин/мг белка) и на офисной бумаге - 0,3 U/мл/мин (0,6 U/мл/мин/мг белка) (рисунки 18, 19). Использование сахарозы в качестве ко-субстрата также не привело к увеличению общей целлюлазной активности.

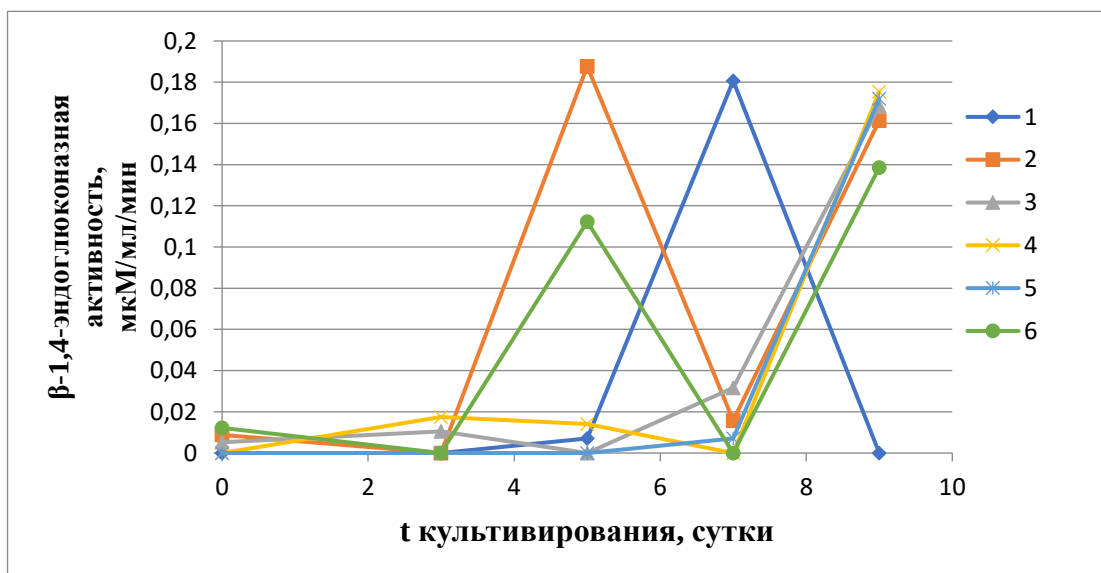


Рисунок 20. Образование β-1,4-эндоглюконазы *A. terreus* при культивировании на фильтровальной и офисной бумагах, а также на смеси бумаг. 1 - офисная бумага (- сахароза); 2 - офисная бумага (+ сахароза); 3 - фильтровальная бумага (- сахароза); 4 - фильтровальная бумага (+ сахароза); 5 - смесь бумаг (- сахароза); 6 - смесь бумаг (+ сахароза)

При сходных с триходермой значениях активности эндоглюканазы *A. terreus*, выращенного на офисной бумаге, к 7 суткам культивирования её максимум составил 0,18 U/мл (1,5 U/мг белка) на офисной бумаге (без добавления сахарозы), а при внесении ко-субстрата пик активности фермента приходился на 5 сутки культивирования и составил 0,188 U/мл/мин (0,3 U/мл/мин/мг белка; рисунок 20). Ранее при культивировании штамма *A. terreus* на микрокристаллической целлюлозе (МКЦ), отрубях и фильтровальной бумаге общая целлюлазная активность этого микромицета составила 0,9 U/мл/мин, 1,3 U/мл/мин и 0,3 U/мл/мин, соответственно (Bastawde, 1992). Для другого представителя рода *Aspergillus* на примере *A. sydowii*, выращенного на МКЦ, была также показана эндоглюканазная активность со сходными значениями, равная 0,3 U/мл/мин (Matkar et al., 2013).

В отличие от *T. viride*, при культивировании *A. terreus* на офисной и фильтровальной бумагах, газете и смеси бумаг, добавление ко-субстрата не приводило к индукции образования эндоглюконазы. Незначительное увеличение активности фермента было отмечено только при культивировании аспергилла на журнальной бумаге и картоне (рисунок 21).

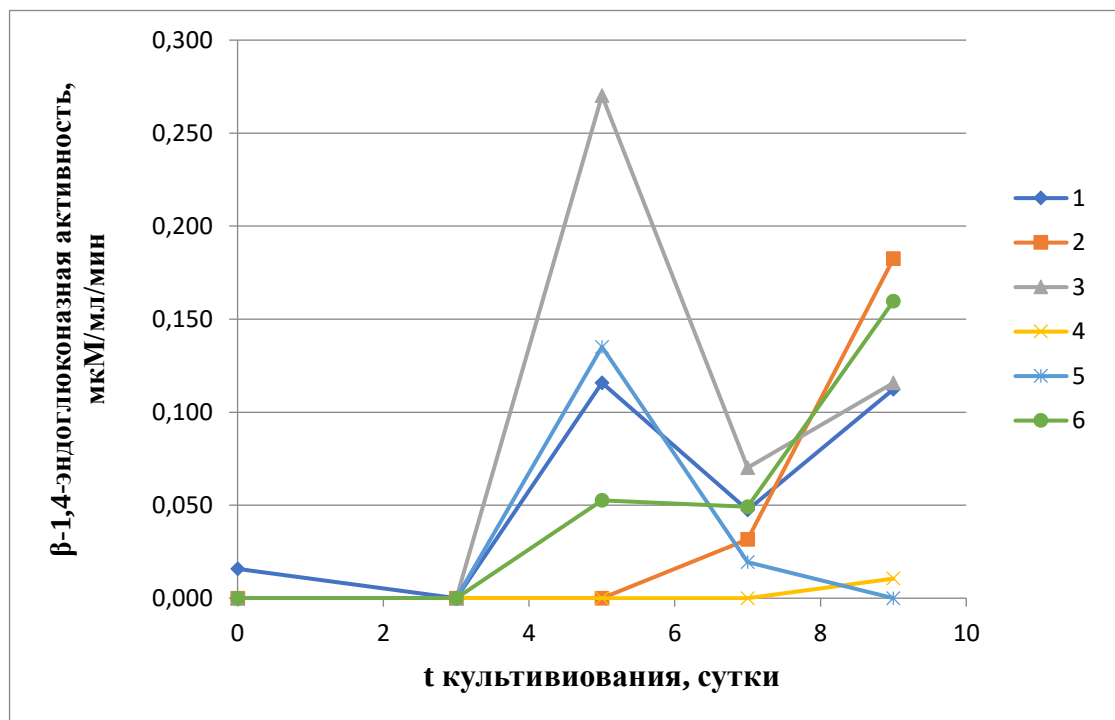


Рисунок 21. Образование β-1,4-эндоглюконазы *A. terreus* при культивировании на фильтровальной и офисной бумагах, а также на смеси бумаг; 1-журнал (- сахароза); 2 - журнал (+ сахароза); 3 -газета (- сахароза); 4 - газета (+ сахароза); 5 -картон (- сахароза); 6 - картон (+ сахароза)

Таким образом, при гидролизе бумажных субстратов штамм *T. viride* оказался более эффективным. За исключением сходных показателей, полученных при культивировании грибов на картоне (0,63 U/мл/мин у аспергилла и 0,49 U/мл/мин у триходермы), на остальных субстратах общая целлюлазная активность триходермы превышала таковую у аспергилла в 2,6 раз на

офисной бумаге, в 3,1 раза на журнале, в 2,7 раз на фильтровальной бумаге, в 1,7 раз на газете и в 2,3 раза на смеси бумаг (рисунок 23).

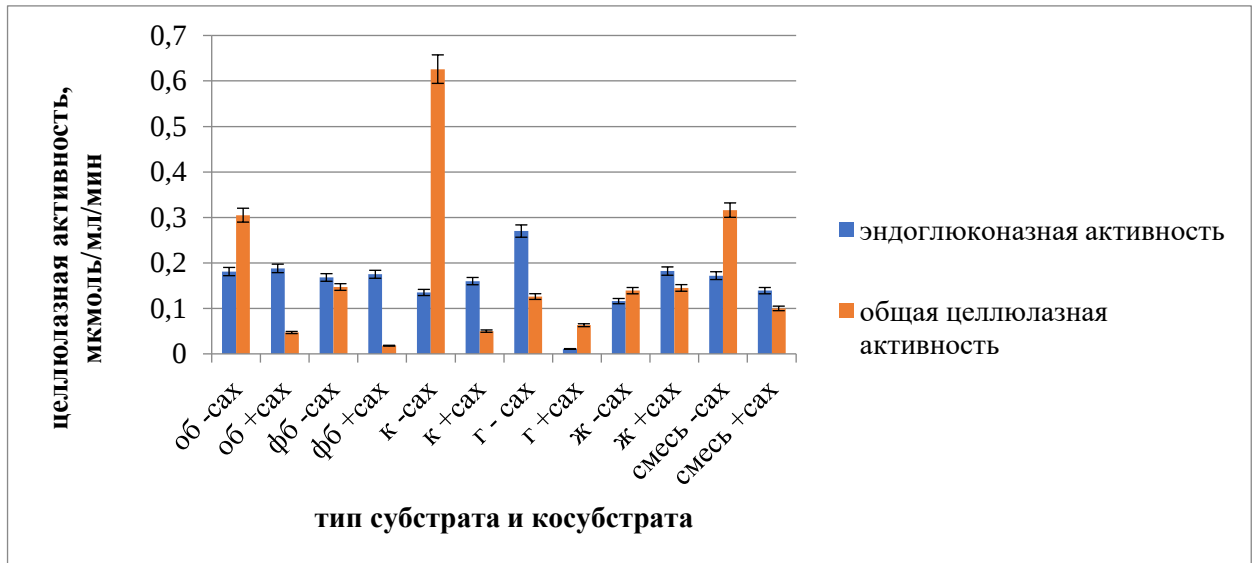


Рисунок 22. Общая целлюлозолитическая активность и активность β -1,4-эндоглюконазы (максимальные значения) *A. terreus* при культивировании на различных типах бумажной продукции без и с добавлением сахарозы

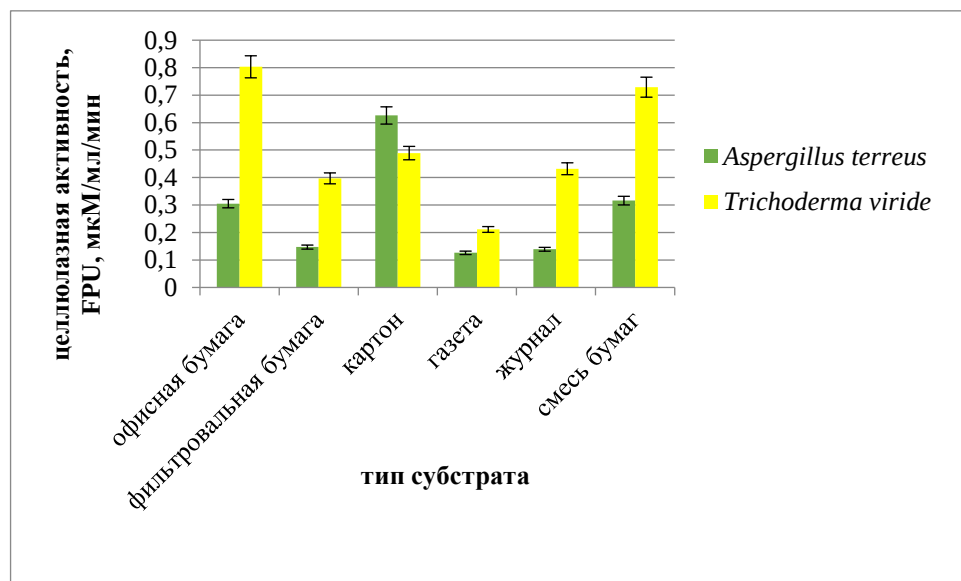


Рисунок 23. Сравнение максимальных значений общей целлюлазной активности микромицетов *A. terreus* и *T. viride*

Наиболее гидролизуемыми субстратами оказались офисная бумага, картон и смесь бумаг. Известно, что в картоне и офисной бумаге содержание лигнина минимально: по некоторым данным (Eleazer et al., 1997) содержание лигнина колеблется от 2 % в офисной бумаге до 24 % в газетной бумаге. Именно газетная и журнальная бумаги гидролизировались труднее всего (особенно аспергиллом, рисунок 22). В то же время, мы показали, что именно смесь бумажной продукции (содержащая легко- и трудноразлагаемые субстраты) позволяет повысить

эффективность их биоразложения. У обоих микромицетов при культивировании на смеси бумаг обнаружены высокие показатели целлюлазной активности, что свидетельствует о том, что микроорганизмы вырабатывают целый комплекс гидролаз и целлюлолитических ферментов, включающий также гемицеллюлазы (Алимова, 2006; Kumar and Parikh, 2015) и лигнинолитические ферменты (Amore et al., 2013; Janusz et al., 2017). Эффективность гидролиза, таким образом, возрастает благодаря синергизму действия всех ферментов. Для *T. reesei* показан синергизм между целлобиогидролазой I, эндоксилоназой и ацетил-ксиланэстеразой. Так, на примере биомассы кукурузы было показано, что количество образовавшейся при гидролизе этого субстрата целлобиозы выше на 13-84 %, если бы действовал только один фермент - целлобиогидролаза (Selig et al., 2008).

На основании полученных данных этого этапа исследования штамм *T. viride* проявил себя наиболее эффективным для гидролиза целлюлозосодержащих субстратов. В качестве оптимальных условий для измерения общей целлюлазной активности при биоразложении бумажной продукции была выбрана минеральная среда Чапека-Докса без добавления ко-субстрата (сахарозы).

3.2.2. Использование микромицетов для предобработки субстратов с целью последующей конверсии образующейся биомассы анаэробными микробными сообществами в биогаз

Известно, что микромицеты имеют явное преимущество перед бактериями в предобработке лигноцеллюлозных материалов из-за более высокой активности и суммарного количества образуемых литических ферментов (Zheng et al., 2009). Фактором, ограничивающим гидролиз лигноцеллюлозы, является присутствие лигнина, содержащегося в растительной биомассе. В соответствии с литературными данными при предварительной обработке такого типа субстратов грибами для последующего получения биогаза прирост выхода метана составляет 24-30 % по сравнению с необработанным субстратом, который непосредственно сбраживается анаэробными метаногенными сообществами (Muthangya et al., 2009).

Нами был проведен эксперимент по предобработке целлюлозосодержащих субстратов, условия которого отображены в таблице 14. Для определения оптимальных условий по составу среды культивирования, способам засева инокулята и необходимости дополнительной термической обработки (автоклавирование) биомассы перед ее внесением в качестве субстрата для микробных сообществ, культивирование сначала проводили только на одном типе субстрата - офисной бумаге. В качестве анаэробного сообщества были отобрано суммарное термофильное сообщество $\Sigma 4$ (№ 6+17+19+21), объединяющее несколько наиболее активных метаногенных сообществ, полученных ранее (Цавкелова и др., 2012а).

A. terreus культивировали на офисной бумаге в течение 14 суток. При использовании культуры, образующейся после гидролиза (биомасса гриба + остатки субстрата + среда) для её последующей анаэробной биоконверсии в биогаз, микробное сообщество (МС $\Sigma 4$) не образовывало каких-либо значимых количеств метана (таблица 14). При разбавлении исходной грибной биомассы в два раза средой, используемой для культивирования метаногенов в соотношении 1 : 1, показатели выхода метана возросли на 15-30 %. Добавление к среде культивирования гриба ко-субстрата в виде сахарозы также не привело к увеличению выхода метана. Очевидно, что в пробах, где кумулятивное содержание метана не превышало 1 % (таблица 14), было недостаточно питательных веществ для развития микроорганизмов, составляющих анаэробное сообщество, в том числе метаногенов, требовательных к наличию ко-факторов и микроэлементов в среде (Bryant et al., 1971).

Таблица 14. Предобработка офисной бумаги с помощью микромицета *A. terreus* с последующей биоконверсией в биогаз метаногенным сообществом

Наличие ко-субстрата (сахароза)	Способ засева (инокулят)	Количество биомассы, мл/соотношение биомассы к питательной среде, V/V	Тип обработки грибной биомассы для анаэробной биоконверсии	Образование CH_4 из грибной биомассы сообществом $\Sigma 4$	
				Кумулятивное содержание CH_4 , %	Содержание CH_4 , мл/г субстрата
- сахароза	Фрагмент мицелия	30/ 1:0	нативная	6,9	12,8
			автоклавированная	0,2	0,4
		15/ 1:1	нативная	28,2	52,1
			автоклавированная	17,3	32,1
	Суспензия спор	30/ 1:0	нативная	0,3	0,5
		15/ 1:1	нативная	12,2	39,8
+ сахароза (30 г/л)	Фрагмент мицелия	30/ 1:0	нативная	0,2	0,4
			автоклавированная	0,1	0,2
		15/ 1:1	нативная	11,8	21,8
			автоклавированная	0,1	0,2
	Суспензия спор	30/ 1:0	нативная	2,1	3,9
		15/ 1:1	нативная	0,7	1,4

Необходимо отметить, что данный тип субстрата при его сбраживании анаэробным сообществом вызывал скачкообразные изменения pH от 5 до 9 в связи с высоким содержанием белка (биомасса гриба) и процессами его аммонификации. В термофильных сообществах высокое содержание аммония приводит к ингибированию образования метана метаногенами (Robles et al., 2018). Известно, что высокие концентрации аммония ингибируют ацетокластический метаногенез (Schink, 1997; Qu et al., 2009). На среде с дополнительным внесением сахарозы гриб образует больше биомассы, а следовательно, и процессы аммонификации проходят активнее. Таким образом, использование дополнительного ко-

субстрата в виде углеводов не только не повышает суммарную активность целлюлозолитических ферментов, но и наоборот может ингибировать (опосредовано) дальнейшие этапы метаногенеза.

Оптимальными условиями для предобработки офисной бумаги культурой *A. terreus* оказались культивирование микромицета на среде без дополнительного ко-субстрата (сахарозы) и внесение инокулята в виде мицелия, а не суспензией спор (что может объясняться более длительным периодом развития культуры при засеве спорами, в то время как засев мицелием позволяет микромицету сразу же синтезировать необходимые целлюлазы). Дополнительная термическая обработка биомассы оказывает, скорее, негативный эффект на развитие микробных сообществ и выход биогаза, что может объясняться разрушением питательных веществ (в особенности витаминов и факторов роста). В статье Bigelow and Wyman (2002) продемонстрировали ингибирование образования биомассы микромицета *T. reesei* при добавлении в среду более чем 40 % термически гидролизованного (автоклавированного) субстрата. При использовании нативной (живой) биомассы нами были получены наибольшие показатели содержания метана в образуемом биогазе. Кроме того, с экономической точки зрения дополнительная термическая обработка также не выгодна из-за финансовых и энергетических затрат.

Однако максимальное кумулятивное содержание метана при подобной схеме эксперимента составило лишь 28,2 % CH₄, что не удовлетворяет условиям эффективного образования биогаза. Это может объясняться тем, что большинство грибов в процессе биоразложения лигноцеллюлозной продукции потребляют основную массу целлюлозы и её остается недостаточно для активного роста и развития бактерий и архей в микробном сообществе, что согласуется с данными полученными Mshandete с соавторами (2005) и Muthangya с соавторами (2009). В связи с этим, для повышения эффективности утилизации субстратов были использованы и другие лигноцеллюлозные материалы (фитомасса топинамбура), а также более активный микромицет, *T. viride* (см. главу 3.2.1). Из бумажной продукции использовали офисную бумагу и смесь бумаг. По результатам экспериментов, проведенных с *A. terreus* (таблица 14), инокуляцию триходермы проводили засевом мицелием, биомассу после предобработки грибом для конверсии в биогаз вносили, разбавляя её средой для метаногенов (1:1). Инокулятом для развития метаногенного сообщества служили МС Σ 4, а также навоз крупного рогатого скота (КРС). Результаты эксперимента представлены в таблице 15.

Таблица 15. Предобработка целлюлозосодержащих субстратов микромицетом *T. viride* с последующей биоконверсией в биогаз

Субстрат	Микробное анаэробное сообщество	Продолжительность культивирования микромицета на момент отбора биомассы, сутки	Образование биогаза из грибной биомассы		
			Кумулятивное содержание CH ₄ , %	Содержание CH ₄ , ммоль/л среды	Содержание CH ₄ , мл/г субстрата
топинамбур	Σ4	0	30,2	24,4	36,4
смесь бумаг			39,1	55,2	82,4
офисная бумага			35,6	44,1	65,9
топинамбур	KPC	0	56,3	69,7	104
смесь бумаг			23,9	29,5	44,1
офисная бумага			43,9	213,1	318,3
топинамбур	Σ4	1	18,7	15,6	23,3
смесь бумаг			30,8	51,6	77
офисная бумага			10	12,4	18,5
топинамбур	KPC	1	41,6	51,5	76,9
смесь бумаг			42,7	52,9	79
офисная бумага			35,3	115	171,7
топинамбур	Σ4	3	36,7	17,8	26,6
смесь бумаг			27,9	30,8	46
офисная бумага			0,1	0,1	0,2
топинамбур	KPC	3	48,8	60,4	90,1
смесь бумаг			52,3	64,7	96,6
офисная бумага			33,6	115,1	171,9
топинамбур	Σ4	9	45,1	14,3	21,3
смесь бумаг			21,7	18,9	28,3
офисная бумага			18	22,3	33,4
топинамбур	KPC	9	42,8	53	79,1
смесь бумаг			20,1	24,9	37,1
офисная бумага			38,7	128,8	192,4

По сравнению с предыдущим исследованием (с использованием *A. terreus*) выход метана в этой серии экспериментов увеличился на 20-30 %. Кумулятивное содержание метана в биогазе составило 20-52 % при разложении смеси бумаг и 18-56 % при разложении фитомассы топинамбура. Для сообщества Σ4 наибольший выход метана составил 36,4 мл/г топинамбура, 82,4 мл/г смеси бумаг и 65,9 мл/г офисной бумаги, а для метаногенного сообщества навоза KPC - 104 мл/г топинамбура, 96,6 мл/г смеси бумаг и 318,3 мл/г офисной бумаги. При использовании навоза KPC в качестве инокулята были получены более высокие значения выхода метана, особенно при использовании фитомассы топинамбура, что можно объяснить содержанием питательных веществ в данном типе инокулята, а также тем, что эти сообщества обладают большим разнообразием бактерий и архей, их более высоким количественным содержанием и метаболической активностью. (Amon et al., 2007; Castrillon et al., 2011). Однако необходимо

отметить, что при гидролизе смеси бумажной продукции, состоящей из офисной, журнальной и газетной бумаги, а также картона, показатели биоконверсии этого субстрата были сходными для обоих типов сообществ, что подтверждает возможность использования и необходимость селекции МС на целлюлозосодержащих субстратах для получения активных и стабильных консорциумов микроорганизмов.

Тот факт, что биоконверсия офисной бумаги проходит наилучшим образом в исходной (нулевой) точке культивирования гриба (т.е. без предобработки) объясняется тем, что данный субстрат практически не содержит лигнин (1,2-1,4 %; Guerfali et al., 2015) и в исходном виде подвергается полному гидролизу и биоконверсии в метан самим микробным сообществом. При предкультивировании микромицета на офисной бумаге субстрат полностью «съедается» грибом.

Напротив, при культивировании сообщества КРС на смеси бумаг было выявлено увеличение образования биогаза именно после предобработки культурой *T. viride*. На рисунке 24 видно, что эффективность гидролиза субстрата и его конверсия в биогаз (объем метана в пересчете на г субстрата) увеличивается в 2 раза при использовании предобработки смеси бумаг грибом (к 3-м суткам при сравнении с необработанным субстратом). При этом максимальное значение кумулятивного содержания метана составило 52,3 %.

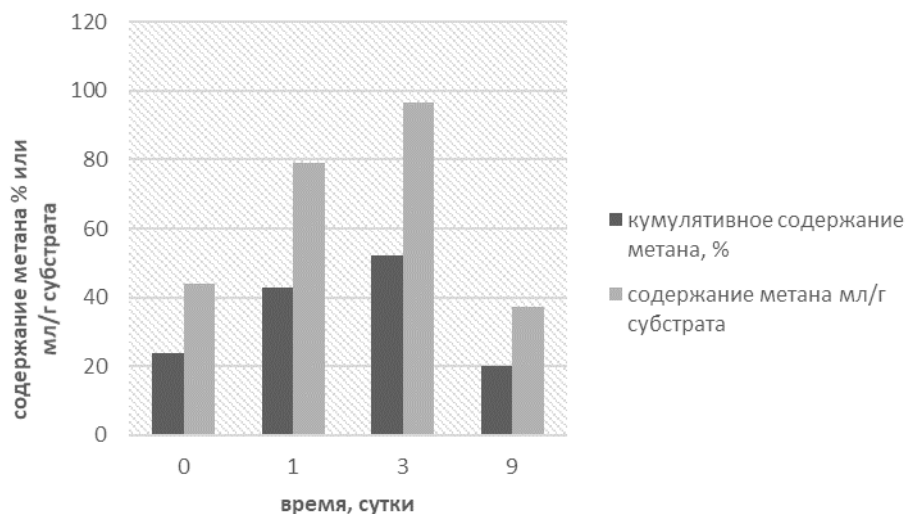


Рисунок 24. Образование метана сообществом навоза КРС на биомассе *T. viride*, выращенной на смеси бумаг

Использование МС $\Sigma 4$, селекция которого проходила на фильтровальной бумаге (Цавкелова и др., 2012б), показало, что для эффективной конверсии фильтровальной бумаги и смеси бумаг нет необходимости в предобработке грибом. Поэтому очевидна эффективность подхода по селекции разнообразных микробных сообществ, которые могут благодаря своей целлюлозолитической активности частично или полностью элиминировать стадию предобработки (как минимум, на примере бумажной продукции). Если сравнивать с

результатами, полученными нами, когда выбранное сообщество культивировали на смеси бумаг (таблица 15), где исходно максимальное содержание метана составило 52,7 % (184,6 мл/г), было отмечено некоторое снижение эффективности биоконверсии субстрата (39,1 % и 82,4 мл/г соответственно), что может быть связано с разбавлением среды для культивирования сообщества в два раза при внесении равного объема грибной биомассы в среде Чапека-Докса, на которой культивировали гриб.

Иную картину наблюдали при биоразложении фитомассы топинамбура (*Helianthus tuberosus*). Предобработка этого субстрата микромицетом *T. viride* способствовала увеличению максимальных показателей образования биогаза (45 %) микробным сообществом $\Sigma 4$ (таблица 15). По сравнению с исходным (без предобработки) типом субстрата, выход метана увеличился в 1,5 раза. В то же время сообщество, выделенное из навоза КРС, наоборот, было наиболее эффективным в нулевой точке (56,3 %), что можно объяснить селекцией микробиоты КРС по субстрату (растительная фитомасса) и дополнительным разбавлением среды для культивирования МС средой для микромицета. Помимо биоразложения целлюлозосодержащей продукции и ее биоконверсии в биотопливо (биогаз), для полной утилизации субстрата возможно использование оставшейся после обработки биомассы в качестве удобрения для сельскохозяйственных культур растений в связи с высоким содержанием в ней соединений азота, фосфора и калия (Mshandete et al., 2005; Muthangya et al., 2009).

3.3. Изучение анаэробных термофильных микробных сообществ

3.3.1. Образование биогаза анаэробными микробными сообществами из целлюлозосодержащего сырья

Для исследования биотехнологического потенциала анаэробных микробных сообществ (МС), способных к разложению целлюлозосодержащих субстратов в виде различных типов бумажной продукции с последующей их конверсией в биогаз, а также с целью изучения структуры этих сообществ, была проведена их селекция из исходных консорциумов, выделенных ранее из различных источников (Цавкелова и др., 2012а). Ранее (Цавкелова и др., 2012а, 2012б) было показано, что некоторые микробные сообщества оказались способны к образованию биогаза на фильтровальной бумаге с содержанием в нём метана около 55-60 %. Для создания наиболее эффективного микробного консорциума, несколько таких продуктивных в отношении образования биогаза сообществ объединили вместе (таблица 16). Кроме того, для сравнения эффективности биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов было также использовано и мезофильное сообщество метанобразующих микроорганизмов.

На начальном этапе эксперимента селекцию микробных сообществ проводили с использованием фильтровальной и офисной бумаг, поскольку эти субстраты практически не содержат лигнин (0 % и 1,2-1,4 %) и состоят из целлюлозы на 100 % и 78,6-84,9 % соответственно (Yuan et al., 2012; Guerfali et al., 2015). Для определения стабильности образования биогаза, сообщества пересевали в течение трех пассажей (каждый пассаж длился в течение 18 дней).

Таблица 16. Состав исследуемых микробных сообществ, сконструированных из МС (Цавкелова и др. 2012), выделенных ранее

№ сообществ	t° C культивирования сообществ	Источник и место выделения
1+21	37°	Навоз антилопы гну (Зоопарк, Москва) Компостная куча № 1 (Московская обл.)
3	55°	Жом красного винограда (Дагестан)
20	55°	Навоз пони(Зоопарк, Москва)
22	55°	Навоз черной антилопы (Зоопарк, Москва)
Σ4 (6+17+19+21)	55°	Навоз крупного рогатого скота (КРС, №6), донные осадки пруда (№ 17), навоз зебры (№ 19),навоз антилопы гну (№ 21)
Σ7 (3+20+22+6+17+19+21)	55°	Жом красного винограда (№ 3), навоз пони (№. 20), навоз черной антилопы (№ 22), навоз крупного рогатого скота (№ 6) , донные осадки пруда (№ 17), навоз зебры (№ 19), навоз антилопы гну (№ 21)

Исходя из данных, полученных Цавкеловой с соавторами (2012), наиболее эффективную биоконверсию офисной бумаги осуществляли термофильные сообщества № 3, 20 и 22, образуя 51,25 %, 50,33 % и 50,41 % метана, соответственно. На основании этих данных, отдельные МС № 3, 20 и 22 были отобраны для дальнейшей работы по изучению биотрансформации лигноцеллюлозосодержащих субстратов. При этом также было сконструировано МС Σ4 из сообществ № 6, 17, 19, 21, показавших меньшую активность и образующих - 48,61 %, 48,6 %, 49,09 % и 48,77 % по кумулятивному содержанию метана (Цавкелова и др., 2012). Для расширения микробного состава потенциального сообщества, с целью увеличения трофических взаимодействий и тем самым увеличения образования метана, было собрано МС Σ7, содержащее все вышеперечисленные термофильные МС. По сравнению с отдельными сообществами № 3 и 20, которые проявляли себя одними из наиболее эффективных и стабильных при конверсии офисной бумаги в биогаз (Цавкелова и др., 2012б), составные микробные сообщества Σ4 и Σ7, а также сообщество №22 оказались более эффективными продуцентами биогаза при культивировании на офисной бумаге с черно-белой печатью при 55 °С в течение 1 пассажа (рисунок 25). Содержание метана в образованном составными МС биогазе было на 10-20 % больше, чем в пробах МС № 3 и 20.

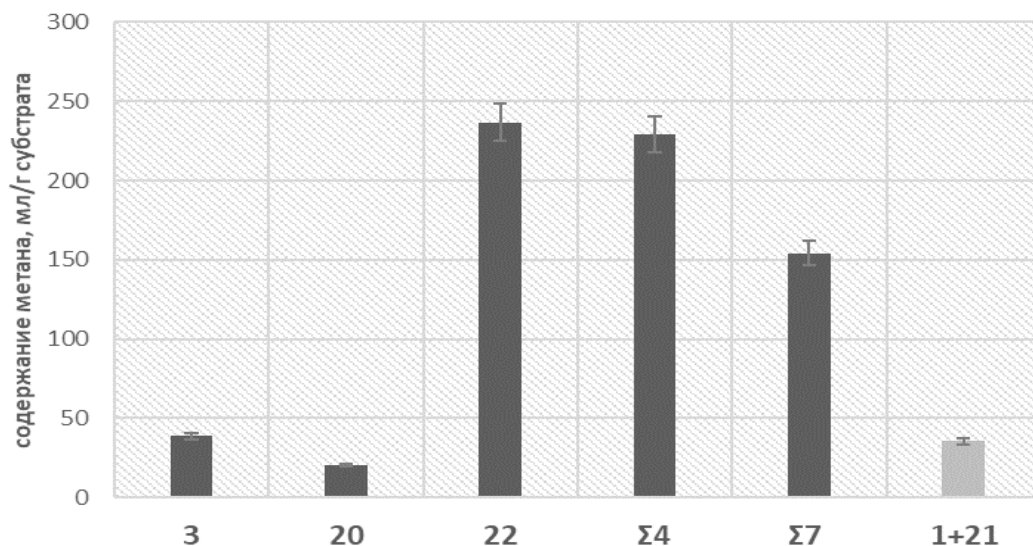


Рисунок 25. Сравнение эффективности МС, культивируемых на офисной бумаге в течение 18 дней, по количеству образуемого метана в мл CH_4 /г субстрата. МС: термофильные - № 3, 20, 22, Σ4, Σ7 и мезофильное - 1+21

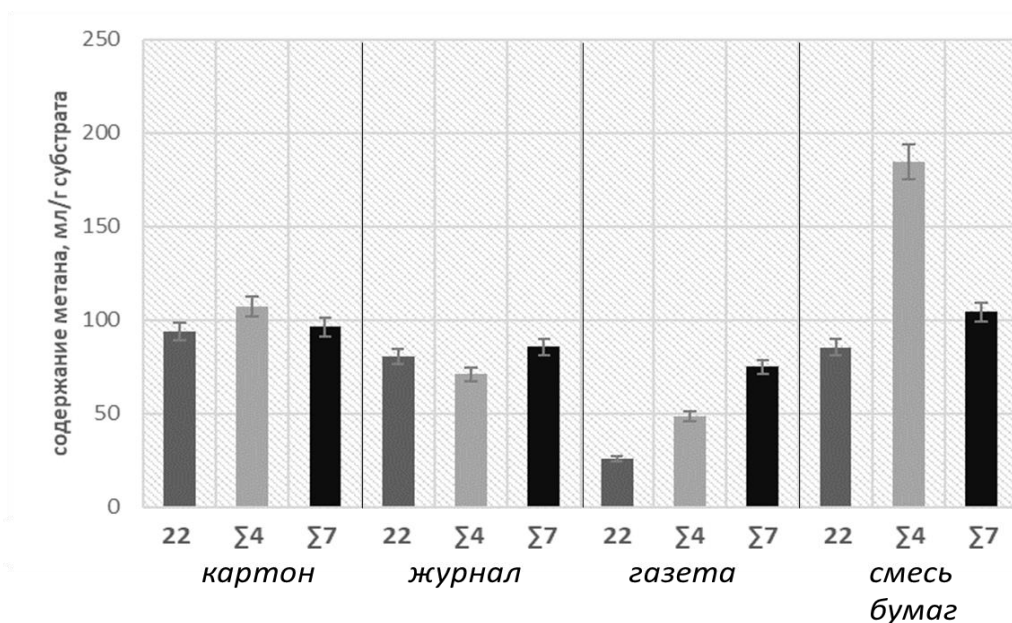


Рисунок 26. Сравнение эффективности МС, культивируемых на лигноцеллюлозосодержащих субстратах (гофрированный картон, газетная и журнальная бумаги, смесь бумаг) в течение 18 дней, по количеству образуемого метана в мл CH_4 /г субстрата. МС: термофильные - № 22, Σ4 и Σ7

Единственное суммарное мезофильное сообщество, объединённое из ранее активных сообществ №1 и №21, было исключено из дальнейших исследований, поскольку достижение максимального выхода метана происходило только после месяца культивирования на 35 сутки, и процесс деструкции субстратов (фильтровальной и офисной бумаги) в биогаз занимал в 2 раза больше времени, чем при культивировании более активных термофильных сообществ. При этом выход метана составил 32,9 мл CH_4 /г субстрата и 35,6 мл CH_4 /г субстрата, а содержание метана

в биогазе - 21,2 % и 19,2 %, соответственно. Известно, что в мезофильных условиях (30-40 °C) в процессе деструкции органических субстратов МС представлено большим разнообразием микроорганизмов. Среди метаногенов оптимальную температуру для роста 30-40 °C имеют *Methanocorpusculum*, *Methanogenium*, *Methanoplanus*, *Methanococcoides*, *Methanospirillum*, *Methanohalophilus*, *Methanlobus* (Robles et al., 2018), что обеспечивает для мезофильных сообществ сопоставимые с термофильными МС значения кумулятивного содержания метана. Было показано, что при культивировании в реакторах в течение 90 дней мезофильного и термофильного МС выход метана составил 325,3 и 324,9 л СН₄/кг органического вещества соответственно (Moset et al., 2015).

В тестируемых нами условиях наибольшую эффективность показали именно сообщества Σ4 и Σ7 по сравнению с МС №22 (рисунок 26), которые и были использованы для дальнейшего изучения состава термофильных целлюлозолитических метаногенных микробных консорциумов, способных к конверсии различных типов бумаги в биогаз. При анализе их активности в отношении образования биогаза, эти сообщества различались по количествам образуемого метана в составе биогаза, а также по степени гидролиза исходного субстрата. В таблице 17 представлены результаты по выходу биогаза при культивировании суммарных термофильных сообществ на офисной бумаге с черно-белой печатью, картоне, газетной и журнальной бумагах, а также смеси всех типов бумаг.

Наиболее биоразлагаемым субстратом является офисная бумага, при этом максимальный объем биогаза, образуемого в пересчете на г исходного субстрата, составил 228,9 и 154,3 мл СН₄/г для сообществ Σ4 и Σ7, соответственно. Другие исследователи также указывают, что офисная бумага по скорости разложения и количеству образуемого кумулятивного метана практически сходна с чистой целлюлозой, в то время как картон (как гофрированный, так и оберточный), может содержать в своем составе до 5 % лигнина и гидролизует менее активно (Owens and Chynoweth, 1993). В нашей работе мы подтвердили стабильную высокую активность селективированных целлюлозоразлагающих сообществ, которые способны образовывать биогаз на этом субстрате с более чем с 60 %-м содержанием метана в нём.

Таблица 17. Образование биогаза термофильными анаэробными микробными сообществами на различных типах бумаг

Субстрат	МС №	Кумулятивное содержание CH_4 , % ¹	Содержание CH_4		Общий объем биогаза, мл
			мл/г субстрата ²	ммол/л биогаза	
офисная бумага	$\Sigma 4$	$62,5 \pm 3,7^3$	$228,9 \pm 16,0$	$149,6 \pm 16,1$	$201,1 \pm 5,2$
	$\Sigma 7$	$63,4 \pm 2,8$	$154,3 \pm 7,8$	$104,8 \pm 3,1$	$135,2 \pm 8,7$
гофрированный картон	$\Sigma 4$	$57,9 \pm 3,0$	$107,2 \pm 4,2$	$71,8 \pm 2,5$	$233,0 \pm 10,8$
	$\Sigma 7$	$49,5 \pm 4,7$	$96,2 \pm 3,2$	$63,0 \pm 1,9$	$110,47 \pm 3,7$
газета	$\Sigma 4$	$26,2 \pm 4,6$	$48,5 \pm 1,9$	$32,5 \pm 0,5$	$58,1 \pm 1,2$
	$\Sigma 7$	$40,4 \pm 2,2$	$74,9 \pm 5,7$	$47,3 \pm 0,9$	$90,3 \pm 2,9$
смесь бумаг	$\Sigma 4$	$52,7 \pm 1,8$	$184,6 \pm 3,9$	$123,1 \pm 1,2$	$188,3 \pm 3,4$
	$\Sigma 7$	$56,4 \pm 3,4$	$104,2 \pm 7,1$	$69,8 \pm 2,4$	$175,7 \pm 5,2$
журнальная бумага	$\Sigma 4$	$39,2 \pm 2,2$	$70,9 \pm 3,6$	$48,6 \pm 0,4$	$59,1 \pm 1,5$
	$\Sigma 7$	$46,0 \pm 3,6$	$85,6 \pm 6,8$	$59,8 \pm 0,8$	$64,7 \pm 5,1$

Примечания:

1) кумулятивное содержание метана - это количество метана, рассчитанное в процентном соотношении от количества образованного биогаза при культивировании МС в течении 20 дней; концентрации газов были определены при стандартных температуре и давлении (СТД), по описанным ранее формулам (Малахова и др., 2015): $A = (\Sigma V_{\text{gas}} / \Sigma V_{\text{mixture}}) \times 100$, где ΣV_{gas} - суммарный объем по каждому газу (CH_4 , CO_2 , H_2) и $\Sigma V_{\text{mixture}}$ - суммарный объем биогаза. V_{gas} определяли как $V_{\text{gas}} = (P V_{\text{vial}} T_{\text{standard}} a) / (P_{\text{standard}} T \times 100)$, где a - концентрация газа, измеренная на хроматографе (%), P - давление во флаконе (в барах), P_{standard} и T_{standard} - СТД, V_{vial} - объем газовой фазы во флаконе. Согласно закону Авогадро $v = V_{\text{gas}} / 22,4$, 1 моль газообразного вещества занимает объем 22,4л при СТД.

2) содержание метана - определяли как общий объем метана, образуемого в процессе ферментации, рассчитанный с учетом СТД ($P = 101\,325$ Па (1 атмосфера) и $T = 273,15$ К), выраженный в мл CH_4 на г субстрата (измеряли точный вес после высушивания при 105°C) или в ммоль CH_4 на объем (л) образованного биогаза.

3) измерения проводили в трех повторностях, указано среднее значение с учетом стандартного отклонения.

Хуже всего биоразложению подвергались газетная и журнальная бумаги с 26,2 % и 39,2 % кумулятивного метана и около 58-59 мл общего объема образуемого биогаза сообществом $\Sigma 4$. Это может объясняться высоким содержанием лигнина в этом типе бумажной продукции. Так, газетная бумага может содержать только 40-58 % целлюлозы с 17-26 % гемицеллюлозы и достаточно высоким наполнением лигнина 11-20 % (Sun and Cheng, 2002; Chen et al., 2015). Однако, негативное влияние на рост и развитие микроорганизмов на газетной бумаге может быть также связано с использованием различных биоцидов в процессе производства бумаги и различных химических реагентов (хелатирующие агенты, сурфактанты, пеногасители,

осушители и т.д.), клеи, чернила и красители (Chen et al., 2015). Полученные нами результаты, в целом, соотносятся с литературными данными: так, при культивировании термофильных сообществ на старых газетах, гофрированном картоне и офисной бумаге выход биогаза составил 74,3, 152,3 и 217,3 мл $\text{CH}_4/\text{г}$ сухой массы соответственно (Eleazer et al., 1997). При культивировании на бумажной продукции, отобранные нами сообщества, образовывали в среднем 50-60 % метана, что удовлетворяет современным требованиям для поиска эффективных сообществ по продукции биогаза.

Несмотря на то, что оба микробных сообщества несколько отличались в показателях выделения биогаза, тем не менее, общая тенденция при образовании метана на различных бумажных субстратах была сходной: от наиболее высоких показателей на офисной бумаге, резкого снижения выхода биогаза на журнальной и газетной бумагах до удержания достаточно высокой продуктивности при использовании смеси бумаг (макулатуры; рисунок 27). Так, кумулятивное содержание метана для $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$ сообществ составило 52,7 % и 56,4 % соответственно, а общий объем образуемого биогаза - 188,3мл и 175,7мл.

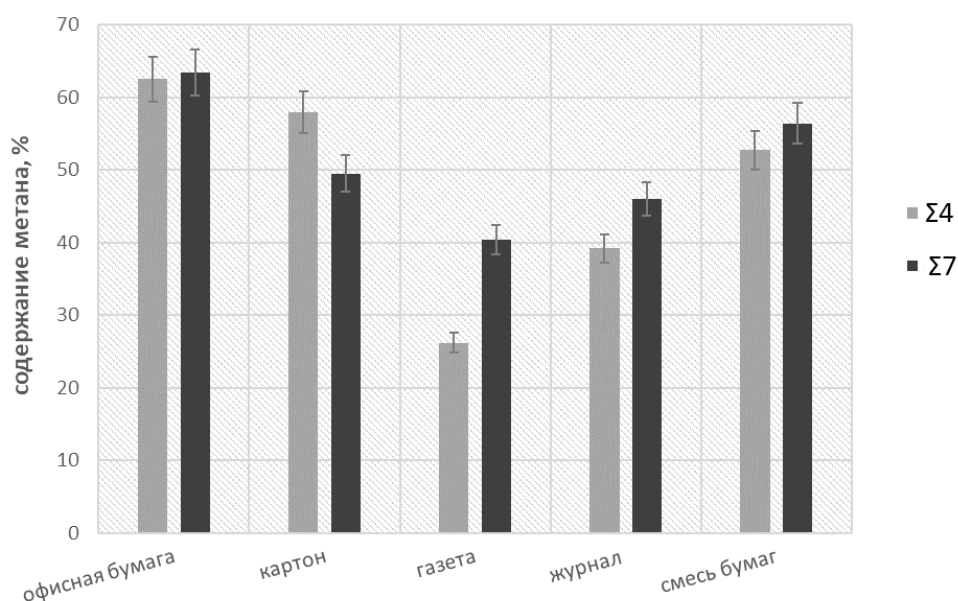


Рисунок 27. Сравнение двух термофильных анаэробных целлюлозоразлагающих сообществ по выходу метана при деструкции различных типов бумажной продукции

Биоконверсия макулатуры в биогаз является эффективной стратегией для одновременного использования трудно гидролизуемых газетной и журнальной бумаги при их совместном использовании с легко гидролизуемыми субстратами - офисной бумагой и гофрированным картоном. Наличие лигнина затрудняет гидролиз лигноцеллюлозных субстратов, так как из-за необратимого связывания гидролитических ферментов блокируется доступ целлюлаз

непосредственно к фибриллам целлюлозы (Lynd et al., 2002; Sun and Cheng, 2002). При культивировании микробных сообществ на смеси бумаг отрицательный эффект вышеперечисленных факторов нивелируется, в том числе и из-за количественного содержания разных типов бумаг в составе смеси, где содержание каждого отдельного типа бумаги меньше, чем при использовании отдельных субстратов (3,75 г вместо 15 г). Ингибирующий эффект химических биоцидов уменьшается, как и общее содержание лигнина в обрабатываемой смеси, что даёт возможность для активной деструкции целлюлозы, в том числе и за счет синергетического эффекта действия различных ферментов микроорганизмов-гидролитиков.

3.3.2. Изучение структуры и состава микробных анаэробных сообществ

Большинство исследований структуры образующих биогаз анаэробных сообществ проведены на мезофильных консорциумах и, в основном, при изучении метаногенных сообществ, используемых при очистке сточных вод или при переработке отходов содержания сельскохозяйственных животных. При этом состав микробных сообществ, образующих биогаз, существенно различается не только в зависимости от источника инокулята, но и в значительной степени от используемого субстрата, а также от влияния абиотических факторов (температуры, pH, доступности кислорода). По данным Leven с соавторами (2007) при разложении органических, в том числе целлюлозосодержащих отходов, анализ микробных сообществ, выращенных при 37 °C и 55 °C, показал, что представители *Bacteroidetes* (34 % от общего числа клонов) и *Chloroflexi* (27 %) доминировали в мезофильных условиях, в то время как в термофильных условиях преобладали *Thermotogae* (61 %). Основными представителями архей были *Methanospirillum* и *Methanosarcina* в мезофильных и термофильных условиях соответственно.

3.3.2.1. Микроскопия

Для выяснения структуры и биоразнообразия входящих в исследуемые $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$ сообщества микробных популяций, они были проанализированы с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), а также с помощью молекулярно-генетических методов: ДГГЭ и метагеномного анализа HTS. Образцы для световой микроскопии и СЭМ отбирали в процессе селекции $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$ МС, что позволило также наблюдать некоторую динамику в развитии сообществ (рисунок 28, 29). В результате были обнаружены разнообразные по форме микроорганизмы, среди морфотипов которых преобладали длинные и короткие палочки, со спорами и без них, одиночные и соединенные в цепочки, и клеточные агломераты (рисунок 28).

Также встречались кокковидные клетки и клетки неправильной формы (изогнутые). Большое количество обнаруженных споровых форм может говорить в пользу присутствия клостридий-подобных бактерий, которые обычно широко представлены в анаэробных сообществах в качестве гидролитиков, особенно значима их роль в гидролизе целлюлозы (Lynd et al., 2002). Микробные клетки объединялись вокруг частиц субстрата и волокон целлюлозы (рисунок 28 В, D). Известно, что способность к адгезии является важнейшей особенностью анаэробных целлюлозолитических микроорганизмов, входящих в состав метаногенных сообществ (O'Sullivan et al., 2008). Было также отмечено, что клетки микроорганизмов дополнительно объединяются с помощью межклеточного матрикса, формируя клеточные микропопуляции, тем самым увеличивая свою численность и активность секретируемых ими целлюлаз. При этом разнообразие и количество микроорганизмов отличалось внутри одного сообщества в зависимости от используемого субстрата, на котором его культивировали. Так, наибольшая плотность популяции и максимальное разнообразие морфотипов были отмечены при использовании смеси бумаг (рисунок 28 В).

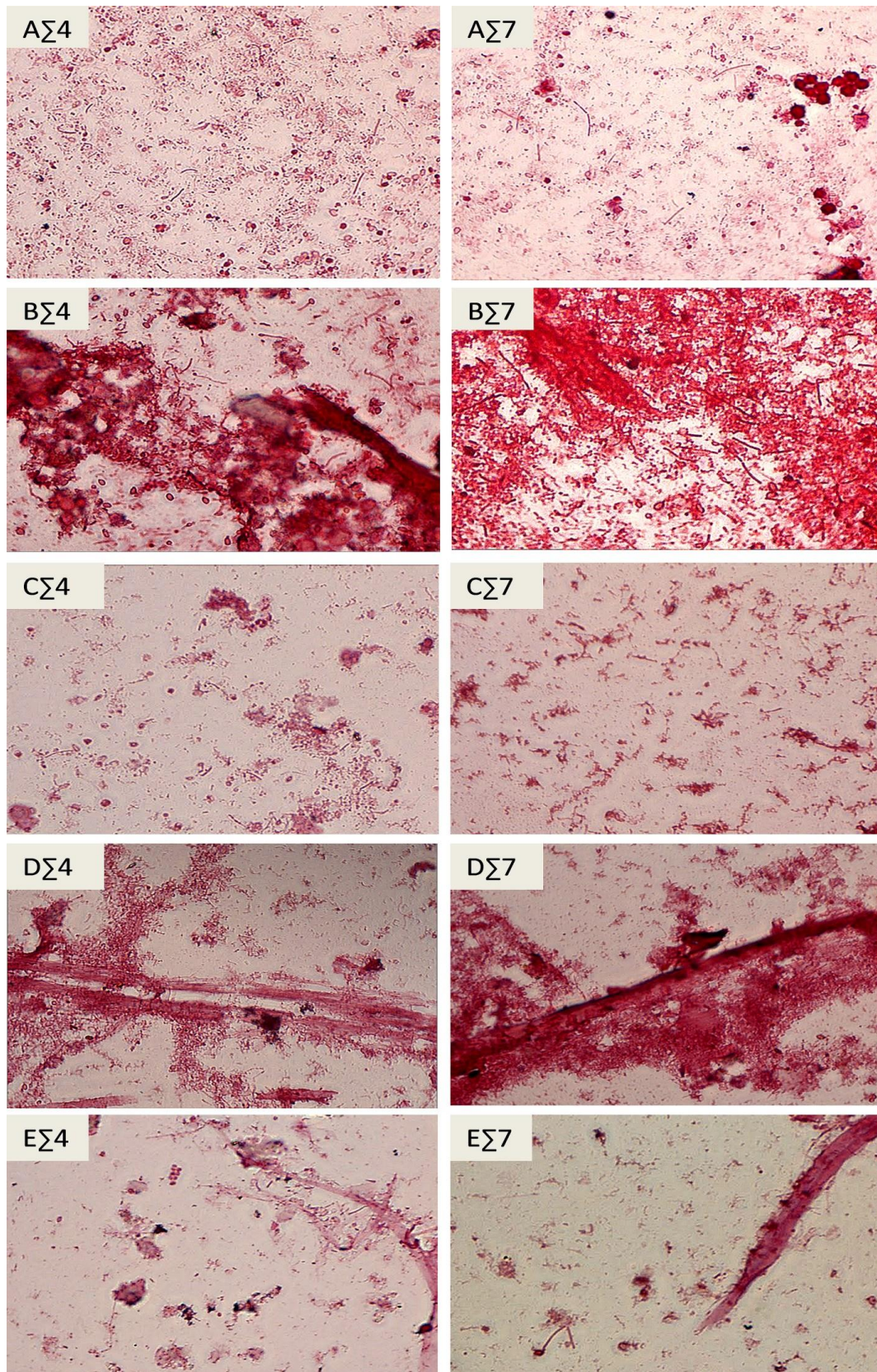


Рисунок 28. Разнообразие морфотипов клеток в микробных анаэробных сообществах $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$, культивируемых на офисной бумаге (А), смеси бумаг (В), газете (С), гофрированном картоне (D) и журнальной бумаге (Е). Световая микроскопия (Nikon Eclipse E100, Japan; magnification x900; Tsavkelova et al., 2017)

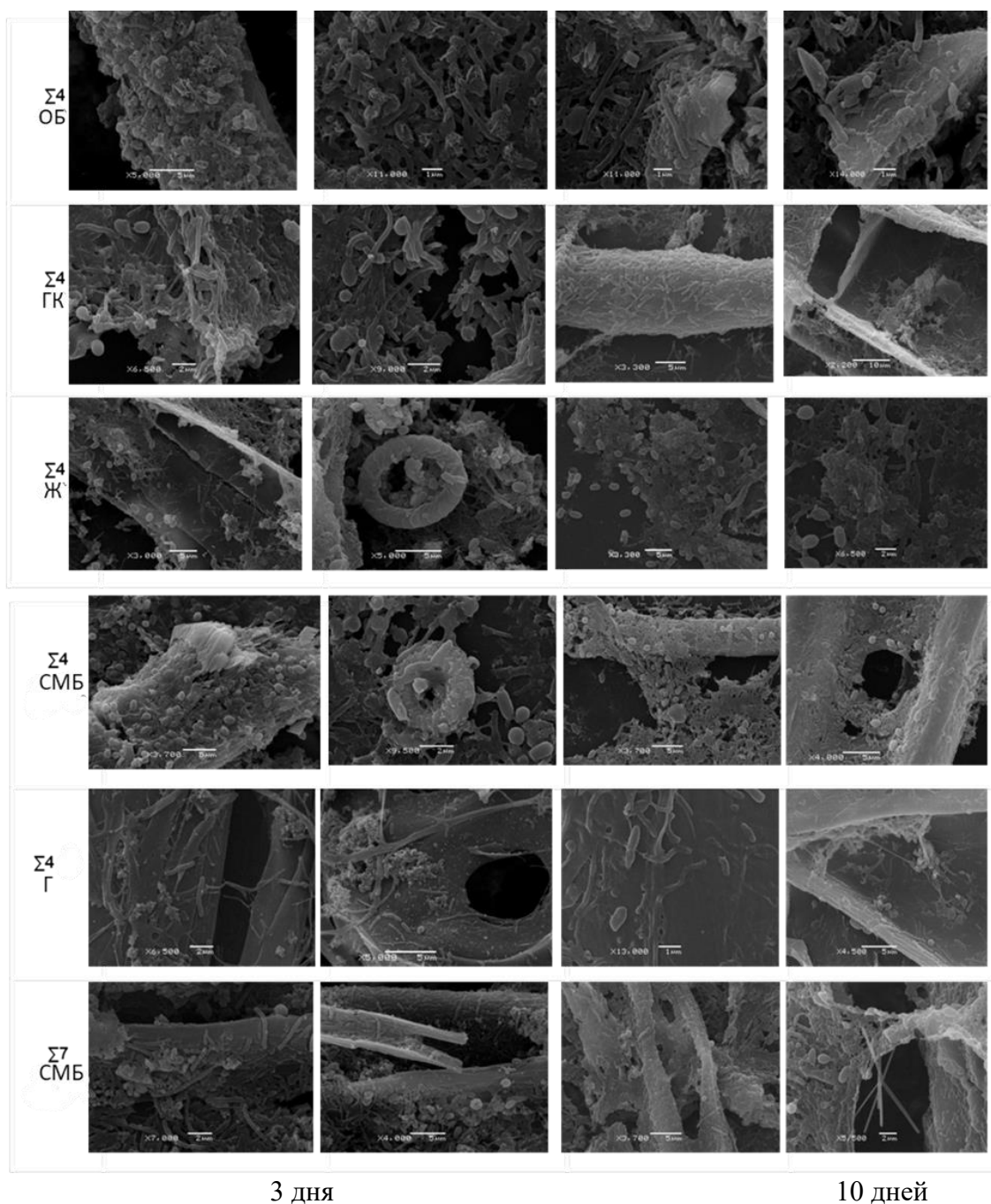


Рисунок 29. Термофильное анаэробное сообщество $\Sigma 4$ после 3 и 10 суток культивирования на разных типах бумаг: офисная бумага (ОБ), гофрированный картон (ГК), журнальная (Ж) и газетная (Г) бумаги, смесь бумаг (СМБ), в сравнении с МС $\Sigma 7$, культивируемом на смеси бумаг. Сканирующая электронная микроскопия

Высокая степень гидролиза картона (таблица 17) и его биоконверсии в биогаз также подтверждается микроскопическими исследованиями, показывающими присутствие гидролитических микроорганизмов, адгезированных на частицах субстрата. В то же время, как и ожидалось, на газетной бумаге (рисунок 29) микроорганизмы имели минимальные различия форм и типов.

Анализ на основе СЭМ подтвердил результаты световой микроскопии (рисунки 28, 29): так, на образцах с трудноразлагаемыми журнальной и газетной бумагами микроорганизмы были представлены в небольшом количестве на протяжении 10 дней культивирования, споры были почти единственными обнаруженными клетками и в образце с журнальной бумагой даже после 10 дней культивирования. Напротив, наиболее интенсивное образование микробных популяций и биопленок было замечено на легко разлагаемых субстратах, таких как офисная бумага и гофрированный картон, но также и на бумажной смеси. Активная колонизация поверхности субстрата наблюдалась уже через 3 дня культивирования, при этом среди доминирующих морфотипов были длинные палочки, короткие утолщенные палочки и длинные нитевидные палочки. Округлые структуры, наблюдаемые в образцах, принадлежат коколитоформам, представляющим собой группу древнего планктона, формирующего меловые отложения; мел использовали в работе, добавляя к среде для стабилизации pH.

3.3.2.2. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез. Анализ состава доминирующих популяций бактерий и архей

Для изучения наиболее многочисленных популяций микроорганизмов, а также изменений в составе исследуемых МС, был проведен анализ с помощью нескольких ДГГЭ. Результаты первого типа ДГГЭ, сделанного на основе двухступенчатой ПЦР с использованием бактериальных праймеров Bact907R и Univ515F, а затем Bact907R и Univ518F-GC представлен на рисунок 30 А. На фореграмме были обнаружены многочисленные полосы, однако, после секвенирования ДНК, элюированной из этих полос, удалось получить только 10 качественных сиквенсов (таблица 18). «Бактериальный» профиль по ДГГЭ подтвердил результаты световой и электронной микроскопии: наименьшее разнообразие микроорганизмов (количество полос) наблюдали в образцах сообществ, культивируемых на газетной и журнальной бумагах, тогда как максимальное количество полос было обнаружено при их культивировании на офисной бумаге и смеси бумаг. При сравнении двух сообществ ($\Sigma 4$ и $\Sigma 7$), выращенных на смеси бумаг, ДГГЭ профиль сообщества $\Sigma 4$ был представлен большим разнообразием микроорганизмов (числом обнаруженных полос).

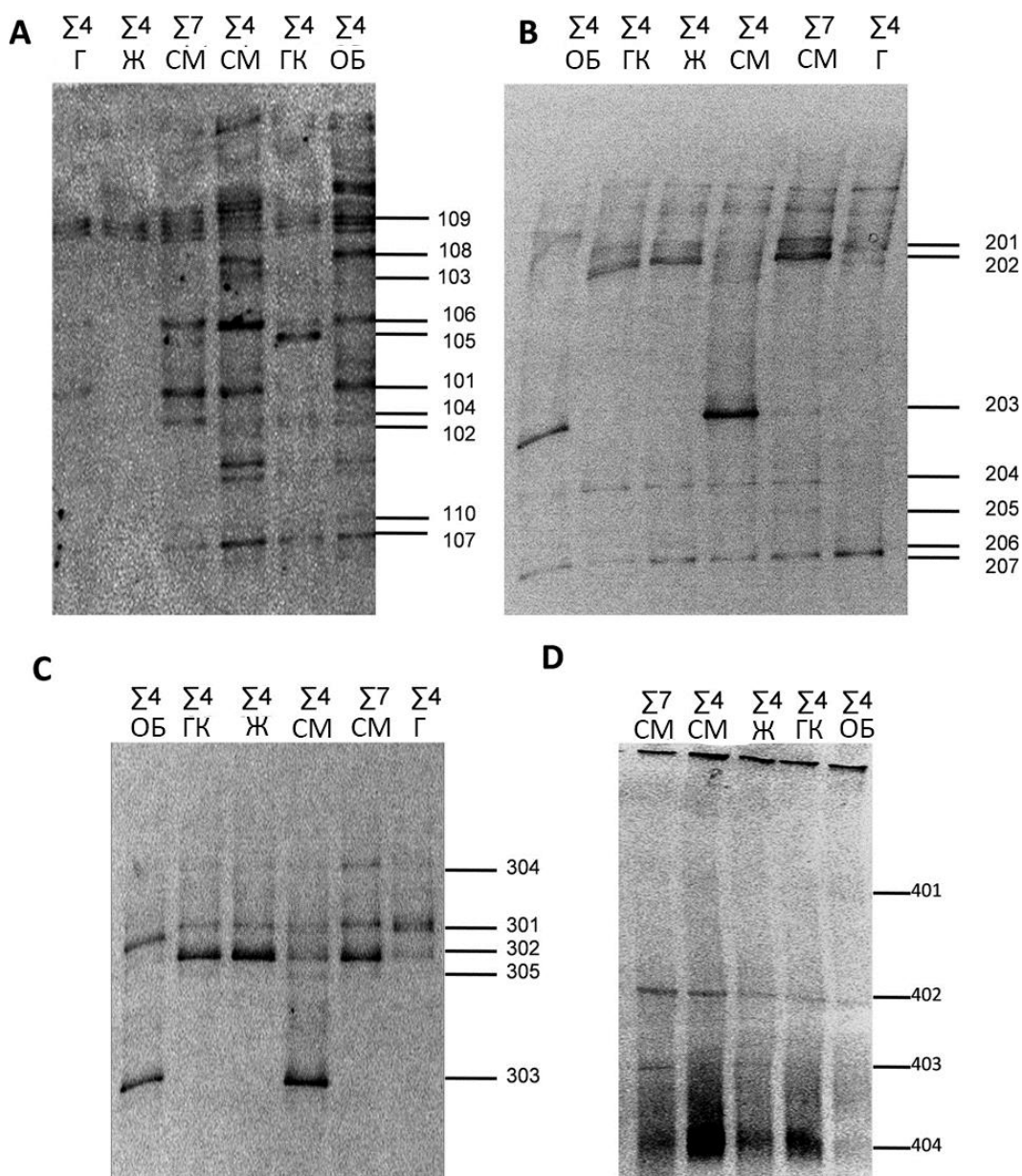


Рисунок 30. Бактериальные (А-С) и архейный (D) профили (фореграммы) ДГГЭ, полученные с помощью: набора праймеров Bact907R - Univ515F (A); вложенной (nested) ПЦР (B) (первая праймерная пара - 63F - 1387R, а вторая праймерная пара - Com1-GC - Bact907); одноступенчатой ПЦР (C) с использованием пары праймеров Com1-GC - Bact907R; набора праймеров Univ518F - Arch915R и Univ515F-GC-Arch915R (D). В качестве целлюлозосодержащих субстратов использовали: ОБ - офисная бумага, ГК- гофрированный картон, Ж - журнальная бумага, СМ - смесь бумаг и Г - газетная бумага. Полосы на фореграммах пронумерованы 101-111 (A); 201-207 (B); 301-305 (C); 401-408 (D) - соответствующие последовательностям 16S рРНК, приведенным в таблице 18

Доминирующим типом в идентифицированных образцах являются представители *Firmicutes*, включая 5 различных родов: *Acetivibrio*, *Thermoanaerobacteraceae*, *DeFluviitalea*, *Tepidanaerobacter* и *Herbinex*, а также представители типов *Thermotogae* и *Bacteroidetes*. Одна из наиболее широких и ярких полос была идентифицирована как *Herbinex hemicellulosilytica* (полоса 105) и обнаружена только в образцах СМ, культивируемых на картоне; более слабо она

визуализировалась в МС, выращенных на смеси бумаг. Она полностью отсутствовала в МС, культивируемых на офисной бумаге, газетной и журнальной бумагах. *Petrimonas* sp. (полоса 103) также почти не был выявлен на офисной бумаге, и, наоборот, отчетливо присутствовал в МС на смеси бумаг. *Acetivibrio cellulolyticus* удалось идентифицировать для всех тестируемых субстратов, тогда как *Defluviitoga tunisiensis* не выявлялась на журнальной бумаге и гофрированном картоне. При проведении ДГГЭ было отмечено, что если полосы в геле мигрировали с равной скоростью и оказывались на одинаковом расстоянии (при сравнении разных образцов), - процент сходства между ними составлял 99 %-100 %. Однако поскольку на данном этапе не удалось идентифицировать представителей рода *Clostridium*, скорее всего из-за плохого качества последовательностей для секвенирования некоторых из вырезанных полос, был опробован другой подход для анализа с помощью ДГГЭ.

Вторую фореграмму ДГГЭ получали с помощью вложенной ПЦР, где первый фрагмент амплифицировали с помощью пары праймеров 63F - 1387R, а вторую амплификацию проводили с помощью праймеров Com1GC - Bact907R. Всего было получено семь групп полос (рисунок 30, таблица 18), где доминирующие виды были идентифицированы, как наиболее близкие к *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Acetivibrio cellulolyticus* и *Tepidanaerobacter* sp. В отличие от первого профиля ДГГЭ, при анализе второй фореграммы общее микробное разнообразие (в соответствии с количеством полос) оказалось меньшим, кроме того, было выявлено некоторое количество неспецифических полос (например, 204 и 206, принадлежащих одному микроорганизму *Acetivibrio cellulolyticus*). Среди тестируемых субстратов только в образцах «офисная бумага» и «журнал» мы могли идентифицировать *Clostridium cellulosi* (полоса 203), который является активным целлюлозолитиком, выделяя десятки гликозидных гидролаз, принадлежащих к 15 различным семействам (Debowski et al., 2013).

В одноступенчатой ПЦР, проведенной с другой парой бактериальных праймеров Com1-GC и Bact907R с дополнительным использованием PNF-полимеразы, был проведен следующий анализ ДГГЭ, по результатам которого получили только пять четких полос (рисунок 30). Использование PNF-полимеразы позволяет получить последовательности с 98-99 % сходством (таблица 18), что позволяет избежать появления на профиле неспецифических полос. Полученные результаты подтвердили, что наибольшее бактериальное разнообразие представлено в $\Sigma 4$ МС, культивируемом на смеси бумаг. Широкие полосы в профиле образцов МС, культивируемых на офисной бумаге и журнале (303 и 305), принадлежат к роду *Clostridium*, при этом полоса, идентифицированная как *Acetivibrio cellulolyticus* (302), обнаруживалась только в сообществе $\Sigma 4$, культивируемом на картоне и журнальной бумаге. Как и во втором ДГГЭ профиле (рисунок 30), *Clostridium cellulosi* (303) был обнаружен только в $\Sigma 4$ МС, культивируемом на офисной бумаге и смеси бумаг, что демонстрирует его значимую роль на

стадии разрушения целлюлозы. Сообщество, разлагающее газету, было представлено наименьшим разнообразием полос, из которых единственная была идентифицирована как *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. На офисной бумаге наиболее четким полосам соответствовали представители *T. thermosaccharolyticum* и *Clostridium cellulosi*.

Таблица 18. Структура бактериальной и архейной компонент целлюлозолитических термофильных микробных сообществ, изученная с помощью ДГТЭ анализа и последующего секвенирования 16S рННК (по Tsavkelova et al., 2017)

ПЦР праймеры	Band ID - номер депонированный в GenBank (NCBI)	Максимальная гомология, согласно NCBI database	Гомо- логия, %	Филум
2-х этапная ПЦР: 1 этап: Univ515F Bact907R и 2 этап: Univ518F- GC и Bact907R	101 - KY780546	<i>Defluviitoga tunisiensis</i> strain AS22 16S (KT274708.1)	95	<i>Thermotogae</i>
	102 - KY780547	Uncultured bacterium clone ATB_CK_926_89 (KP151051.1)	90	н.о.
	103 - KY780548	Uncultured <i>Petrimonas</i> sp. clone B50-1 16S (KC555215.1)	95	<i>Bacteroidetes</i>
	104 - KY780549	Uncultured <i>Thermotogae</i> bacterium (CU924187.1)	88	<i>Thermotogae</i>
	105 - KY780550	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i> strain T3/55T (LN626355.1)	93	<i>Firmicutes</i>
	106 - KY780551	Uncultured bacterium clone ATB_CK_926_77 (KP151039.1)	97	н.о.
	107 - KY780552	<i>Tepidanaerobacter</i> sp. AS46 (KT274715.1)	96	<i>Firmicutes</i>
	108 - KY780553	<i>Defluviitalea</i> sp. GRX3 (LN881573.1)	92	<i>Firmicutes</i>
	109 - KY780554	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> strain HL-2 (KM036187.1)	93	<i>Firmicutes</i>
	110 - KY780555	Uncultured <i>Thermoanaerobacteraceae</i> bacterium (KJ626484.1)	91	<i>Firmicutes</i>
2-х этапная ПЦР (nested): 1 этап: 63F-1387R и 2 этап: Com1-GC и Bact907R	201 - KY780556	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (NR_074419.1)	99	<i>Firmicutes</i>
	202 - KY780557	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> strain HL-2 (KM036187.1)	98	<i>Firmicutes</i>
	203 - KY780558	[<i>Clostridium</i>] <i>cellulosi</i> , isolate DG5 (LN881577.1)	98	<i>Firmicutes</i>
	204 - KY780559	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> strain HL-2 (KM036187.1)	96	<i>Firmicutes</i>
	205 - KY780560	Uncultured bacterium clone OTU_51 (KP859675.1)	97	<i>Firmicutes</i>
	206 - KY780561	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> strain HL-2 (KM036187.1)	96	<i>Firmicutes</i>
	207 - KY780562	<i>Tepidanaerobacter</i> sp. AS46 (KT274715.1)	99	<i>Firmicutes</i>
1-этапная ПЦР: Com1-GC и Bact907R	301 - KY780563	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain Gluc4 (KT274717.1)	99	<i>Firmicutes</i>
	302 - KY780564	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> strain HL-2 (KM036187.1)	96	<i>Firmicutes</i>
	303 - KY780565	[<i>Clostridium</i>] <i>cellulosi</i> , isolate DG5 (LN881577.1)	99	<i>Firmicutes</i>
	304 - KY780566	Uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium (LN851753.1)	90	<i>Firmicutes</i>
	305 - KY780567	<i>Clostridium</i> sp. 6-16 (FJ808609)	98	<i>Firmicutes</i>
2-х этапная ПЦР: 1 этап: Univ515F- Arch915R и 2 этап: Univ518F- GC - Arch915R	401 - KY780568	<i>Methanoculleus thermophilus</i> strain V2.8 (KT368947.1)	99	<i>Methanomicrobia</i>
	402 - KY780570	Uncultured <i>Methanothermobacter</i> sp. (KU293537)	99	<i>Methanomicrobia</i>
	403 - KY780571	<i>Methanothermobacter wolfeii</i> strain JZYS 16S (EF118905.1)	99	<i>Methanomicrobia</i>
	404 - KY780572	<i>Methanosarcina thermophila</i> CHTI-55 (CP009502.1)	99	<i>Methanomicrobia</i>
2-х этапная ПЦР (nested): 1 этап: Arch338F- Arch1381R и 2 этап: Arch344F- GC - Arch915R	406 - KY780573	Uncultured <i>Methanothermobacter</i> sp. clone H20 (HQ271192.1)	99	<i>Methanobacteria</i>
	407 - KY780574	Uncultured <i>Methanothermobacter</i> sp. clone H11 (KY077238.1)	96	<i>Methanobacteria</i>
	408 - KY780575	<i>Methanosarcina thermophila</i> CHTI-55 (CP009502.1)	99	<i>Methanobacteria</i>

*н.о. - не определено

Таким образом, после проведения первого ДГГЭ-анализа в исходных образцах суммарных сообществ, мы смогли определить присутствие *Bacteroidetes*, *Thermotogae* и *Firmicutes* в составе МС; для двух других профилей ДГГЭ секвенированные последовательности относятся только к филуму *Firmicutes*. Примененные подходы по отдельности, возможно, не позволяют идентифицировать все разнообразие микробного консорциума, поэтому необходимо использовать комплексный подход для изучения бактериальных популяций с помощью ДГГЭ и использовать различные модификации этого метода для выявления достоверной картины структуры микробных сообществ.

Состав архейной компоненты МС представлен на рисунке 30 D. В основном все идентифицированные представители архей были отнесены к родам *Methanoculleus*, *Methanothermobacter* и *Methanosarcina* (таблица 18), которые являются активными продуцентами метана в термофильных сообществах. Все эти археи принадлежат к филуму *Euryarchaeota*, среди них *Methanoculleus thermophilus* и *Methanothermobacter thermautotrophicus* (порядок *Methanobacteriales*) относятся к гидрогенотрофным метаногенам, а *Methanosarcina thermophila* (порядок *Methanomicrobiales*) способна к переключению метаболизма с гидрогенотрофного на ацетокластический метаногенез.

3.3.2.3. Анализ состава доминирующих популяций бактерий и архей с помощью метода высокопроизводительного секвенирования (HTS)

Для более детального изучения состава наиболее активного МС $\Sigma 4$ (по общему объему образуемого биогаза - таблица 17), культивируемого на офисной бумаге, было проведено секвенирование с помощью системы Illumina MiSeq (посредством синтеза «sequencing by synthesis», URL: <http://www.illumina.com>).

Таблица 19. Число таксономических групп (в процентах), составляющих микробное сообщество $\Sigma 4$, на основе последовательностей генов 16S рРНК (Tsavkelova et al., 2017)

Домен; Тип; Класс; Порядок; Семейство; Род; Вид	% последовательностей в составе МС $\Sigma 4$
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; Ruminiclostridium</i>	66
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; Ruminiclostridium 1</i>	0,6
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; D8A-2 uncultured bacterium</i>	0,5
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Cellulosibacter</i>	0,4
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Eubacteriaceae; Garciella</i>	0,2
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Proteiniborus</i>	0,1
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium sensu stricto</i>	0,1
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium sensu stricto 7</i>	0,1
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; uncultured</i>	0,1
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; uncultured</i>	0,07
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; Mobilitalea</i>	6
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XI; Tepidimicrobium</i>	3
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Thermoanaerobacterales; Family III; Tepidanaerobacter</i>	3
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Thermoanaerobacterales; Family III; Thermoanaerobacterium</i>	0,2
<i>Bacteria; Firmicutes; OPB54</i>	3
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Haloplasmales; Haloplasmales; Haloplasma</i>	9
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Haloplasmales; Haloplasmales; NB1-n</i>	0,2
<i>Bacteria; Synergistetes; Synergistia; Synergistales; Synergistaceae; Anaerobaculum</i>	3
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Defluviitaleaceae; Defluviitalea</i>	2
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria</i>	0,07
<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; Methanobacteriaceae;</i>	2
<i>Methanothermobacter Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae</i>	0,08
<i>Methanosarcina</i>	

После разделения сиквенсов по качеству полученных последовательностей мы получили ~ 24 960 последовательностей для исследуемого образца, определенные с использованием оперативных таксономических единиц (ОТЕ), при этом порог сходства составил 98 %, что позволило идентифицировать все основные группы микроорганизмов. Общее количество ОТЕ составило 318, которые были кластеризованы согласно таксономическому делению от филума до рода (таблица 19, рисунок 31). Доля бактериальных доменов составила около 98 %, в то время как доля архей - лишь 2 % в соответствии с базой данных SILVA. Класс *Clostridia* составил 97 % от филума *Firmicutes*, 85 % от домена *Bacteria* и 83 % от всех последовательностей. Из них бактерии рода *Ruminiclostridium* (сем. *Clostridiales*) определялись как 66 % всех последовательностей, что подтверждает их основную роль, как гидролитиков, в бактериальных МС (Zverlov et al., 2015). В следующей группе микроорганизмов были идентифицированы представители рода *Haloplasma* (9 %), принадлежащих к филуму *Tenericutes*, уникальность этих бактерий заключается в отсутствии клеточной стенки (Skennerton et al., 2016). Так же были отмечены несколько других представителей *Clostridiales*: 6 % - *Mobilitalea*, до 3 % (каждая группа) - *Tepidimicrobium*, *Tepidanaerobacter* и *Anaerobaculum* и до 2 % - *Defluviitalea* (таблица 15, рисунок 29). В образце также присутствовала еще одна группа некультивируемых

микроорганизмов (OPB54), включенная в филум *Firmicutes* и впервые обнаруженная в горячем источнике Йеллоустонского парка (Hugenholtz et al., 1998). Археи сообщества $\Sigma 4$ представлены в основном родами *Methanothermobacter* (98 %) и *Methanosarcina* (2 %), принадлежащими к филуму *Euryarchaeota* (таблица 20).

Таблица 20. Состав и метаболические функции архейной и бактериальной компонент $\Sigma 4$ МС, культивируемого на офисной бумаге

Таксономическая принадлежность				Тип анализа	Метаболизм
Archaea	Euryarchaeota	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanothermobacter</i>	HTS, DGGE	Гидрогенотрофный метаногенез
		<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanosarcina</i>	HTS, DGGE	Ацетокластический/гидрогенотрофный метаногенез
			<i>Methanoculleus</i>	DGGE	Гидрогенотрофный метаногенез
Bacteria	Firmicutes	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminiclostridium</i>	HTS	Утилизация целлюлозы, целлобиозы и лигноцеллюлозы <i>R. thermocellum</i> .
			<i>Acetivibrio</i>	DGGE	<i>A. cellulolyticus</i> растет на целлюлозе и целлобиозе, образуя уксусную кислоту, H ₂ , CO ₂ , пропанол и бутанол.
			<i>[Clostridium] cellulosi</i>	DGGE	Целлюлолитик, растет на целлюлозе и целлобиозе; глюкозе, ксилозе, фруктозе и других источниках углерода. Основные продукты брожения - H ₂ , CO ₂ , этанол и уксусная кислота.
			<i>Cellulosibacter</i>	HTS	<i>C. alkalthermophilus</i> обладает целлюлозолитической и ксиланолитической активностями.
			<i>Garciella</i>	HTS	<i>G. nitratireducens</i> сбраживает целлобиозу и другие углеводы с образованием лактата, ацетата, бутирата, H ₂ и CO ₂ .
			<i>Proteiniborus</i>	HTS	<i>P. ethanoligenes</i> образует уксусную, пропионовую и масляную кислоты из аминокислот.
			<i>Clostridium sensu stricto</i> (rRNA cluster I)	HTS	Целлюлолитик
			<i>Clostridium sensu stricto 7</i>	HTS	Целлюлолитик
			<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>	DGGE	Растет на целлюлозе, целлобиозе и глюкозе с образованием ацетата, этанола, пропионовой кислоты, в качестве основных метаболитов.
			<i>Tepidimicrobium</i>	HTS	Органотрофный рост на ряде белковых субстратов. Способны к утилизации углеводов (<i>T. xylanilyticum</i>) и не способны (<i>T. ferriphilum</i>). Ацетогенез.
			<i>Tepidanaerobacter</i>	HTS, DGGE	Синтрофный рост и деструкция спиртов, бутирата и лактата <i>T. syntrophicus</i> JLT, и окисление ацетата <i>T. acetatoxydans</i> Re1.
			<i>Thermoanaerobacterium</i>	HTS, DGGE	Гидролизует целлобиозу/ксилозу с образованием этанола и лактата <i>T. thermohydrosulfuricus</i> WC1. <i>T. thermosaccharolyticum</i> KCU-ED1 образует водород, уксусную, масляную и молочную кислоты.
			<i>Peptococcaceae, uncultured</i>	HTS	<i>Peptococcaceae</i> может ассимилировать CO ₂ . Синтроф.
			<i>Defluviitalea</i>	HTS, DGGE	<i>D. tunisiensis</i> трансформирует лактат, сукцинат и аминокислоты в ацетат. <i>D. phaphyphila</i> Alg1 растет на маннитоле, глюкозе и альгинатах с образованием этанола. <i>D. saccharophila</i> может использовать в качестве доноров электронов целлобиозу, глюкозу, маннозу, мальтозу, маннитол, сахарозу и ксилозу. Основными продуктами метаболизма являются ацетат, формиат, бутират и изобутират.
	Tenericutes	<i>Mollicutes</i>	<i>Haloplasma</i>	HTS	Микроорганизм <i>H. contractile</i> выделен из анаэробной зоны высокосолевого озера, строгий органотроф.

Продолжение таблицы 20.

Таксономическая принадлежность				Тип анализа	Метаболизм
Bacteria	Synergistetes	Synergistia	Anaerobaculum	HTS	<i>A. thermoterrenum</i> сбраживает органические кислоты и небольшой круг углеводов до ацетата, H ₂ и CO ₂ .
	Thermotogae	Thermotogae	Defluviitoga	DGGE	<i>D. tunisiensis</i> может расти на целлобиозе, ксилане и ксилозе с образованием этанола, ацетата, H ₂ и CO ₂ .
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Petrimonas	DGGE	Бродильщики, при росте на глюкозе образуют ацетат, H ₂ и CO ₂ .

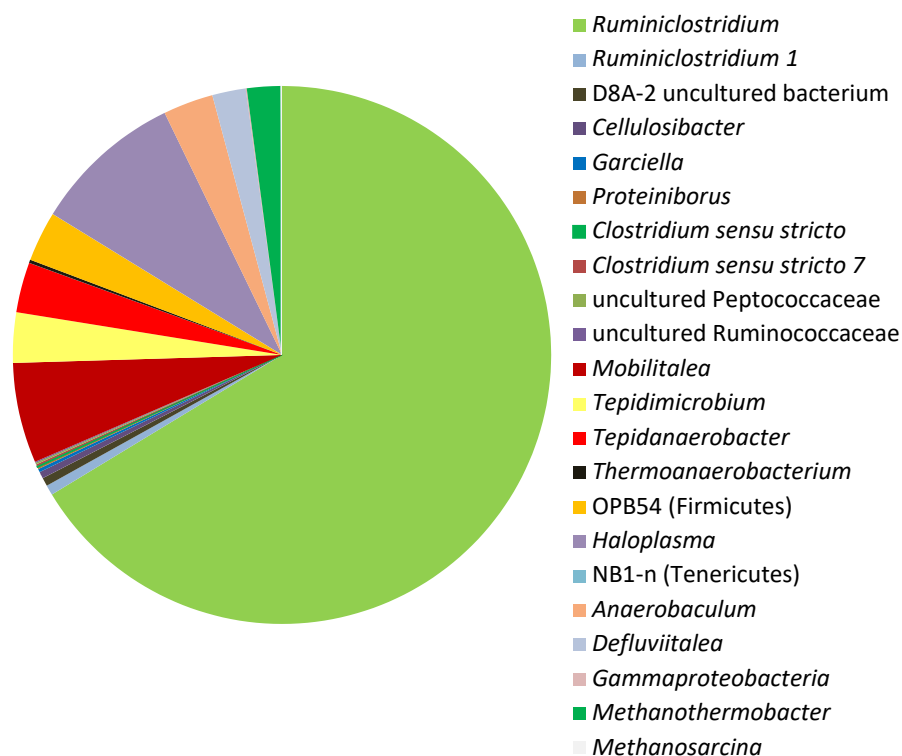


Рисунок 31. Распределение различных таксономических групп прокариот в составе микробного сообщества Σ4, построенное на основании распределения ОТЕ, секвенированных с помощью системы Illumina MiSeq

3.3.2.4. Сравнение ДГГЭ и метода HTS при анализе состава доминирующих популяций бактерий и архей микробного сообщества Σ4

Краткая характеристика метаболической активности микроорганизмов МС Σ4 приведена в таблице 20. Активное анаэробное МС состоит из ряда микроорганизмов (бактерий и архей), выполняющих различные трофические функции и осуществляющие эффективную

биотрансформацию сложных органических субстратов в биогаз с помощью определенных метаболических реакций (Tsapekos et al., 2017; Robles et al., 2018). Нами было показано доминирование двух функциональных групп микроорганизмов, целлюлолитических гидролитиков и ацетогенных бактерий, которые в основном принадлежали к филуму *Firmicutes*, в составе исследуемого МС $\Sigma 4$ с помощью ДГГЭ и HTS-анализа. Причем, помимо известных представителей *Ruminiclostridium*, *Acetivibrio*, *Herbinix*, *Defluviitalea* или *Cellulosibacter* (Maus et al., 2016) также были обнаружены до сих пор недостаточно охарактеризованные виды *Proteiniborus* или *Haloplasma*. Недавнее исследование метагенома и метатранскриптома термофильного МС, продуцирующего биогаз при культивировании на смеси из кукурузного силоса, ячменя, навоза КРС и свиного навоза подтвердило, что представители родов *Defluviitoga*, *Halocella*, *Clostridium sensu stricto*, *Clostridium* cluster III и *Tepidimicrobium* были доминирующими в составе сообщества. Однако только 18-25 % последовательностей удалось классифицировать на уровне рода, что указывает на наличие большого числа некультивируемых и неизвестных в настоящее время микроорганизмов (Maus et al., 2016).

С помощью ДГГЭ удалось показать наличие гидролитических микроорганизмов в МС, выращенных на офисной бумаге и смеси бумаг (рисунок 30). Это подтверждает, что решающую роль в процессе адгезии на субстрате и его деструкции играют целлюлолитические бактерии класса *Clostridia*. Известно, что эти анаэробные микроорганизмы производят большое количество ферментов для деструкции целлюлозы, которые образуют мультиферментный комплекс - целлюлосомы (см. Главу 1.1). Гипертермофилы рода *Thermotoga*, также идентифицированные в исследуемом МС, производят высоко термостабильные целлюлазы (Lynd et al., 2002). В дополнение к целлюлазам, многофункциональные комплексы *Clostridium* (*Ruminiclostridium*) *thermocellum* содержат также маннаназы, ксиланазы, хитиназы и лихеназы (Shwarz, 2001). Помимо целлюлосом, анаэробные целлюлолитики могут также выделять активные экзоферменты, так в исследовании Коек с соавторами (2014) изучали последовательности геномов и показали, что в отличие от *R. thermocellum* BC1 другой вид, способный расти на целлюлозе и целлодекстрине, *R. cellulosi* DG5, не содержит генов, кодирующих целлюлосомы. Недавно описанный целлюлозолитический штамм *Herbinix hemicellulosilytica* T3 / 55T, целлюлолитический комплекс которого состоит из эндоглюконазы и двух целлюбиогидролаз (Koeck et al., 2015), был идентифицирован в сиквенсе из полосы 105 (рисунок 30) в $\Sigma 4$ МС, культивируемых на гофрированном картоне и бумажной смеси, но не на офисной бумаге.

Еще одна из наиболее ярких полос, обнаруженная во всех исследуемых фореграммах ДГГЭ для всех МС, согласно базе NCBI, соответствует *Acetivibrio cellulolyticus* strain HL-2. Однако *A. cellulolyticus* является мезофильным микроорганизмом с оптимумом температур для роста между

35 и 37 °C (Patel et al., 1980) и, поэтому, не может быть одной из доминирующих популяций в составе термофильных МС. Когда этот штамм HL-2 (band ID KM036187) проверили с помощью рибосомальной базы данных SILVA (URL: <https://www.arb-silva.de>), то получили, что последовательность была классифицирована, как относящаяся к семейству *Ruminococcaceae*, род *Ruminiclostridium*, который является доминантным в составе Σ4 МС согласно анализу HTS. Сравнительный анализ между этими двумя базами данных в совокупности с физиологическими характеристиками *A. cellulolyticus* (оптимальная температура роста), а также тот факт, что согласно последним изменениям в таксономии *Clostridium* cluster III, включая термофильные штаммы *C. thermocellum* и *C. cellulolyticum* отнесли к роду *Ruminiclostridium* (Yutin and Galperin, 2013), позволяет заключить, что идентифицированный с помощью ДГГЭ *A. cellulolyticus* (KM036187), скорее всего, относится к роду *Ruminiclostridium*.

Среди других доминирующих групп микроорганизмов, идентифицированных с помощью ДГГЭ, выполненных с помощью двух систем праймеров (Bact907R - Univ515F; Univ518F-GC-Bact907R и 63F-1387R; Com1GC - Bact907R, соответственно) были *Thermoanaerobacterium* и *Tepidanaerobacter*, которые также были обнаружены с помощью HTS, только 3 % и 0,2 % от всех бактерий соответственно (таблица 19). Анализ ДГГЭ (с праймерами Bact907R-Univ515F и Univ518F-GC-Bact907R) позволил также идентифицировать микроорганизмы *DeFluviitoga tunisiensis* шт. AS22, *Herbinix hemicellulosilytica* T3 / 55T, некультивируемые *Petrimonas* sp. и *Thermotogae*, ни один из которых не был идентифицирован с помощью HTS согласно базе данных SILVA (до момента публикации полученных данных в статье Tsavkelova et al., 2017). В составе исследуемого термофильного МС были идентифицированы бактерии семейства *Mobilitalea* (6 % от общего числа) с помощью HTS, при этом вид *Mobilitalea sibirica*, описан Подосокорской с соавторами (2014) как мезофильный строго анаэробный микроорганизм, растущий в пределах 25 °C и 47 °C. Температура культивирования МС составляла 55 °C, что является оптимумом для роста *Herbinix hemicellulosilytica* шт. T3 / 55T, который был выделен из термофильной биогазовой установки и является согласно таксономии ближайшим к *Mobilitalea sibirica* (Koeck et al., 2015). В базе данных SILVA последовательность рибосомальной РНК *H. hemicellulosilytica* T3 / 55T зарегистрирована как для малой (SSU), так и для большой (LSU) субъединиц. Полученная последовательность по базе данных SILVA для LSU определялась как относящаяся к роду *Herbinix* (*Lachnospiraceae*), по базе данных SSU - как *Mobilitalea* (*Lachnospiraceae*). Последовательность РНК *Mobilitalea sibirica* отсутствует в базе данных LSU и присутствует в SSU, определяется как род *Mobilitalea* (*Lachnospiraceae*). Таким образом, такие расхождения в идентификации штаммов с помощью различных баз данных затрудняют определение состава МС через метагеномный анализ, учитывая непрерывную переклассификацию ранее описанных видов.

В МС продукты гидролиза лигноцеллюлозы, такие как растворимые сахара, спирты и органические кислоты (короткоцепочечные летучие жирные кислоты) метаболизируются в уксусную кислоту, молекулярный водород и углекислый газ (Blumer-Shuette et al., 2013). Наиболее быстрое и эффективное использование водорода и биоконверсия в анаэробном термофильном сообществе происходит во время гидрогенотрофного метаногенеза, при котором происходит полное удаление свободного водорода из газовой фазы, что способствует окислению ацетата синтрофными микроорганизмами (Ho et al., 2014). Согласно данным, полученным с помощью HTS, большинство архей в исследуемом МС представлены гидрогенотрофными штаммами *Methanothermobacter* (96 %) и только 4 % - *Methanosarcina*, который может переключаться с гидрогенотрофного на ацетокластический путь образования метана. Несмотря на то, что нитевидные клетки, схожие по своей морфологии с *Methanosaeta*, были обнаружены с помощью световой микроскопии (рисунок 28), этот микроорганизм не обнаружен в наших МС методами метагеномики.

При сравнении результатов по анализу архей в МС с помощью ДГГЭ и HTS, штаммы *Methanothermobacter* и *Methanosarcina* были идентифицированы только на фореграмме, полученной с использованием пар праймеров Arch338F-Arch1381R и Arch344F-GC-Arch915R, а при использовании Univ515F -Arch915R удалось выявить (согласно базе данных NCBI) еще одного представителя гидрогенотрофных метаногенов *Methanoculleus thermophilus*. Преобладание в составе МС гидрогенотрофных метаногенов над ацетокластическими при культивировании в экстремально термофильных условиях (70 °C) было также продемонстрировано Zhang с соавторами (2014) с присутствием в основном (98 % от *Archaea*) *Methanothermobacter thermautotrophicus* и *Methanobacterium thermoaggregans*. Хотя реакции окисления ацетата являются энергетически не эффективными по сравнению с ацетокластическим способом его деградации, было продемонстрировано, что во время биоконверсии органических отходов в метан ацетат окисляется именно за счет синтрофии между ацетат-окисляющими бактериями (SAOB) и метаногенами (Hattori, 2008). SAOB, как известно, используют H₂/CO₂ для получения ацетата, а также наоборот могут его обратимо утилизировать (Hattori, 2008). В статье Goberna et al. (2009) показали, что в термофильном (50-55 °C) анаэробном проточном реакторе при трансформации муниципальных отходов в засоленных условиях *Clostridia* (> 92 %) преобладают среди бактерий, а *Metanoculleus* (> 90 %) - среди архей. Такая распространенность *Methanoculleus* по сравнению с другими гидрогенотрофными метаногенами, включая *Methanothermobacter thermautotrophicus*, идентифицированного в образцах из ректора, может быть связана с его толерантностью к высоким концентрациям соли. А отсутствие ацетокластических метаногенов (*Methanosarcina* и *Methanosaeta*) подтверждает, что в данных

условиях синтрофное окисление ацетата является необходимым условием для метаногенеза (Goberna et al., 2009).

Недавно были описаны ассоциации SAOB с гидрогенотрофными метаногенами: бактерии, относящиеся к родам *Thermotoga*, *Tepidanaerobacter*, *Thermoacetogenium*, *Syntrophaceticus* и *Acetobacterium* с археями *Methanoculleus* sp. и/или *Methanothermobacter* (Hattori, 2008; Maus et al., 2016). Анализ полученных последовательностей гена 16S рРНК позволяет заключить, что микроорганизмы, идентифицированные как *Tepidanaerobacter* и *Thermotoga* являются синтрофными SAOB (таблица 15). Они также были обнаружены в качестве основных групп во время ДГГЭ анализа (полосы 107 и 104, рисунок 30). Обе полосы были обнаружены на фореграммах МС, которые культивировали на офисной бумаге, смеси бумаг и гофрированном картоне, тогда как их почти не наблюдали на газетной и журнальной бумагах. Несмотря на присутствие целлюлолитических бактерий, *Defluviitoga tunisiensis* и «*Acetivibrio cellulolyticus*» (полосы 101 и 109 соответственно), отсутствие такой важной группы SAOB делает биоконверсию газетной и журнальной бумаг в биогаз затрудненной (таблица 20). Напротив, МС, растущие на легко деградируемых субстратах (офисной бумаге и картоне), характеризуется наличием всех необходимых микробных групп, которые способны к эффективной биотрансформации субстратов в биогаз.

3.4. Использование микробных сообществ и чистых культур целлюлозолитических бактерий для получения биобутанола

Микробные консорциумы вызывают интерес исследователей при изучении процессов биоконверсии органических субстратов в биотопливо, поскольку по сравнению с монокультурами, использование МС позволяет утилизировать более широкий спектр субстратов и получать большее разнообразие метаболитических продуктов, а кроме того, МС оказываются более устойчивыми и сохраняют функциональную активность при длительном культивировании (Цавкелова и Нетрусов, 2012; Liu et al., 2018). Результаты исследования потенциальной возможности использования целлюлозоразлагающих микробных консорциумов для получения бутанола представлены на рисунках 32 и 33.

Полностью деградация фильтровальной бумаги термофильными сообществами $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$, а также микробным сообществом, выделенным из навоза КРС, происходила в течение 10-15 суток при 55 °С. Увеличение времени деградации субстрата по сравнению с экспериментами по образованию микробными сообществами биогаза из ЦСС, вероятнее всего, связано с предварительной термической обработкой инокулята («heat-shock»), необходимого для элиминации метаногенных архей, что приводит к изменению состава микроорганизмов внутри

консорциума и, следовательно, их активности (Grimalt-Alemany et al., 2018). Максимальное количество редуцирующих сахаров, детектируемое в культуральной жидкости в течение всего процесса гидролиза субстрата, однако, не превышало 0,1 г/л при разложении 15 г/л ФБ (фильтровальной бумаги) и 0,3 г/л при разложении 20 г/л ФБ. Увеличение количества субстрата до 20 г/л ФБ не привело к дальнейшему повышению содержания сахаров в культуральной жидкости и ускорению биоконверсии субстрата. Низкое содержание углеводов в среде объясняется их потреблением собственно микробным сообществом. Схожие результаты были получены другими авторами для микробного сообщества, выделенного из компостного материала и смеси навоза (куриный, свиной, КРС) при деструкции рисовой соломы: за 4-о суток гидролиз субстрата составил 60 %, а за 9 суток культивирования максимальное количество образуемой глюкозы составило менее 10 мг/л (0,01 г/л; Haruta et al., 2002). Тем не менее, при последующем добавлении культуры *C. acetobutylicum* было отмечено образование АБЭ продуктов даже при низком исходном содержании углеводов в среде уже через 24 ч культивирования, при этом максимальные значения концентраций этих соединений были достигнуты на 10-11 сутки культивирования (рисунок 32).

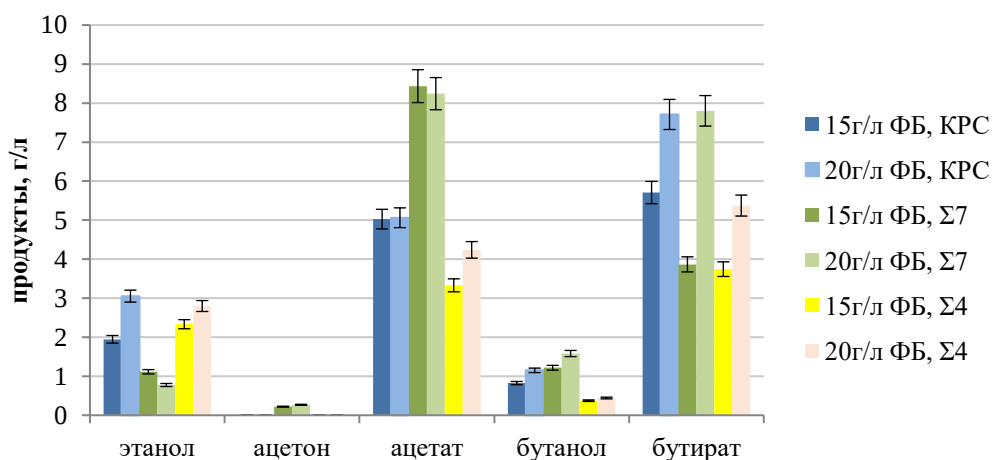


Рисунок 32. Образование продуктов АБЭ-брожения: ацетона, бутанола, этанола, а также бутирата и ацетата смешанными культурами микробных сообществ (Σ4, Σ7, МС, выделанное из навоза КРС) и *C. acetobutylicum*. В качестве субстрата использовали фильтровальную бумагу в количестве 15 и 20 г/л. Представлены максимальные значения, достигнутые на 12 сутки культивирования (результаты представлены средним арифметическим из трех повторностей $\pm$ SD)

Обозначения: ФБ - фильтровальная бумага, КРС - сообщество, выделенное из навоза крупного рогатого скота.

Максимальная концентрация образованного бутанола наблюдалась при разложении 20 г/л ФБ сообществом Σ7 и составила 1,6 г/л. Суммарно, образование АБЭ продуктов составило 2,5 г/л и 2,6 г/л в микробном сообществе Σ7; 2,7 г/л и 3,2 г/л в МС Σ4 и 2,8 г/л и 4,3 г/л в МС, выделенном из навоза КРС при разложении 15 и 20 г/л целлюлозы, соответственно.

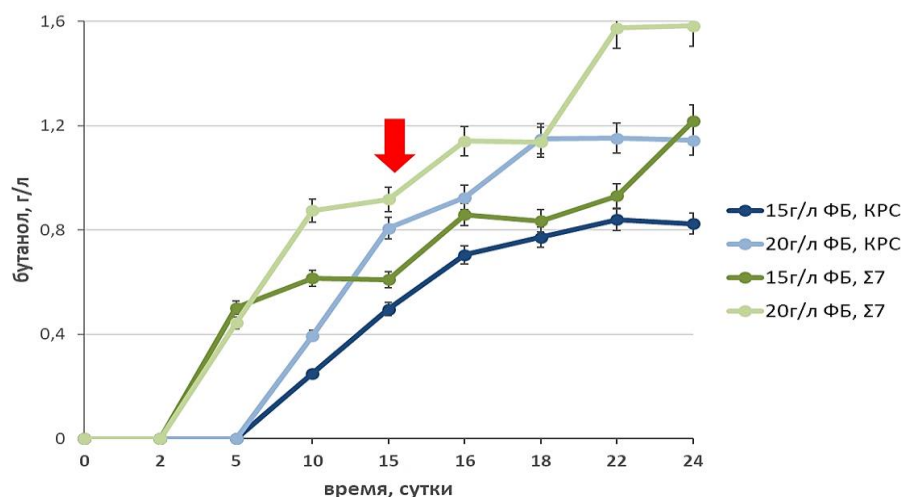


Рисунок 33. Динамика образования бутанола смешанными культурами микробных сообществ (Σ7 и КРС, выделенное из навоза КРС) и *C. acetobutylicum*. В качестве субстрата использовали фильтровальную бумагу в количестве 15 и 20 г/л

Обозначения: ФБ - фильтровальная бумага, КРС - сообщество, выделенное из навоза крупного рогатого скота. Стрелкой обозначен момент (15 суток) инокуляции *C. acetobutylicum*.

В сообществах КРС и Σ7 образование бутанола начиналось до инокуляции культурой *C. acetobutylicum* (рисунок 33), что подтверждает данные профилирования этих микробных сообществ (см. Глава 3.3.2) о наличии в их составе микроорганизмов порядка *Clostridiales*, способных к сбраживанию целлюлозы до ацетата, лактата, масляной кислоты и бутанола как, например, показано для некоторых штаммов *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Cibis et al., 2016; Li et al., 2018).

Известно, что внесение масляной кислоты сдвигает метаболизм *C. acetobutylicum* в сторону образования нейтральных продуктов при поддержании pH среды ниже 5 (Bahl et al., 1982). С другой стороны, когда глюкоза используется как единственный источник углерода и отсутствует контроль за pH среды, бутират может не реассимилироваться, в результате чего образуются очень небольшие количества растворителей, что связано с быстрым накоплением кислых продуктов в среде (Maddox et al., 2000). Такое явление называют «кислотным коллапсом» (acid crush). В условиях нашего эксперимента не было исходно высокого содержания глюкозы (углеводов) в среде, которое могло бы послужить причиной кислотного коллапса. Однако, некоторые авторы (Wang et al., 2011) указывают на решающую роль в подобном «кислотном коллапсе» не столько ацетата или бутирата, а совсем другого метаболита - муравьиной кислоты. Даже при низких количествах формиат является триггером этого ингибиторного эффекта, накапливаясь в клетках внутриклеточно, и вызывая окислительный стресс за счёт образования активных форм кислорода внутри клеток (Du et al., 2008). Использование рекомбинантных штаммов *C. acetobutylicum* DSM 1731 с активной формиатдегидрогеназой показали, что эти штаммы не накапливали формиат

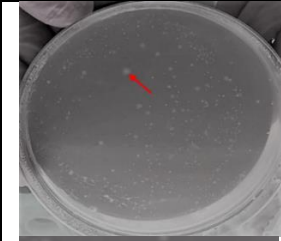
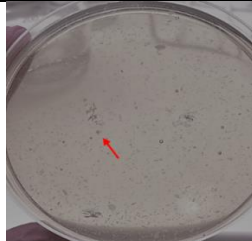
внутриклеточно и могли конвертировать образующиеся ацетат и бутират в АБЭ-продукты (Wang et al., 2011).

Учитывая, что анаэробные микробные консорциумы содержат большое разнообразие микроорганизмов, образующих различные органические кислоты и продукты, в том числе формиат, использование микробных сообществ на начальных этапах биоразложения целлюлозосодержащих субстратов для последующей биоконверсии образующихся углеводов в АБЭ продукты не представляется целесообразным. Однако такие микробные консорциумы можно рассматривать как источник для выделения чистых культур активных целлюлозолитических микроорганизмов для создания эффективных бинарных культур.

3.4.1. Выделение и идентификация чистых культур анаэробных целлюлозолитических бактерий

При выделении изолятов активных целлюлозолитиков из микробных сообществ ($\Sigma 4$ и $\Sigma 7$) на твердых агаризованных средах было получено 150 отдельных колоний. Однако при их пересевах к третьему пассажу у большинства культур способность к деструкции целлюлозы пропадала. Известно, что даже визуально различимые единичные колонии анаэробных целлюлозолитиков могут представлять собой не чистую культуру, а быть микроконсорциумом из 2-5 «колоний-спутников» (Sizova et al., 2011). Для дальнейшей работы были выбраны четыре изолята, которые после пассирования в течение не менее трёх пассажей и микрокопирования оставались однородными и активными в отношении деградации целлюлозы. Им были присвоены названия И1, И2, И3 и И4. В таблице 21 приведены данные, описывающие характеристики этих изолятов.

Таблица 21. Характеристика изолятов целлюлозоразлагающих анаэробных бактерий, выделенных из микробных сообществ

Номер изолята	И1	И2	И3	И4
Исходное МС	Σ4	Σ7	Σ7	Σ4
Рост на агаризованной среде СМ3 с микрокристаллической целлюлозой (МКЦ)	 	 	 	 
Рост в жидкой среде, после 5 пассажей на фильтровальной бумаге (ФБ)				
Время деструкции ФБ, 5 г/л	4 суток	7 суток	10 суток	7 суток
Окрашенный пигмент	-	+	-	+

При дальнейшем пассировании изолятов в жидкой среде в течение 5 пассажей, они сохранили способность к деструкции целлюлозы, однако, их активность различалась. Так, наиболее быструю деструкцию (в течение 4-х суток) наблюдали для И1, а наиболее медленную (в течение 10 суток) - для И3. При этом изоляты И1 (в меньшей степени), И2 и И4 в процессе роста и деградации субстрата образовывали желтый пигмент. Согласно литературным данным, это водонерастворимое соединение, названное «желтым афинным веществом» (от англ. yellow affinity substance, YAS), синтезируют целлюлозолитические штаммы *Clostridium thermocellum*, а также некоторые другие анаэробные целлюлозолитики, например, *Ruminococcus flavefaciens* (Коресну and Нодрова, 1997) при росте на целлюлозосодержащих субстратах. Природа этого соединения до сих пор не установлена, но считается, что это каротиноидоподобное соединение, которое легко обесцвечивается при контакте с кислородом, а его роль заключается в адгезии целлюлосомы к целлюлозе, повышая её аффинность к субстрату, а также оно выступает медиатором присутствия целлюлозы в среде (Ljungdahl et al., 1983; Коресну and Нодрова, 1997). Таким образом, наличие этого пигментированного соединения также опосредованно свидетельствует о выделении культуры анаэробных целлюлозолитиков.

На следующем этапе работы было проведено секвенирование участка гена 16S рРНК (1534 п.о.) для каждого из четырех изолятов с использованием пары универсальных праймеров EUB1 и EUB2. Для И1, И2 и И3 полученные с помощью прямого и обратного праймеров последовательности были собраны в контиги длиной около 1300-1400 п.о., для И4 не удалось получить перекрывающиеся фрагменты, поэтому из дальнейшего анализа он был исключен. Полученные данные представлены в таблице 22.

Таблица 22. Результаты секвенирования последовательностей, полученных для изолятов целлюлозолитических бактерий

№ изолята	Исходное микробное сообщество	Максимальная гомология по данным базы NCBI	% гомологии
Изолят 1	Σ4	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (CP003066.1)	97,63
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> M0795 (CP003066.1)	97,63
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain TG57 (CP016893.1)	97,55
Изолят 2	Σ7	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> M0795 (CP003066.1)	99,48
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (CP003066.1)	99,48
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain TG57 (CP016893.1)	99,41
Изолят 3	Σ7	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> M0795 (CP003066.1)	100
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (CP003066.1)	100
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain TG57 (CP016893.1)	99,84
Изолят 4 (последовательность получена с праймера EUB2)	Σ4	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> M0795 (CP003066.1)	99,33
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (CP003066.1)	99,33
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain TG57 (CP016893.1)	99,19

Обозначения: для изолятов 1-3 приведены данные, полученные с пары праймеров (EUB1 и EUB2), для изолята 4 - с использованием одного праймера (EUB2). Согласно данным базы NCBI, полный геном известен для трёх штаммов *T. thermosaccharolyticum*: **M0795**, **DSM 571** и **TG57**, отличающихся по некоторым характеристикам и метаболизму.

Все выделенные изоляты показали наибольшее сходство с видом *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Типовым штаммом этого вида является *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* **DSM 571** (De Vos et al., 2009). При полногеномном секвенировании данного штамма у него не было обнаружено наличия функционального гена β-глюкозидазы, необходимой для деструкции целлюлозы. Соответственно, рост на целлюлозе в качестве единственного субстрата штамма *T. thermosaccharolyticum* **DSM 571** невозможен, из-за отсутствия основного фермента, разлагающего целлюлозу (Pei et al., 2012). При этом

представители *T. thermosaccharolyticum* часто являются спутниками для другой культуры - *Clostridium thermocellum*. При росте на целлюлозосодержащих субстратах *C. thermocellum* прикрепляется к волокнам целлюлозы, а *T. thermosaccharolyticum* находится в виде планктонной культуры, используя гексозы, образуемые *C. thermocellum* при гидролизе целлюлозы (Argyros et al., 2011; He et al., 2011).

Однако помимо типового штамма, к настоящему моменту описано несколько других штаммов этого вида, способных к деструкции целлюлозы, например, *T. thermosaccharolyticum* M5 (Jiang et al., 2017), *T. thermosaccharolyticum* M0795 (Shaw et al., 2010), *T. thermosaccharolyticum* TG57 (Li et al., 2018), причём последний используется для получения бутанола. Согласно полученным нами результатам (таблица 22) изоляты И2 и И3 имеют более 99 % сходства именно со штаммами *T. thermosaccharolyticum* TG57 и *T. thermosaccharolyticum* M0795. Причем штамм *T. thermosaccharolyticum* M0795 предоставлен Shaw с соавторами компанией «Mascoma corporation» и широко не используется, его геном полностью отсеквенирован и подтверждено наличие гена β -глюкозидазы (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). *T. thermosaccharolyticum* TG57 был выделен из целлюлозолитического консорциума, способного к продукции бутанола, и имеет сходство 99 % (но не 100 %) с типовым штаммом *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 (Li et al., 2018): при культивировании на среде с 3 %-ной микрокристаллической целлюлозой он образует 1,93 г/л бутанола.

Для анализа филогенетического сходства выделенных изолятов с уже известными штаммами было выполнено множественное локальное выравнивание с помощью программного обеспечения BLAST и UGENE. В качестве референсных штаммов были выбраны полногеномные последовательности *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* штаммов DSM 571, TG57, M095. Подобное выравнивание позволяет сопоставить последовательности на основании сходства между ними, анализируя их со стороны структурного и эволюционного родства (Durbin et al., 1998). Результаты выравнивания представлены на рисунке 34.

[illegible]

T.t. M0795

T.t. M0795

T.t. DSM 571

T.t. DSM 571

T.t. TG 57

T.t. TG 57

H1

H2

H3

425430435440445450455460465470475480

TGTGAAAAACCTGGGCTCAACCGAGGGTATGCATCTGAAACTATATAGCTTGAGTCAAG

TGTGAAAAACCTGGGCTCAACCGAGGGTATGCATCTGAAACTAAATAGCTTGAGTCAAG

TGTGAAAAACCTGGGCTCAACCGAGGGTATGCATCTGAAACTAAATAGCTTGAGTCAAG

TGTGAAAAACCTGGGCTCAACCGAGGGTATGCATCTGAAACTAAATAGCTTGAGTCAAG

TGTGAAAAACCTGGGCTCAACCGAGGGTATGCATCTGAAACTAAATAGCTTGAGTCAAG

TGTGAAAAACCTGGGCTCAACCGAGGGTATGCATCTGAAACTAAATAGCTTGAGTCAAG

TGTGAAAAACCTGGGCTCAACCGAGGGTATGCATCTGAAACTAAATAGCTTGAGTCAAG

TGTGAAAAACCTGGGCTCAACCGAGGGTATGCATCTGAAACTAAATAGCTTGAGTCAAG

TGTGAAAAACCTGGGCTCAACCGAGGGTATGCATCTGAAACTAAATAGCTTGAGTCAAG

485490495500505510515520525530535540

AGAGGAGAGCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAATACCA

AGAGGAGAGCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAATACCA

AGAGGAGAGCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAATACCA

AGAGGAGAGCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAATACCA

AGAGGAGAGCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAATACCA

AGAGGAGAGCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAATACCA

AGAGGAGAGCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAATACCA

AGAGGAGAGCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAATACCA

AGAGGAGAGCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAATACCA

545550555560565570575580585590595600

TGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGACTTGAACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA

TGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGACTTGAACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA

TGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGACTTGAACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA

TGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGACTTGAACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA

TGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGACTTGAACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA

TGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGACTTGAACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA

TGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGACTTGAACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA

TGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGACTTGAACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA

TGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGACTTGAACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA

605610615620625630635640645650655660

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-AAACGATGGATACTAGGTGTGGGTTAGT

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-AAACGATGGATACTAGGTGTGGGTTAGT

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-AAACGATGGATACTAGGTGTGGGTTAGT

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-AAACGATGGATACTAGGTGTGGGTTAGT

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-AAACGATGGATACTAGGTGTGGGTTAGT

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-AAACGATGGATACTAGGTGTGGGTTAGT

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-AAACGATGGATACTAGGTGTGGGTTAGT

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-AAACGATGGATACTAGGTGTGGGTTAGT

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-AAACGATGGATACTAGGTGTGGGTTAGT

665670675680685690695700705710715720

ATAATCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT

ATAATCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT

ATAATCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT

ATAATCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT

ATAATCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT

ATAATCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT

ATAATCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT

ATAATCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT

ATAATCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT

725730735740745750755760765770775780

GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGT-GGTTTAATTCTGA

GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGT-GGTTTAATTCTGA

GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGT-GGTTTAATTCTGA

GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGT-GGTTTAATTCTGA

GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGT-GGTTTAATTCTGA

GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGT-GGTTTAATTCTGA

GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGT-GGTTTAATTCTGA

GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGT-GGTTTAATTCTGA

GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGT-GGTTTAATTCTGA

785790795800805810815820825830835840

AGCAACGCGAAG-AACCTTACCAGGG--CTTGACAT-CCACAGAATCGA-GTAGAAATA-

AGCAACGCGAAG-AACCTTACCAGGG--CTTGACAT-CCACAGAATCGA-GTAGAAATA-

AGCAACGCGAAG-AACCTTACCAGGG--CTTGACAT-CCACAGAATCGA-GTAGAAATA-

AGCAACGCGAAG-AACCTTACCAGGG--CTTGACAT-CCACAGAATCGA-GTAGAAATA-

AGCAACGCGAAG-AACCTTACCAGGG--CTTGACAT-CCACAGAATCGA-GTAGAAATA-

AGCAACGCGAAG-AACCTTACCAGGG--CTTGACAT-CCACAGAATCGA-GTAGAAATA-

AGCAACGCGAAG-AACCTTACCAGGG--CTTGACAT-CCACAGAATCGA-GTAGAAATA-

AGCAACGCGAAG-AACCTTACCAGGG--CTTGACAT-CCACAGAATCGA-GTAGAAATA-

AGCAACGCGAAG-AACCTTACCAGGG--CTTGACAT-CCACAGAATCGA-GTAGAAATA-

The figure displays genomic alignment tracks for the M0795 strain across various regions of the genome. The tracks are organized into four main sections, each with a header indicating the genomic region (e.g., 845-900, 905-960, 965-1020, 1025-1080). The tracks show sequence alignment for T.t. M0795, T.t. DSM 571, and T.t. TG 57, along with reference sequences M1, M2, and M3. The tracks are color-coded: red for high similarity, green for moderate, and yellow for low.

Section 1: 845-900

T.t. M0795
T.t. M0795
T.t. DSM 571
T.t. DSM 571
T.t. TG 57
T.t. TG 57
M1
M2
M3

Section 2: 905-960

T.t. M0795
T.t. M0795
T.t. DSM 571
T.t. DSM 571
T.t. TG 57
T.t. TG 57
M1
M2
M3

Section 3: 965-1020

T.t. M0795
T.t. M0795
T.t. DSM 571
T.t. DSM 571
T.t. TG 57
T.t. TG 57
M1
M2
M3

Section 4: 1025-1080

T.t. M0795
T.t. M0795
T.t. DSM 571
T.t. DSM 571
T.t. TG 57
T.t. TG 57
M1
M2
M3



Рисунок 34. Множественное выравнивание частичных последовательностей нуклеотидов по 16S рРНК, построенное с помощью программы UGENE на основании трёх биологических повторностей (выделение ДНК проводили каждый раз из заново полученной биомассы изолята) для каждого изолята

Обозначения: **И1** - контиг, полученный для изолята 1; **И2** - контиг, полученный для изолята 2; **И3** - контиг, полученный для изолята 3; **T.t. M0795** - сиквенс *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* M0795 (координаты выравнивания в записи генома CP003066.1: 65929-67217 и 404181-405468); **T.t. DSM 571** - сиквенс *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571 (координаты выравнивания в записи генома CP002171.1: 79371-80659 и 449057-450344); **T.t. TG 57** - сиквенс *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* TG57 (координаты выравнивания в записи генома CP016893.1: 2602124-2603411 и 1245483-1246951).

В каждом из референсных геномов при сравнении с каждым контигом по отдельности были выявлены от 4 до 6 гомологичных участков 16S рРНК, среди них были отобраны по 2 участка, доля совпадающих нуклеотидов для которых составила более 97 % (“Identity”), а значения E-value - ниже 0,01 (согласно BLAST). Согласно анализу полученного выравнивания, между собой последовательности изолятов отличаются на: И1 от И2 - 72 нуклеотида (5 %), И1 от И3 - 48 нуклеотидов (4 %), И2 от И3 - 24 нуклеотида (2 %) (рассчитано в программе UGENE по расстоянию Хэмминга). Различия между последовательностями трех изолятов и референсными штаммами представлены в таблице 23 (рассчитано по расстоянию Хэмминга).

Таблица 23. Матрица различий между исследуемыми и референсными последовательностями, полученная при множественном выравнивании

	1. <i>T.t.</i> M0795	2. <i>T.t.</i> M0795	3. <i>T.t.</i> DSM 571	4. <i>T.t.</i> DSM 571	5. <i>T.t.</i> TG 57	6. <i>T.t.</i> TG 57
И1	68	64	68	67	66	65
И2	12	8	10	9	8	9
И3	22	18	22	19	20	19

* значения представляют количество различающихся нуклеотидов, включая гэпы; разница составляет не более 5 %

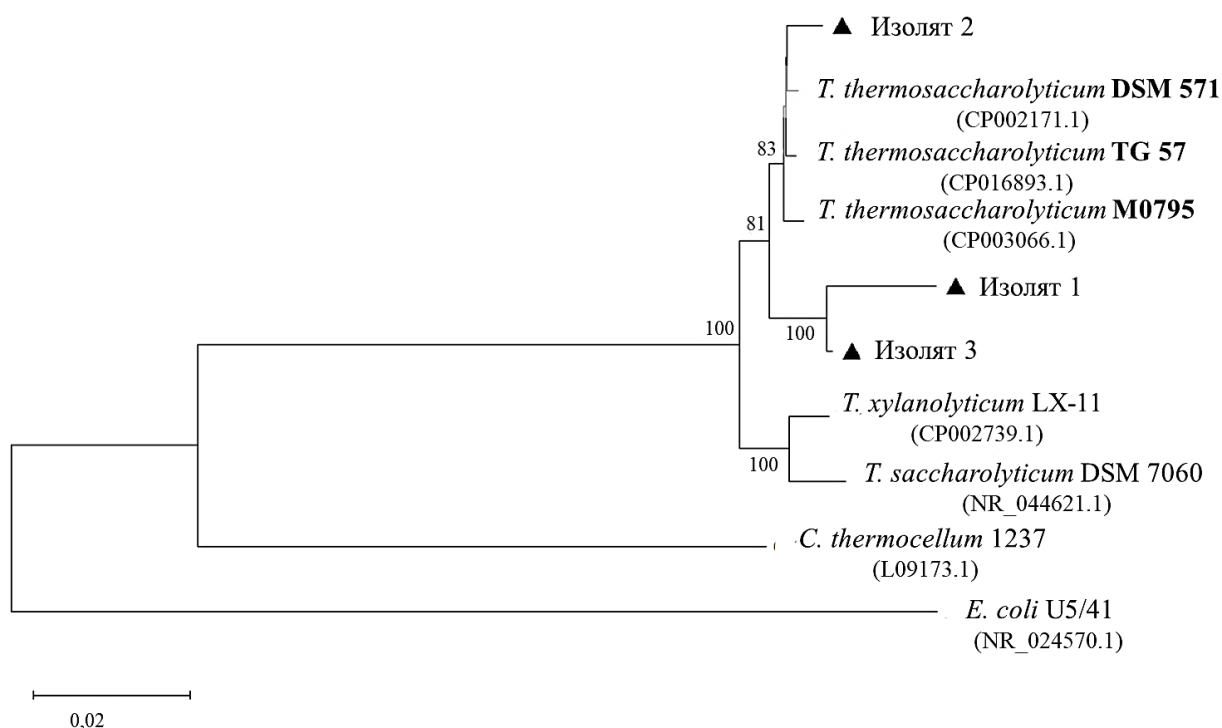


Рисунок 35. Дендрограмма, построенная на основании анализа множественного выравнивания исследуемых контигов и референсных последовательностей в программе MEGA X[®] с помощью метода neighbour-joining. В качестве реперных образцов использованы последовательности 16S рНК целлюлозолитической клостридии *Clostridium thermocellum*, нескольких штаммов *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *T. xylanolyticum*, *T. saccharolyticum*, а также *E. coli*. Значимость разбиения на кластеры указана в цифрах, обозначающих достоверность ветвления согласно бутстреп (bootstrap) анализу (% от 1000 реплик)

Наиболее отличающиеся последовательности имеют изоляты 1 и 3, их идентичность по анализируемому участку гена 16S рНК со штаммами *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* по 16S рНК составила 97,63 % для М0795 и DSM 571 и 97,55 % для TG57 (таблица 22). При этом наиболее вариабельные участки находятся в координатах выравнивания 4-54, 793-840 и 858-1036, среди которых встречаются инсерции (1-2 нуклеотида), делеции (5 нуклеотидов), трансверсии и транзиции. В тоже время изоляты 1 и 3 на дендрограмме образуют отдельную ветвь и значение достоверности ветвления (bootstrap test) для данного узла составляет

100 %, что подтверждает принадлежность изолятов 1 и 3 к роду *Thermoanaerobacterium* sp. Согласно данным филограммы (рисунок 35) изолят 2, который проявлял целлюлолитическую активность, группируется в единый кластер со штаммом *T. thermosaccharolyticum* DSM 571, но они составляют отдельную неустойчивую ветвь при значении достоверности ветвления менее 70 %. Несмотря на то, что изоляты 1 и 3 имеют определенное сходство с *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, они образуют отдельную ветвь, также не объединяющуюся и с другими видами этого же рода на примере *T. xylanolyticum* и *T. saccharolyticum*. Однако для выяснения филогенетической принадлежности выделенных изолятов требуются дальнейшие исследования, в том числе по функциональным генам, участвующим в разложении целлюлозы.

Тем не менее, очевидно, что внутри вида *T. thermosaccharolyticum* имеются штаммы, обладающие функциональным ферментом β -глюкозидазой и штаммы, у которых этот фермент неактивен, что определяет их способность (или неспособность) к разложению целлюлозы. Среди изолятов, выделенных нами, по результатам секвенирования, а также способности к образованию YAS, они также отличаются по своей способности к разложению целлюлозы. Тот факт, что при ко-культивировании микробных сообществ ($\Sigma 7$ и MC, выделенного из навоза КРС) образование бутанола детектировалось нами в среде еще до момента инокуляции *C. acetobutylicum* - подтверждает наши предположения об имеющихся в составе микробных консорциумов микроорганизмов, способных конвертировать целлюлозу в бутанол, которыми могут быть активные штаммы *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.

3.4.2. Бинарно-последовательная культура *Clostridium thermocellum* и *Clostridium acetobutylicum* для биоконверсии целлюлозы в бутанол

При масштабировании процесса биоконверсии ЦСС в продукты ацетоно-бутилового брожения технология консолидированного биопроцессинга (КБ) оказывается наиболее экономически эффективной. Однако в исследуемых нами условиях использование для этих целей микробных сообществ оказалось затруднительным и малоэффективным из-за неконтролируемого образования различных метаболитов, которые могут негативным образом влиять на АБЭ-ферментацию, ингибируя образование растворителей, а единственными представителями, которых удалось выделить на агаризованных средах из имеющихся микробных сообществ оказались *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Поэтому для конструирования бинарной культуры мы использовали модельный эксперимент с различными представителями клостридий: термофильной целлюлолитической культурой *C. thermocellum* и мезофильной бутанол-образующей культурой *C. acetobutylicum*.

Прежде всего, термин «бинарные культуры» используют в отношении консорциумов, составленных из двух микроорганизмов, отличающихся по своему метаболизму, синергетический эффект применения которых позволяет увеличить степень утилизации субстратов и выход продуктов (Cao et al., 2016). В литературе также используют термин смешанная или последовательная ко-культура (англ. «sequential co-culture»), что обозначает бинарную культуру, составленную из микроорганизмов, имеющих, как например в нашем случае, разные температурные оптимумы роста, вследствие чего культивирование организмов проводится последовательно, при этом отсутствует этап замены среды культивирования или внесения дополнительных субстратов (Nakayama et al., 2011).

При создании бинарных культур для получения биобутанола, одна обычно является целлюлозолитиком, а другая обладает способностью к ацетоно-бутиловому брожению (Зябрева и др., 2001; Olson et al., 2012; Cao et al., 2016). К настоящему моменту имеются данные о бинарных культурах, составленных из следующих пар: *C. thermocellum* и штаммы *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. acetobutylicum* или *C. beijerinckii* (Yu et al., 1985; Nakayama et al., 2011; Wen et al., 2014); *C. acetobutylicum* и штаммы *C. celevecrescens* или *C. cellulolyticum* (Salimi and Mahadevan, 2013; Wang et al., 2015); *C. cellulovorans* и *C. beijerinckii* (Wen et al., 2017).

Наши эксперименты по совмещению культивирования двух культур и биоконверсии целлюлозы в биобутанол можно охарактеризовать как двухфазный процесс, проходящий при различных температурных режимах, где первая фаза - культивирование термофильной *C. thermocellum* при 60 °C для гидролиза целлюлозы, а вторая - ферментация сахаров мезофильной *C. acetobutylicum* с образованием продуктов АБЭ-брожения при 37 °C. Для получения максимального выхода АБЭ-продуктов внесение инокулята *C. acetobutylicum* проводили на 8 сутки культивирования *C. thermocellum*, когда в культуральной жидкости накапливается наибольшее количество редуцирующих сахаров. На рисунке 36А показано содержание редуцирующих сахаров в среде, образуемых *C. thermocellum* при гидролизе целлюлозы (фильтровальная бумага, ФБ), а на рисунке 36Б - их дальнейшее потребление в процессе АБЭ-брожения культурой *C. acetobutylicum*.

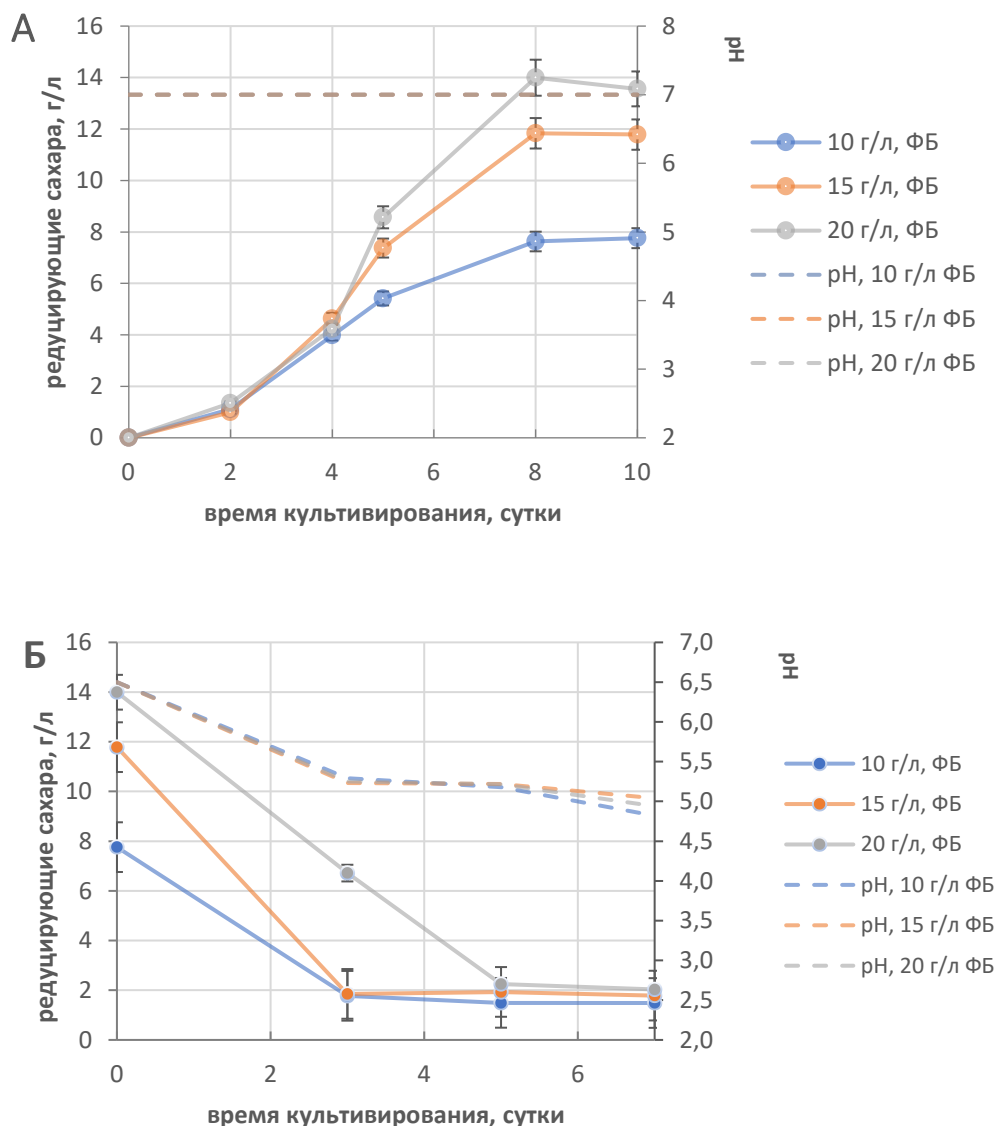


Рисунок 36. Содержание редуцирующих сахаров в среде культивирования в зависимости от фазы ферментации бинарно-последовательной культурой. А - первый этап: гидролиз субстрата термофильной *C. thermocellum*; Б - второй этап: сбраживание сахаров мезофильной *C. acetobutylicum*

В нашем исследовании максимальное содержание сахаров составило 7,8, 11,8 и 14 г/л при разложении 10, 15 и 20 г/л субстрата, соответственно. Ранее изучение процесса биоразложения целлюлозосодержащих субстратов культурой *C. thermocellum*, в основном, проводили при концентрации субстрата 10 г/л (Saddler and Chan, 1982; Ellis et al., 2011). Мутантные (рекомбинантные) штаммы этого вида культивируют на субстратах с более высокими концентрациями, например, 35 и 40 г/л целлюлозы «Solka-Flock» и 40 г/л кукурузной соломы, или 47 и 63 г/л целлюлозы «Solka-Flock» (Wang et al., 1983; Tailliez et al., 1989). Однако увеличение концентрации субстрата зачастую не приводит к его полному разложению и утилизации: так, при концентрации целлюлозы 100 г/л используется не более 80 % (Holwerda et al., 2014). В статье Nakayama с соавторами (2011) исследовали зависимость выхода продуктов

АБЭ-брожения бинарной культуры *C. thermocellum* и *C. saccharoperbutylacetonicum* от различных концентраций исходного субстрата (целлюлозы марки «Avicel») - от 5 до 50 г/л. Было продемонстрировано, что выход бутанола был максимальным (5,8 г/л) при концентрации целлюлозы 40 г/л.

В наших исследованиях, учитывая литературные данные, мы использовали субстрат (фильтровальная бумага, ФБ) в количествах 10, 15 и 20 г/л. Однако при использовании 20 и 40 г/л субстрата мы наблюдали отсутствие полного разложения фильтровальной бумаги, которая формировала взвесь на дне флакона и более не разлагалась. Некоторые авторы склонны связывать это с недостаточным содержанием витаминов (в частности биотина, пара-аминобензойной кислоты, витамина B12 и витамина B6) в среде культивирования (Akinosho et al., 2014), так как выбранная среда СМЗ, используемая для бинарных культур, является минимальной по составу и не содержит дорогостоящих компонентов для снижения общей стоимости процесса микробной биоконверсии в случае последующего масштабирования процесса.

На рисунке 37 представлены максимальные значения концентраций АБЭ-продуктов, образуемых после инокуляции второй культурой *C. acetobutylicum*. Помимо исследованных нами трёх различных концентраций ФБ, дополнительно, в этом эксперименте была проанализирована возможность образования АБЭ-продуктов бинарно-последовательной культурой при исходном содержании ФБ 40 г/л. Однако такое повышение концентрации субстрата приводило, наоборот, к снижению количества образуемых растворителей по сравнению с их максимальным содержанием при разложении 20 г/л ФБ: ацетона - в 5 раз, этанола - в 1,5 раза и бутанола - в 2 раза.

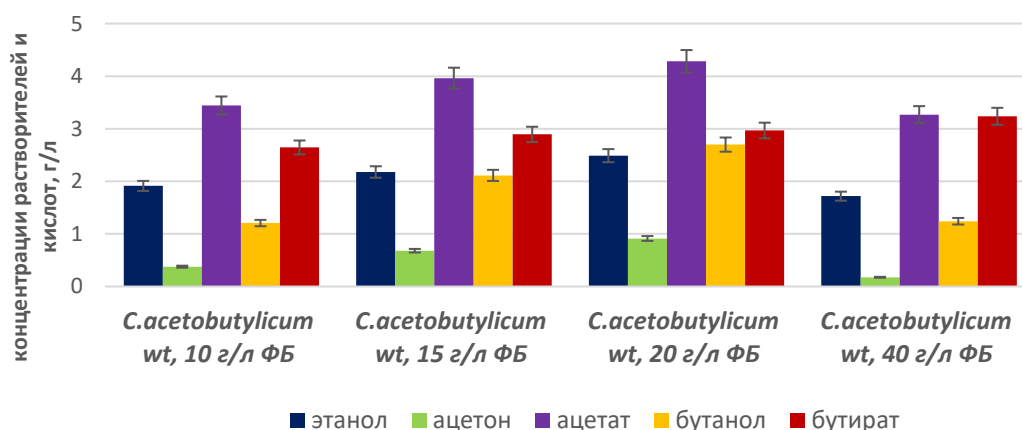


Рисунок 37. Зависимость выхода продуктов АБЭ-брожения от количества исходного субстрата - фильтровальной бумаги (ФБ)

Динамика образования продуктов ацетоно-бутилового брожения мезофильной культурой *C. acetobutylicum* на втором этапе ферментации приведена на рисунок 38. Накопление АБЭ-

продуктов происходит на вторые-третьи сутки культивирования. Максимальное количество бутанола - 2,9 г/л и этанола - 2,5 г/л образуется в пробах с исходным количеством целлюлозы 20 г/л. Известно, что для бутанола максимальный теоретический выход (100 %) в процессе микробной ферментации составляет 0,41 г/г глюкозы (Li and Khanal, 2017). Соответственно, максимальный выход бутанола в исследованных нами условиях составил 50,5 % (2,9 г/л бутанола при разложении 20 г/л ФБ), 45,4 % (2,2 г/л - при разложении 15 г/л ФБ), и 37,6 % (1,2 г/л - при разложении 10 г/л ФБ) от теоретически возможного.

Сложность работы с кластридиальными бинарными культурами заключается в том, что они не могут быть описаны моделью классического двухфазного ацетоно-бутилового брожения (Yu et al., 1985; Nakayama et al., 2011). В исследуемой смешанной культуре перед внесением инокулята *C. acetobutylicum* pH доводили до значения 6,5 и уже в течение первых 12 часов культивирования происходило закисление среды за счет образования ацетата и бутирата. К пятым суткам культивирования pH снижается до значений 4,8 - 5,0, при этом образование нейтральных продуктов (ацетон, этанол и бутанол) происходит параллельно с накоплением кислот.

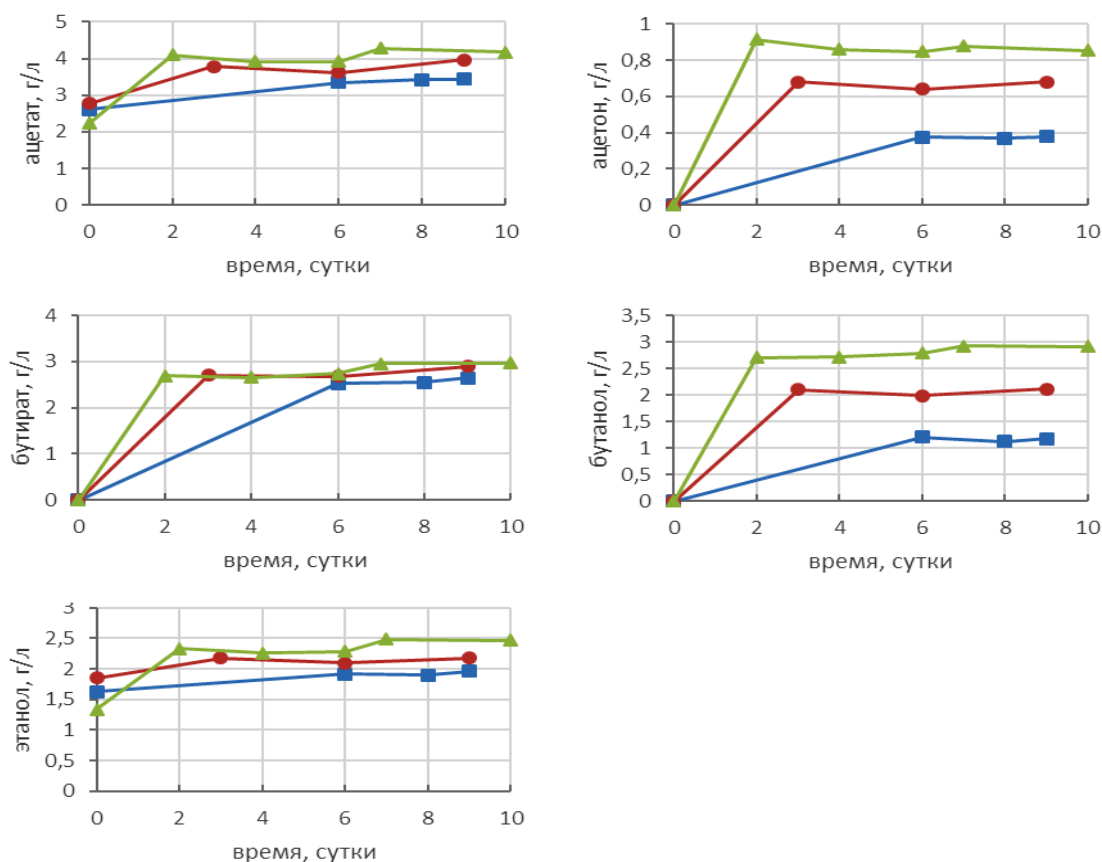


Рисунок 38. Динамика образования продуктов АБЭ - брожения в бинарной культуре *C. acetobutylicum* шт. 824 и *C. thermocellum* DSMZ 1237. Обозначения: концентрация субстрата (ФБ) - синим - 10 г/л, красным - 15 г/л, зеленым - 20 г/л

Критическим фактором для ацетоно-бутилового брожения является рН, снижение которого приводит к переключению метаболизма клостридий с ацидогенной фазы на конверсию образованных кислот в нейтральные продукты. В работе Bahl с соавторами (1982) было продемонстрировано, что при выращивании клостридий в условиях хемостата с нейтральным рН, культура *C. acetobutylicum* DSM 1731 в течение нескольких недель могла находиться на стадии ацидогенеза, не переходя к образованию АБЭ-продуктов. Для образования восстановленных продуктов значение рН среды должно быть снижено до 5 и ниже (оптимальное значение рН - 4,3). Для других штаммов этого вида диапазон рН, в котором происходит переключение метаболизма, находится между 4,2 и 5,8 (Bahl et al., 1982). Однако при снижении рН ниже значения 5,0 образующиеся ацетат и бутират могут оказывать ингибирующее действие на рост клостридиальной культуры в случае, когда концентрации этих метаболитов превышают 5 г/л (Wang et al., 2011). Оптимальной концентрацией для масляной кислоты считается 4 г/л (Gholizadeh, 2009). В условиях нашего эксперимента максимальные значения концентраций уксусной и масляной кислот составили 4,2 и 2,9 г/л соответственно (рисунок 37) и не превышали их возможного ингибирующего значения.

Более того, известно, что при дополнительном внесении в среду бутирата совместно с инокуляцией культурой *C. acetobutylicum* происходит индукция биосинтеза бутанола (Gottshal and Moris, 1981; Luo et al., 2015), однако, при значении рН выше 5,0 внесение масляной кислоты уже не оказывает никакого влияния на синтез бутилового спирта (Bahl et al., 1982). Эти данные позволяют говорить о том, что содержание масляной кислоты в бинарно-последовательной культуре не является лимитирующим фактором для биосинтеза АБЭ-продуктов.

В то же время содержание других метаболитов может оказывать ингибирующее действие на образование растворителей. Сдвиг значений рН среды, приводящий к переключению метаболизма и направленному синтезу определенных продуктов в ацетоно-бутиловом брожении, представляет собой сложно направленный процесс, так как включает в себя регуляцию активности большого количества ферментов на разных стадиях этого процесса. Так в пути образования бутанола из ацетил-КоА участвуют 6 ферментов: тиолаза, 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназа, кротоназа, бутирил-КоА-дегидрогеназа, бутиральдегид-дегидрогеназа и бутанол-дегидрогеназа (Rogers and Gottschalk, 1993; Zheng et al., 2014). Ключевую роль играет тиолаза, которая катализирует конденсацию двух молекул ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, регулируя тем самым переключение метаболизма между синтезом кислот (ацетата и бутирата) и спиртов (ацетона и бутанола). Считается, что тиолаза также осуществляет непрямую регуляцию реассимиляции ацетата и бутирата, при последующих реакциях трансформации ацетоацетил-КоА-трансферазой (Stim-Herndon et al., 1995).

Другой определяющий этап - синтез водорода и его последующее использование для образования восстановителей, участвующих в реакциях трансформации бутирил-КоА до бутанола с помощью бутиральдегид-дегидрогеназы и бутанол-дегидрогеназы. В работе Nakayama с соавторами (2008) у трансформантного штамма *C. saccharoperbutylacetonicum* «выключали» кластер генов гидрогеназы *hupCBA*, что привело к образованию недостаточного количества NADH, из-за чего выход бутанола снизился на 75,6 % по сравнению с диким типом этого вида (Nakayama et al., 2008). Кроме того, содержание и изменение концентраций железа в среде, необходимого для функционирования железо-серных белков - ферредоксин оксидоредуктаз, участвующих в преобразовании пирувата в ацетил-КоА, также существенно влияет на процесс биосинтеза АБЭ-продуктов (Jones and Woods, 1986; Тигунова и др., 2013).

Еще одним важным фактором в регуляции метаболизма АБЭ-синтезирующих клостридий является процесс спорообразования. Так, фактор транскрипции *Spo0A* за счет активации транскрипции ферментов ацетоацетат-декарбоксилазы, ацетальдегид-дегидрогеназы и КоА-трансферазы инициализирует образование нейтральных продуктов (Bahl et al., 1995; Sullivan and Bennett, 2006). Также известно, что при использовании непрерывного культивирования *C. acetobutylicum* и поддержании pH на уровне 5,7 - 6,5, вследствие отсутствия снижения pH, клетки теряют способность к споруляции и снижается выход нейтральных продуктов, что делает невозможным культивирование бутанол-образующих клостридий в хемостате для масштабирования производства (Bahl et al., 1982).

При использовании бинарных культур, суммарное соотношение образуемых в классической схеме образования из глюкозы продуктов ацетоно-бутилового брожения (ацетон : бутанол : этанол - 3:6:1) изменяется, что отмечено в наших экспериментах и некоторыми другими авторами (Nakayama et al., 2011; Wen et al., 2014; Wang et al., 2015). Так в статье Nakayama с соавторами (2011) показали, что среди продуктов АБЭ-брожения ко-культуры *C. thermocellum* и *C. saccharoperbutylacetonicum* не обнаруживался ацетон. Гены, отвечающие за синтез ацетона и бутанола, находятся в одном опероне и это означает, что при их экспрессии бутанол и ацетон должны синтезироваться одновременно. Более того, значения активностей КоА-трансферазы, ацетоацетат-декарбоксилазы, бутиральдегид-дегидрогеназы и бутанол-дегидрогеназы соответствовали таковым для монокультуры *C. saccharoperbutylacetonicum*. К сожалению, авторы не смогли объяснить этот феномен и указать на возможные факторы, ингибирующие образование ацетона, ссылаясь на необходимость дальнейшие исследования (Nakayama et al., 2011).

После засева культурой *C. acetobutylicum* нами, однако, было обнаружено, что полного потребления имеющихся в среде сахаров и их полной утилизации (рисунок 36Б) не происходило ни в одном из трёх вариантов с концентрацией субстрата 10, 15 или 20 г/л ФБ. Как одно из

возможных решений увеличения выхода АБЭ-продуктов бинарно-последовательных культур была исследована возможность дополнительной реинокуляции - повторного подсева свежей культуры *C. acetobutylicum* после однократного подведения pH среды до значения 6,5. На рисунке 39 представлены результаты образования продуктов АБЭ-брожения *C. acetobutylicum* после ре-инокуляции.

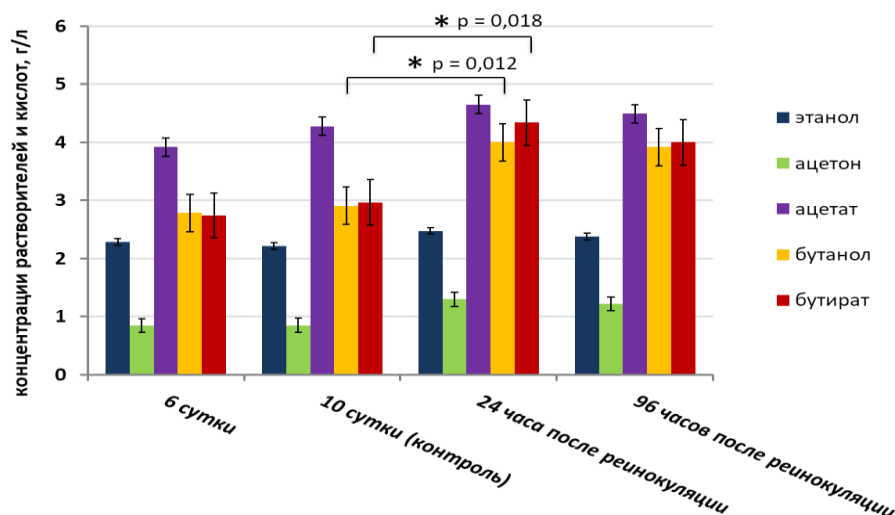


Рисунок 39. Образование продуктов АБЭ-брожения бинарно-последовательной культурой (6 - 10 сутки) после реинокуляции *C. acetobutylicum* (24 ч и 96 ч после повторного подсева). Данные представлены совокупностью из трех повторов с учетом стандартного отклонения. * - вывод о значимости различий получен с использованием t-критерия Стьюдента и соответствует $p \leq 0,05$

Обозначения: «6 и 10 сутки» - выход АБЭ-продуктов на 6 и 10 сутки в исходной бинарно-последовательной культуре. Часть флаконов на 10 сутки также была использована как контроль (без подсева *C. acetobutylicum* [«10 сутки контроль»]); «24 ч и 96 ч после реинокуляции» - выход АБЭ-продуктов после 24 и 96 часов после повторной инокуляции культурой *C. acetobutylicum*.

Через 24 ч после реинокуляции произошло увеличение выхода всех продуктов ферментации, однако, наибольшее увеличение наблюдали именно по содержанию бутанола в среде - в 1,4 раза по сравнению с выходом бутанола в культуре без реинокуляции (контроль). Концентрация масляной кислоты по сравнению с контролем также увеличилась - на 30 %, а концентрация бутанола после реинокуляции выросла до 4 г/л, что составило 70 % от максимального теоретического выхода.

В литературе не встречается данных подтверждающих или опровергающих данный эксперимент. Возможным объяснением такого эффекта является внесение свежего инокулята *C. acetobutylicum* в экспоненциальной фазе роста, при этом в среде уже находится большое количество кислых продуктов (ацетата и бутирата), что при снижении pH ниже 5,0 может приводить к более эффективному синтезу бутанола (Bahl et al., 1982). Также необходимо отметить, что перед повторным внесением инокулята pH доводили до 6,5. Этот «искусственный» сдвиг pH среды мог привести к повышению внутриклеточного pH, что в совокупности с высокой

внутриклеточной концентрацией бутирата и бутирил-КоА, является триггером для процесса спиртообразования. Так, в статье Gottwald and Gottschalk (1985) было показано, что в условиях роста с лимитированием по фосфору при снижении внутриклеточного pH *C. acetobutylicum* ниже значения 5,5 не происходит переключения метаболизма в сторону образования нейтральных продуктов, так как клетки теряют способность к синтезу и активации комплекса необходимых ферментов. Подобные фундаментальные вопросы о метаболизме микроорганизмов при совместном культивировании требует отдельных исследований, при этом не уменьшая потенциал использования данной методики в биотехнологии.

3.4.2.1. Бинарно-последовательная культура *Clostridium thermocellum* и рекомбинантного штамма *C. acetobutylicum* rex:int для биоконверсии целлюлозы в бутанол

Наиболее распространенным способом увеличения количества образуемых АБЭ-продуктов при сбраживании целлюлозосодержащих субстратов является использование в составе бинарных культур рекомбинантных штаммов бактерий. Мы также выбрали мутантный штамм *C. acetobutylicum* rex:int, у которого инактивирован ген CAC2713, кодирующий Red-Ox чувствительный транскрипционный репрессор Rex, который регулирует экспрессию генов, ответственных за биосинтез бутанола, бутирил-КоА, этанола и лактата, в особенности зависимых от соотношения NADH/NAD(+) (Wietzke and Bahl, 2012). Негативный (нокаут)-мутант отличается тем, что по сравнению с диким типом синтезирует большее количество этанола и бутанола, при этом образование водорода и ацетона у него снижено, причём синтез бутанола и этанола (но не ацетона) начинается у мутантного штамма гораздо раньше, чем у дикого типа (Wietzke and Bahl, 2012).

Результаты эксперимента с использованием мутантного штамма в качестве продуцента бутанола при биоконверсии ФБ показаны на рисунке 40.

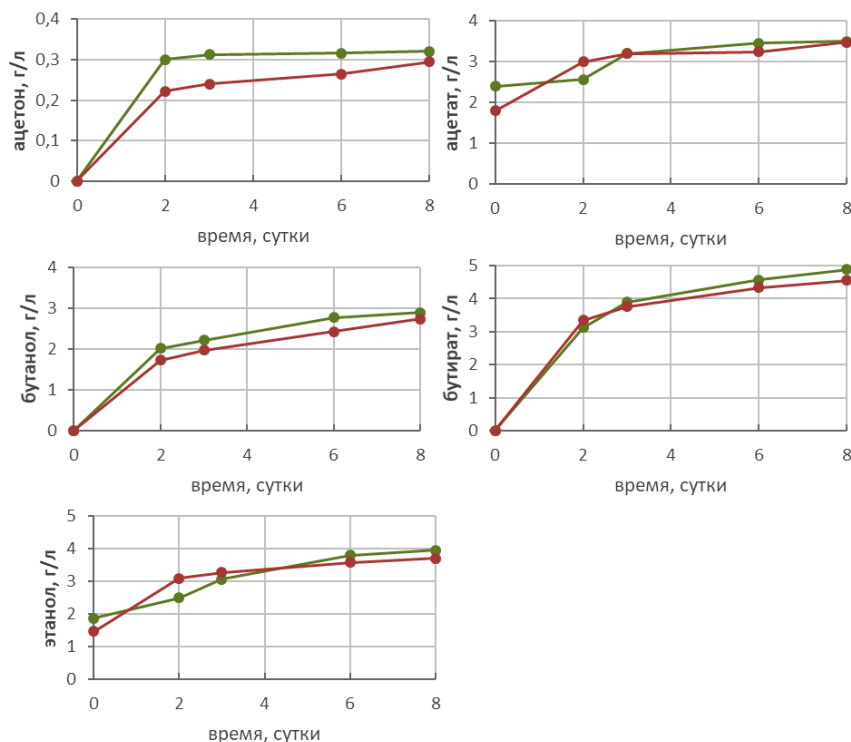


Рисунок 40. Образование продуктов АБЭ-брожения в бинарно-последовательной культуре *C. thermocellum* и *C. acetobutylicum* rex:int. Обозначения: культуры выращены на исходном субстрате (ФБ), взятом в количестве (15 г/л) - красным и (20 г/л) - зеленым

Накопление нейтральных продуктов брожения происходило в этой бинарно-последовательной культуре раньше на сутки по сравнению с диким штаммом *C. acetobutylicum* 824, что также наблюдалось при классическом культивировании на глюкозе другими авторами (Wietzke and Bahl, 2012). В нулевой точке (к моменту внесения культуры АБЭ - продуцента) в среде уже содержались этанол и ацетат, которые являются продуктами метаболизма целлюлозолитической *C. thermocellum*, что также наблюдали в других ранее исследованных бинарных культурах (Freier et al., 1988; Akinosho et al., 2014). Максимальное количество бутанола - 2,9 г/л и этанола - 3,9 г/л было отмечено нами в пробах с исходным количеством целлюлозы (ФБ) 20 г/л. На рисунке 41 представлен сравнительный анализ максимальных значений концентраций продуктов ацетоно-бутилового брожения для двух бинарно-последовательных культур с использованием дикого и мутантного штаммов АБЭ-продуцента *C. acetobutylicum*.

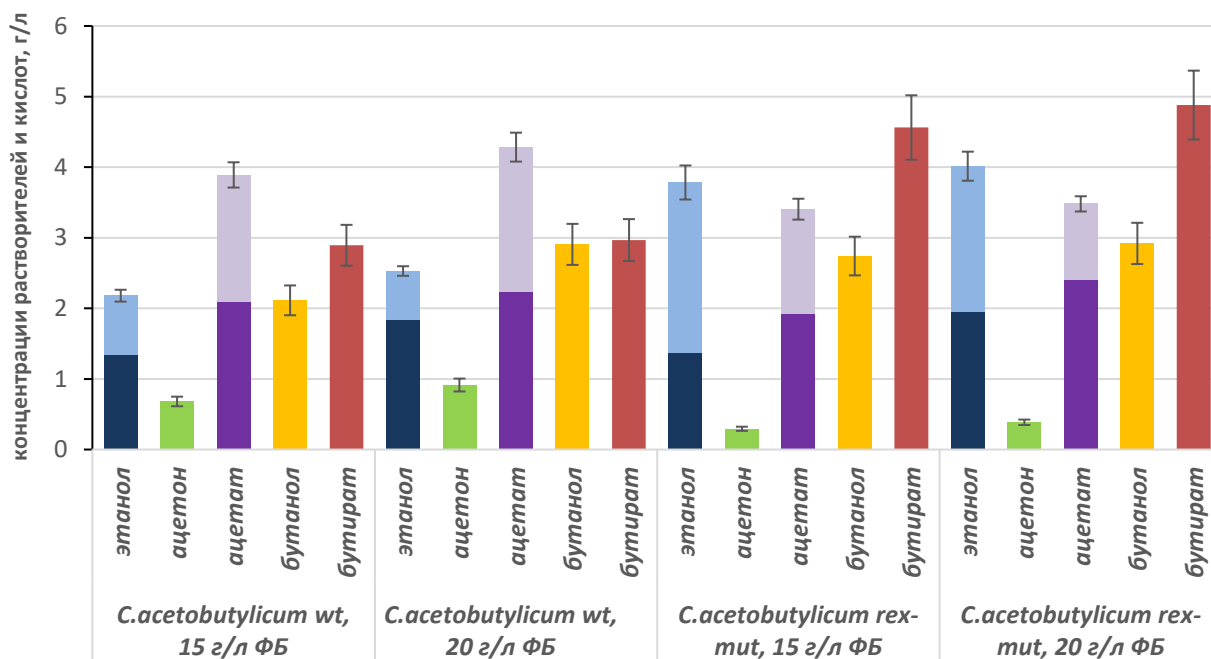


Рисунок 41. Максимальные значения концентраций АБЭ-продуктов, образованных при росте бинарно-последовательных культур на фильтровальной бумаге; wt - «wild type» - дикий тип *C. acetobutylicum* штамм824; *C. acetobutylicum* rex:int - мутантный штамм. Для этанола и ацетата - темным цветом обозначено количество продукта, образованного целлюлозолитической культурой *C. thermocellum* к моменту подсева инокулята, а светлым - количество этих веществ, образованное культурами *C. acetobutylicum*

Согласно литературным данным, белок Rex является транскрипционным репрессором генов биосинтеза бутирил-КоА, этанола и лактата. Бутирил-КоА также является предшественником для биосинтеза бутирата, но на этапе кислотогенной фазы концентрация образовавшегося *C. acetobutylicum* rex:int бутирата обычно составляет лишь 26 % от количеств, которые образуются диким штаммом. Выход ацетона у мутантного штамма составляет половину от выхода дикого штамма (Wietzke and Bahl, 2012). Большая концентрация соотношения NADH/NAD⁺ является триггером активации биосинтеза этанола, это подтверждает, что при использовании штамма *C. acetobutylicum* rex:int выход этанола, согласно данным полученным Wietzke and Bahl (2012) увеличился в 3,9 раз. В статье Wietzke and Bahl (2012) для негативного мутанта *C. acetobutylicum* rex:int было показано увеличение по сравнению с диким штаммом активностей тиолазы и кротолазы, что также приводило к изменению в финальном соотношении АБЭ-продуктов, отличающимся от классической схемы, а также повышенному образованию водорода. Совокупность этих факторов является основной причиной смещения метаболизма *C. acetobutylicum* rex:int в сторону увеличенного образования этанола и бутанола. По полученным нами для бинарно-последовательной культуры данным выход этанола при использовании рекомбинантного штамма увеличился в 1,5 раза, а бутирата - в 1,6 раз, однако, содержание бутанола не изменилось (рисунок 41). Одним из объяснений этому может быть недостаточное

количество сахаров в среде после гидролиза исходного субстрата целлюлозолитической культурой. В статье Fond с соавторами (1984) было описано переключение метаболизма *C. acetobutylicum* NCIB 619 с «бутиратного типа» на «бутанольный» в зависимости от увеличения количества глюкозы в среде. Авторы показали, что при внесении менее 5 г/л сахаров в день при периодическом культивировании основным продуктом *C. acetobutylicum* оставался не бутанол, а бутират, синтез которого регулируется ферредоксин-НАД(Ф)-оксидоредуктазами. Суммарный выход АБЭ-продуктов *C. acetobutylicum* rex:int в нашем эксперименте составил 6,8 и 7,2 г/л при культивировании на 15 и 20 г/л ФБ соответственно, что на 39 и 18 % превышает суммарный выход АБЭ-продуктов с использованием дикого типа *C. acetobutylicum*. При этом разница данных значений в основном представлена различием за счет количеств образованных этанола и ацетона.

Искусственно подобранные консорциумы представляют большой интерес для изучения, исследования механизмов регуляции образования конечных продуктов, осуществления селекции новых штаммов и оптимизирования условий их отдельного и совместного культивирования. Такая же пара клостридиальных культур (*C. thermocellum* и *C. saccharoperbutylacetonicum*), как и в нашем исследовании, использовалась другими исследователями (Nakayama et al., 2011). Целлюлозолитический штамм *C. thermocellum* NBRC103400 (ATCC 27405) выращивали на 40 г/л порошковой целлюлозы в качестве субстрата, а затем культивировали совместно с *C. acetobutylicum* в течение 9 дней, однако, выход бутанола в этой бинарной культуре составил лишь 1 г/л, тогда как в условиях наших экспериментов - 2,9 г/л при использовании *C. acetobutylicum* и мутантного штамма *C. acetobutylicum* rex:int (рисунок 41) и 4,6 г/л в экспериментах с повторной реинокуляцией культуры дикого типа (рисунок 39). В статье других авторов (Yu et al., 1985) аналогичную бинарную культуру выращивали на 30 г/л целлюлозы Solka-Flock в течение 2-3 дней на первом этапе и в течение 3-4 дней на втором этапе. Выход бутанола в этих условиях составил менее 0,3 г/л. Таким образом, предложенные нами модификации в отношении условий культивирования, ре-инокуляции и использовании рекомбинантного штамма позволили значительно улучшить выход бутанола - в 9,7 раз при использовании дикого и рекомбинантного штаммов *C. acetobutylicum* (выход АБЭ-продуктов в 4,9 для дикого штамма).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время все больше внимания уделяется проблемам экологии. Среди них наиболее остро стоят вопросы поиска альтернативных источников энергии и переработки производимых отходов. Разработка и использование различных биотехнологических подходов, в том числе основанных на микробной конверсии органических отходов в компоненты биотоплива, является наиболее актуальным в современном мире. Активно разрабатываются технологии использования чистых культур и сообществ микроорганизмов и образуемых ими ферментов для получения биоводорода, биогаза, биоэтанола и биобутанола, а также биодизеля. Однако эти направления остаются до сих пор широко невостребованными, в том числе в отечественной индустрии из-за недостатка информации о фундаментальных механизмах взаимодействия и взаимовлияния микроорганизмов в микробных консорциумах и воздействия различных внешних факторов на последовательные этапы биоразложения исходных субстратов в финальные продукты в таких сообществах, а также из-за отсутствия детально разработанных схем производства и переработки для масштабирования процессов.

В ходе проведённого нами комплексного исследования были изучены процессы биоразложения различных целлюлозосодержащих отходов с образованием газообразного (биометан) и жидких (АБЭ продукты) видов биотоплива анаэробными микробными сообществами и смешанными культурами. В работе были использованы как традиционные микробиологические методы по подбору и оптимизации условий культивирования микроорганизмов и комбинации их в ко-культуры, выбору субстратов и их сочетания и наличие ко-субстратов для более эффективной биоконверсии. Изучение структуры микробных сообществ при помощи сканирующей электронной микроскопии позволило определить особенности адгезии, локализации и распределения микроорганизмов на используемых субстратах, а использование DGGE-анализа и высокопроизводительного секвенирования (HTS) - идентифицировать входящие в сообщество бактерии и археи и проанализировать динамику изменения состава сообществ в зависимости от используемых субстратов.

Нами был изучен процесс биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов, среди которых различные типы бумаг, фитомасса растений и отходы пивного производства (дробина) в биогаз микробными анаэробными сообществами. Эффективность подобных консорциумов определяется уникальным для каждого МС составом микроорганизмов и их трофическими взаимодействиями (Angelidaki et al., 2011; Цавкелова и Нетрусов, 2012). Было показано, что для получения более активных целлюлозолитических и метаногенных микробных консорциумов необходимо проведение предварительной селекции в течение нескольких пассажей на

целлюлозосодержащем субстрате, в результате чего осуществлен подбор нескольких эффективных микробных сообществ, которые стабильно сохраняют свою активность на протяжении длительного времени. В качестве практического применения микробных консорциумов, показана возможность полной утилизации целлюлозосодержащих отходов (на примере пивной дробины) после их биоконверсии в биогаз в качестве биоудобрения.

Нами впервые был изучен состав целлюлозолитических термофильных метаногенных сообществ, культивируемых на различных типах бумаг, основными группами бактерий в которых являются *Bacteroidetes*, *Thermotogae* и *Firmicutes*, а метаногенами - преимущественно гидрогенотрофные представители *Methanoculleus* и *Methanothermobacter*, а также *Methanosarcina*. Была выявлена существенная роль особой группы термофильных синтрофных ацетат-окисляющих бактерий (SAOB), активно выводящих образующийся ацетат из трофической цепи, что определяет протекание гидрогенотрофного метаногенеза в этих условиях.

Как правило, целлюлозосодержащие субстраты не состоят только из 100 %-ой целлюлозы, а содержат также гемицеллюлозы и лигнин. Чтобы увеличить выход биотоплива при конверсии данных субстратов применяют разнообразные технологии предобработки субстрата, с целью повышения его доступности для микроорганизмов. В нашем исследовании был изучен потенциал биологической предобработки лигноцеллюлозных субстратов с помощью микромицетов *Trichoderma viride* и *Aspergillus terreus*, изучены возможности совмещения аэробного (с помощью грибов) и анаэробного (с помощью метаногенных сообществ) типов биоразложения субстратов. Отмечено эффективное использование смеси бумаг, содержащей легкоразлагаемые и трудноразлагаемые материалы, что в целом повышает их общую биodeградебельность и конверсию в биогаз.

Селекция микробных сообществ позволила выделить чистые культуры анаэробных термофильных бактерий, принадлежащих к *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, причём для некоторых изолятов была показана способность к деструкции целлюлозы, что является редким для этого вида феноменом.

В работе также был применен метод использования последовательного ко-культивирования микроорганизмов для получения АБЭ-продуктов (бинарно-последовательное ко-культивирование). Выбранные нами условия и исследованная смешанная культура термофильного целлюлозолитика *C. thermocellum* и мезофильной бутанол-образующей клостридии *C. acetobutylicum* показала высокий выход нейтральных продуктов брожения по сравнению с известными к настоящему моменту литературными данными (Yu et al., 1985; Nakayama et al., 2011). Впервые в составе смешанной культуры был использован рекомбинантный штамм *C. acetobutylicum* *rex:int*, при этом выход этанола по сравнению с диким штаммом увеличился в 1,5 раза, а общий выход АБЭ-продуктов - в 1,2 раза. Для повышения

выхода бутанола был предложен новый подход - проведение вторичной реинокуляции культурой *C. acetobutylicum* (дикий тип), что позволило получить 70 % от максимального теоретического выхода бутанола.

Таким образом, в данной работе рассмотрены различные фундаментальные и прикладные аспекты использования микроорганизмов для получения биотоплива. Биотехнологический потенциал результатов также заключается в возможности их применении для разработки установок по получению биогаза при биоконверсии лигноцеллюлозы с целью получения биометана, который может затем быть очищен до степени технической чистоты с помощью мембранных газоразделяющих систем и использован не только для сжигания, но и в качестве энергоносителя для целей локальной энергетики.

ВЫВОДЫ

1. Термофильные микробные сообщества показали свою эффективность при утилизации и биоконверсии в биогаз ряда целлюлозосодержащих субстратов на примере бумажной продукции и пивной дробины с содержанием до 62% и 59% метана соответственно.

2. Биологическая предобработка лигноцеллюлозных субстратов (на примере фитомассы топинамбура) с помощью культуры *Trichoderma viride* позволяет увеличить выход биогаза метаногенным микробным сообществом в 1,5 раза.

3. Впервые изучен состав термофильных микробных сообществ, образующих метан при культивировании на различных типах бумажной продукции: выявлены доминирующие популяции целлюлозолитических бактерий (*Clostridium cellulosi*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Herbinex hemicellulosilytica*), в том числе получено несколько изолятов *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Метаногены представлены преимущественно гидрогенотрофными археями (*Methanoculleus*, *Methanothermobacter*).

4. Показано присутствие синтрофных ацетат-окисляющих бактерий (*Tepidanaerobacter*, *Thermotoga*) и установлена их роль в осуществлении эффективной биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов термофильными (55°C) метаногенными сообществами.

5. На примере биоразложения фильтровальной бумаги изучена потенциальная возможность использования клостридий (*Clostridium thermocellum* и *C. acetobutylicum*) при их бинарно-последовательном культивировании для получения продуктов ацетоно-бутилового брожения. Применение методики повторной инокуляции *C. acetobutylicum* позволило увеличить выход бутанола на 38% (с 2,9 г/л до 4 г/л). Использование нокаут-мутанта *C. acetobutylicum rex:int* повысило суммарный выход АБЭ-продуктов по сравнению с диким типом на 26%.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

МС - микробные сообщества

АБЭ-продукты - ацетон, бутанол, этанол

ВПС или HTS - метод высокопроизводительного секвенирования

ЦСС - целлюлозосодержащий субстрат

РГС - разделение этапов гидролиза целлюлозы и сбраживания образовавшихся сахаров

СГС - одновременный гидролиз целлюлозы и сбраживание гексоз

СГК - совместный гидролиз и ко-ферментация

КБ - консолидированный биопроцессинг

КРС - крупный рогатый скот

КЖ - культуральная жидкость

ДНСК - динитросалициловая кислота

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

DGGE или ДГГЭ анализ - денатурирующий градиентный гель-электрофорез

ТБО - твердые бытовые отходы

МКЦ - микрокристаллическая целлюлоза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азаров В. И. Буров А. В., Оболенская А. В. Химия древесины и синтетических полимеров : учебник для вузов. // Санкт-Петербург. – изд. «Лань». – 2010. – С. 618.
2. Алешина Л. А., Глазкова С. В., Луговская Л. А., Подойникова М. В., Фофанов А. Д., Силина Е. В. Современные представления о строении целлюлоз. // Химия растительного сырья. – 2001. – №. 1.
3. Алимова Ф. К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. // Монография. – Казанский гос. ун-т. – 2006. – С. 208.
4. Андрес Ф., Греббе К. Химия и технология пропилена. // Ленинград, изд-во «Химия» - 1973 – 368 стр.
5. Березина О.В., Захарова Н. В., Яроцкий С. В., Зверлов В. В. Микробные продуценты бутанола. // Биотехнология. – 2011. – №. 4. – С. 8-25.
6. Березина О.В., Синеев С.П., Великодворская Г.А., Шварц В., Зверлов В.В. Внеклеточная гликозилгидролазная активность клостридий, образующих ацетон, бутанол и этанол. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. – №. 1. – С. 49-55.
7. Бехтерева М. Н. Ацетонобутиловое брожение при непрерывном удалении образующихся продуктов путем экстракции. // Микробиология. – 1939. – Т. 8. – №. 7. – С. 855-862.
8. Биобутанол: история, технологии, производители [Электронный ресурс] / Исследовательская компания Abercade. // Москва, Минск. Дата публикации: 07.2009. URL: <http://www.abercade.ru/research/analysis/1390.html>.
9. Брагинский О. Б. Альтернативные моторные топлива: мировые тенденции и выбор для России. // Российский химический журнал. – 2008. – Т. 52. – №. 6. – С. 137-146.
10. Васильев Р. Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 2: биоэтанол. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2007. – Т. 3. – №. 2. – С. 50-60.
11. Виноградский С.Н. Микробиология почвы. // Изд-во Академии наук СССР – 1952.
12. Воробьева С. В., Боголюбова Н. С., Драганов И.Ф. Пивная дробина в рационах бычков. // Животноводство России. – 2005. – №3. – С.31-32.
13. Громовых Т. И., Садыкова В. С., Луценко С. В., Дмитренко А. С., Фельдман Н. Б., Данильчук Т. Н., Каширин В. В. Бактериальная целлюлоза, синтезируемая *Gluconacetobacter hansenii*, для использования в медицине. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – №. 1. – С. 69-75.
14. Грунин Л. Ю., Грунин Ю. Б., Таланцев В. И., Никольская Е. А., Масас Д. С. Особенности структурной организации и сорбционных свойств целлюлозы. // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2015. – том 57. – №1. – С. 46-55.
15. Давидов Е.Р., Каныгин П.С., Филиппов К.Б., Фракин О.А., Черемнов И.В. Способ получения органических растворителей, преимущественно бутанола. // Патент РФ № 2375454 – заявка № 2008134865/13, от 28.08.2008 – Бюл. №34, С. 12.
16. Долгонос Б.М., Губернаторова Т.Н. Механизмы и кинетика деструкции органического вещества в водной среде. // Изд. URSS. – Москва. – 2011. – С. 208.
17. Дорофеева Л. А., Рязанова Т. В., Чупрова Н. А. Исследование вегетативной части топинамбура. 2. Оптимизация процесса выделения целлюлозы. // Химия растительного сырья. – 1998. – №. 2.
18. Егоров Н. С. Шапошников-основатель отечественной промышленной микробиологии и создатель научной школы микробиологов (к 125-летию со дня рождения и 85-летию со дня организации кафедры микробиологии МГУ имени МВ Ломоносова). // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2011. – №. 1.
19. Елисеева Е.М., Гордин А.А., Тарасов И.В., Молчанова И.В. Современное состояние мирового производства биотоплива второго поколения из растительного сырья и отходов

- деревообработки. // Экология промышленного производства. – 2013. – Т. 1. – №. 81. – С. 60-63.
20. Заварзин Г.А. Эмиссия метана с территории России. // Микробиология. – 1997. – Т.66. – №5. – С. 669-673.
 21. Зябрева Н.В., Исакова Е.П., Бирюков В.В. Некоторые технологические параметры, влияющие на этанологенез в ходе биоконверсии целлюлозосодержащего сырья. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37. – №. 5. – С. 1-6.
 22. Кугучин К., Алеханова Е. Мировая индустрия биотоплива: общая характеристика, история и факторы развития отрасли. // РИСК: ресурсы, информация, снабжение, конкуренция. – 2012. – №. 1. – С. 199-204.
 23. Кураков А. В., Болобова А. В. Поиск грибных продуцентов алкалостабильных и термостабильных целлюлаз. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35. – №. 4. – С. 402-408.
 24. Логоткин И. С. Технология ацетоно-бутилового производства. // Пищепромиздат. – 1958.
 25. Морозова, О. В., Шумакович, Г. П., Горбачева, М. А., Шлеев, С. В., Ярополов, А. И. «Голубые» лакказы (обзор). // Биохимия. – 2007. – Т. 72. – №. 10. – С. 1396-1412.
 26. Назаров Д.А., Корнеева О.С. Топинамбур как перспективное сырье в биотехнологии органических растворителей. // Актуальная биотехнология. – 2013. – Т. 1. – №. 4. – С. 33-37.
 27. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: теория и практика в 2 частях. Учебник для бакалавриата и магистратуры. // Юрайт, Москва – 2017. – С. 315.
 28. Ножевникова А. Н., Каллистова А. Ю., Литти Ю. В., Кевбрина М. В. Биотехнология и микробиология анаэробной переработки органических коммунальных отходов: коллективная монография. // Москва, Университетская книга. – 2016. – С. 320.
 29. Олескин А. В., Ботвинко И. В., Цавкелова Е. А. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов. // Микробиология. – 2000. – Т. 69. – №. 3. – С. 309-327.
 30. Петрова Е. В., Егорова М. А., Пискункова Н. Ф., Кожевин П. А., Нетрусов А. И., Цавкелова Е. А. Анаэробные целлюлозолитические микробные сообщества, разлагающие биомассу *Anabaena variabilis*. // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – №. 6. – С. 729-738.
 31. Поляков В.А., Римарева Л.В., Галкина Г.В., Илларионова В.И., Кукова Е.В., Горбатова Е.В., Волкова Г.С. Штамм бактерий *Clostridium acetobutylicum* - продуцент *n*-бутилового спирта, ацетона и этанола. // Патент РФ № 2393213 – заявка № 2008149763/13, от 17.12.2008 – Бюл. №18, С. 5.
 32. Рабинович М. Л., Мельник М. С. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биодegradации высокоупорядоченных форм целлюлозы. // Успехи биологической химии. – 2000. – Т. 40. – №. 1. – С. 205-266.
 33. Сусану И.А. Регулирование рынка жидкого биотоплива в России и мире. // Торговая политика. – 2019. – Т. 1. – №. 17. – С. 60-88.
 34. Сушкова В. И., Яроцкий С. В., Сухоженко А. В. Разработка технологической схемы получения *n*-бутанола с клостридиями. // Химия растительного сырья. – 2013. – №. 3.
 35. Сушкова В. И., Яроцкий С. В. Эффективность методов выделения продуктов ацетоно-бутиловой ферментации //Химия растительного сырья. – 2011. – №. 3.
 36. Тепляков В.В., Шалыгин М.Г., Козлова А.А., Чистяков А. В., Цодиков М. В., Нетрусов А. И. Мембранные технологии в биопереработке лигноцеллюлозы в компоненты моторных топлив. // Мембраны. – 2017. – Т. 7. – №. 4. – С. 228-246.
 37. Тигунова Е. А., Шульга С. М., Блюм Я. Б. Альтернативный вид топлива–биобутанол. // Цитология и генетика. – 2013. – №. 47, № 6. – С. 51-71.
 38. Цавкелова Е. А., Нетрусов А. И. Образование биогаза микробными сообществами при разложении целлюлозы и пищевых отходов. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012(6). – Т. 48. – № 4. – С. 417–424.

39. Цавкелова Е. А., Нетрусов А. И. Получение биогаза из целлюлозосодержащих субстратов (обзор). // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012(а). – Т. 48. – № 5. – С. 469–483.
40. Цавкелова Е. А., Александрова А. В., Чердынцева Т. А., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Грибы, ассоциированные с корнями орхидей в условиях оранжереи. // Микология и фитопатология. — 2003. — № 37. — С. 57–63.
41. Цавкелова Е. А., Климова С. Ю., Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов (обзор). // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – №. 3. – С. 261-268.
42. Шапошников В. Н. Техническая микробиология. // М.: Советская наука. – 1948.
43. Шапошников В. Н., Мантейфель А. Я., Иерусалимский Н. Д., Зыкова К. И., Бехтерева М. Н. Ацетонобутиловое брожение на мелассе. // Микробиология. – 1939. – Т. 8. – №. 1. – С. 38-55.
44. Achinas S., Achinas V., Euverink G. J. W. A technological overview of biogas production from biowaste. // Engineering. – 2017. – Т. 3. – №. 3. – С. 299-307.
45. Aden A., Ruth M., Ibsen K., Jechura J., Neeves K., Sheehan J., Wallace B., Montague L., Slayton A., Lukas J. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. // National renewable energy lab, Colorado. – 2002. – №. NREL/TP-510-32438.
46. Akin D. E., Rigsby L. L., Sethuraman A., Morrison W. H., Gamble G. R., Eriksson K. E. Alterations in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermisporea* and *Cyathus stercoreus*. // Applied and environmental microbiology. – 1995. – Т. 61. – №. 4. – С. 1591-1598.
47. Akinosho H., Yee K., Close D., Ragauskas A. The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. // Frontiers in chemistry. – 2014. – Т. 2. – С. 66.
48. Alaswad A., Dassisti M., Prescott T., Olabi A. G. Technologies and developments of third generation biofuel production. // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2015. – Т. 51. – С. 1446-1460.
49. Amon T., Amon B., Kryvoruchko V., Zollitsch W., Mayer K., Gruber L. Biogas production from maize and dairy cattle manure—influence of biomass composition on the methane yield. // Agriculture, Ecosystems & Environment. – 2007. – Т. 118. – №. 1-4. – С. 173-182.
50. Amore A., Giacobbe S., Faraco V. Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. // Current genomics. – 2013. – Т. 14. – №. 4. – С. 230-249.
51. Angelidaki I., Karakashev D., Batstone D. J., Plugge C. M., Stams A. J. Biomethanation and its potential. // Methods in enzymology. – Academic Press, 2011. – Т. 494. – С. 327-351.
52. Antizar-Ladislao B., Turrion-Gomez J. L. Second-generation biofuels and local bioenergy systems. // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. – 2008. – Т. 2. – №. 5. – С. 455-469.
53. Araújo K., Mahajan D., Kerr R., Silva M. D. Global biofuels at the crossroads: an overview of technical, policy, and investment complexities in the sustainability of biofuel development. // Agriculture. – 2017. – Т. 7. – №. 4. – С. 32.
54. Argyros D. A., Tripathi S. A., Barrett T. F., Rogers S. R., Feinberg L. F., Olson D. G., Foden J.M., Miller B.B., Lynd L.R., Hogsett D.A., Caiazza N. C. High ethanol titers from cellulose by using metabolically engineered thermophilic, anaerobic microbes. // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Т. 77. – №. 23. – С. 8288-8294.
55. Atlas R. M. Handbook of microbiological media. // CRC press. – 2004. – С. 411.
56. Azhar S. H. M., Abdulla R., Jambo S. A., Marbawi H., Gansau J. A., Faik A. A. M., Rodrigues K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. // Biochemistry and biophysics reports. – 2017. – Т. 10. – С. 52-61.
57. Bahl H., Andersch W., Braun K., Gottschalk G. Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. // European journal of applied microbiology and biotechnology. – 1982. – Т. 14. – №. 1. – С. 17-20.

58. Bahl H., Dürre P. Biotechnology and medical applications. // Wiley VCH Verlag GmbH – 2001. – C. 270.
59. Bahl H., Müller H., Behrens S., Joseph H., Narberhaus F. Expression of heat shock genes in *Clostridium acetobutylicum*. // FEMS microbiology reviews. – 1995. – T. 17. – №. 3. – C. 341-348.
60. Bastawde K. B. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1992. – T. 8. – №. 1. – C. 45-49.
61. Bayer E. A., Kenig R., Lamed R. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. // Journal of Bacteriology. – 1983. – T. 156. – №. 2. – C. 818-827.
62. Bayer E. A., Lamed R., Himmel M. E. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. // Current opinion in Biotechnology. – 2007. – T. 18. – №. 3. – C. 237-245.
63. Bayer E. A., Shoham Y., Lamed R. Cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. // The prokaryotes. – Springer, New York, NY. – 2006. – C. 578-617.
64. Bergquist P. L., Gibbs M. D., Morris D. D., Te'o V. J., Saul D. J., Morgan H. W. Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria. // FEMS Microbiology Ecology. – 1999. – T. 28. – №. 2. – C. 99-110.
65. Bhandiwad A., Shaw A. J., Guss A., Guseva A., Bahl H., Lynd, L. R. Metabolic engineering of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* for n-butanol production. // Metabolic engineering. – 2014. – T. 21. – C. 17-25.
66. Biely P., Tenkanen M. Enzymology of hemicellulose degradation. // In Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial application. London: Taylor and Francis Ltd. – 1998. – T. 2. – C. 25-47.
67. Bigelow M., Wyman C. E. Cellulase production on bagasse pretreated with hot water. // Biotechnology for Fuels and Chemicals. – Humana Press, Totowa, NJ. – 2002. – C. 921-934.
68. Birsan C., Johnson P., Joshi M., MacLeod A., McIntosh L., Monem V., Nitz M., Rose D. R., Tull D., Wakarchuck W. W., Wang Q., Warren R. A. J., White A., Withers S. G. Mechanisms of cellulases and xylanases. // Biochem. Soc. Trans. – 1998. – № 26 – C. 156-160.
69. Bjerre A. B., Olesen A. B., Fernqvist T., Plöger A., Schmidt A. S. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. // Biotechnology and bioengineering. – 1996. – T. 49. – №. 5. – C. 568-577.
70. Blumer-Schuette S. E., Brown S. D., Sander K. B., Bayer E. A., Kataeva I., Zurawski J. V., Conway J. M., Adams W. W., Kelly R. M. Thermophilic lignocellulose deconstruction. // FEMS microbiology reviews. – 2014. – T. 38. – №. 3. – C. 393-448.
71. Bochiwal C., O'Malley C., Chong J. P. J. Biomethane as an energy source. // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. – Springer, Berlin, Heidelberg. – 2010. – C. 2809-2815.
72. Borisov I., Golubev G., Patrusheva E.V., Sinekoy S.P. Intensification of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation via Products Recovery: Thermopervaporation Assisted by Phase Separation. // Chemical Engineering Transactions. – 2018. – T. 64. – C. 43-48.
73. Börjesson P., Mattiasson B. Biogas as a resource-efficient vehicle fuel. // Trends in biotechnology. – 2008. – T. 26. – №. 1. – C. 7-13.
74. Borrel G., O'Toole P. W., Harris H. M., Peyret P., Brugere J. F., Gribaldo S. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. // Genome biology and evolution. – 2013. – T. 5. – №. 10. – C. 1769-1780.
75. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Analytical biochemistry. – 1976. – T. 72. – №. 1-2. – C. 248-254.
76. Brethauer S., Studer M. H. Consolidated bioprocessing of lignocellulose by a microbial consortium. // Energy & Environmental Science. – 2014. – T. 7. – №. 4. – C. 1446-1453.

77. Bryant M., Tzeng S., Robinson I., Joyner Jr, A. Nutrient requirements of methanogenic bacteria. // In *Anaerobic Biological Treatment Processes*; Pohland, F.; *Advances in Chemistry*. – American Chemical Society: Washington, DC. – 1971. – T. 101. – C. 23 - 40.
78. Bulletin «Biofuels factsheet». // Center for Sustainable Systems, University of Michigan. – 2017. – Pub. No. CSS08-09.
79. Cao G., Sheng Y., Zhang L., Song J., Cong H., Zhang J. Biobutanol production from lignocellulosic biomass: prospective and challenges. // *Journal of Bioremediation and Biodegradation*. – 2016. – T. 7. – №. 4.
80. Carere C. R., Sparling R., Cicek N., Levin D. B. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. // *International journal of molecular sciences*. – 2008. – T. 9. – №. 7. – C. 1342-1360.
81. Castrillón L., Fernández-Nava Y., Ormaechea P., Marañón E. Optimization of biogas production from cattle manure by pre-treatment with ultrasound and co-digestion with crude glycerin. // *Bioresource technology*. – 2011. – T. 102. – №. 17. – C. 7845-7849.
82. Chen H., Han Q., Venditti R. A., Jameel H. Enzymatic hydrolysis of pretreated newspaper having high lignin content for bioethanol production. // *BioResources*. – 2015. – T. 10. – №. 3. – C. 4077-4098.
83. Cheng Y., Zhou W., Gao C., Lan K., Gao Y., Wu Q. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*. – 2009. – T. 84. – №. 5. – C. 777-781.
84. Chyi Y. T., Dague R. R. Effects of particulate size in anaerobic acidogenesis using cellulose as a sole carbon source. // *Water Environment Research*. – 1994. – T. 66. – №. 5. – C. 670-678.
85. Chynoweth D. P., Owens J. M., Legrand R. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. // *Renewable energy*. – 2001. – T. 22. – №. 1-3. – C. 1-8.
86. Cibis K. G., Gneipel A., König H. Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants // *Journal of biotechnology*. – 2016. – T. 220. – C. 51-63.
87. Clarke W. P. Cost-benefit analysis of introducing technology to rapidly degrade municipal solid waste. // *Waste Management & Research*. – 2000. – T. 18. – №. 6. – C. 510-524.
88. Collins M. D., Lawson P.A., Willems A., Cordoba J.J., Fernandez-Garayzabal J., Garcia P., Cai J., Hippe H., Farrow J.A.E. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1994. – T. 44. – №. 4. – C. 812-826.
89. Colpa D. I., Fraaije M. W., van Bloois E. DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. // *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. – 2014. – T. 41. – №. 1. – C. 1-7.
90. Dashtban M., Schraft H., Syed T. A., Qin W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. // *International journal of biochemistry and molecular biology*. – 2010. – T. 1. – №. 1. – C. 36.
91. Dębowski M., Zieliński M., Grala A., Dudek M. Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies. // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2013. – T. 27. – C. 596-604.
92. Demirel B., Scherer P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2008. – T. 7. – №. 2. – C. 173-190.
93. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B. (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. // Springer Science & Business Media – 2009. – T. 3. – C. 1422.
94. Divne C., Stahlberg J., Reinikainen T., Ruohonen L., Pettersson G., Knowles J. K., Teeri T. T., Jones T. A. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. // *Science*. – 1994. – T. 265. – №. 5171. – C. 524-528.

95. Du L., Su Y., Sun D., Zhu W., Wang J., Zhuang X., Lu Y. Formic acid induces Yca1p-independent apoptosis-like cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // FEMS yeast research. – 2008. – T. 8. – №. 4. – C. 531-539.
96. Dunlap C. E., Chiang L. C. Cellulose degradation-a common link. // In Utilization and recycle of agricultural wastes and residues, editor, Michael L. Shuler. – 1980.
97. Durbin R., Eddy S. R., Krogh A., Mitchison G. Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids. // Cambridge university press. – 1998. – C.356.
98. Dürre P. Fermentative production of butanol—the academic perspective. // Current opinion in biotechnology. – 2011. – T. 22. – №. 3. – C. 331-336.
99. Dürre P. Biobutanol: an attractive biofuel. // Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology. – 2007. – T. 2. – №. 12. – C. 1525-1534.
100. Dürre P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. // Applied microbiology and biotechnology. – 1998. – T. 49. – №. 6. – C. 639-648.
101. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stakenbrandt E. (ed.). The prokaryotes: vol. 4: bacteria: firmicutes, cyanobacteria. // Springer Science & Business Media – 2006. – C. 1140.
102. Eleazer W. E., Odle W. S., Wang Y. S., Barlaz M. A. Biodegradability of municipal solid waste components in laboratory-scale landfills. // Environmental Science & Technology. – 1997. – T. 31. – №. 3. – C. 911-917.
103. Ellis L. D., Holwerda E. K., Hogsett D., Rogers S., Shao X., Tschaplinski T., Thorne P., Lynd L. R. Closing the carbon balance for fermentation by *Clostridium thermocellum* (ATCC 27405). // Bioresource technology. – 2012. – T. 103. – №. 1. – C. 293-299.
104. Excoffier G., Toussaint B., Vignon M. R. Saccharification of steam-exploded poplar wood. // Biotechnology and bioengineering. – 1991. – T. 38. – №. 11. – C. 1308-1317.
105. Ezeji T. C., Qureshi N., Blaschek H. P. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2003. – T. 19. – №. 6. – C. 595-603.
106. Ezekoye V. A., Okeke C. E. Design, construction, and performance evaluation of plastic biodigester and the storage of biogas. // The Pacific Journal of Science and Technology. – 2006. – T. 7. – №. 2. – C. 176-184.
107. Ezeonu F. C., Okaka A. N. C. Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (BSG). // Process Biochemistry. – 1996. – T. 31. – №. 1. – C. 7-12.
108. Faaij A. Modern biomass conversion technologies. // Mitigation and adaptation strategies for global change. – 2006. – T. 11. – №. 2. – C. 343-375.
109. Fadrosch D. W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R. M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. // Microbiome. – 2014. – T. 2. – №. 1. – C. 6.
110. Fan L. T., Gharapuray M. M., Lee Y. H. Cellulose Hydrolysis. // Biotechnology Monographs. – Berlin: Springer. – 1987. – T. 3.
111. Fargione J., Hill J., Tilman D., Polasky S., Hawthorne P. Land clearing and the biofuel carbon debt. // Science. – 2008. – T. 319. – №. 5867. – C. 1235-1238.
112. Ferry J. G. Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. // Current opinion in biotechnology. – 2011. – T. 22. – №. 3. – C. 351-357.
113. Fond O., Petitdemange E., Petitdemange H., Gay R. Effect of glucose flow on the acetone butanol fermentation in fed batch culture. // Biotechnology letters. – 1984. – T. 6. – №. 1. – C. 13-18.
114. Foster B. L., Dale B. E., Doran-Peterson J. B. Enzymatic hydrolysis of ammonia-treated sugar beet pulp. // Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. – Humana Press, Totowa, NJ. – 2001. – C. 269-282.
115. Freier D., Mothershed C. P., Wiegel J. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – T. 54. – №. 1. – C. 204-211.

116. Friedl A., Qureshi N., Maddox I. S. Continuous acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* in a packed bed reactor and integration with product removal by pervaporation. // *Biotechnology and bioengineering*. – 1991. – T. 38. – №. 5. – C. 518-527.
117. Garcia III A., Iannotti E. L., Fischer J. L. Butanol fermentation liquor production and separation by reverse osmosis. // *Biotechnology and bioengineering*. – 1986. – T. 28. – №. 6. – C. 785-791.
118. García V., Pääkilä J., Ojamo H., Muurinen E., Keiski R. L. Challenges in biobutanol production: how to improve the efficiency? // *Renewable and sustainable energy reviews*. – 2011. – T. 15. – №. 2. – C. 964-980.
119. Garcia-Ruiz E., Mate D. M., Gonzalez-Perez D., Molina-Espeja P., Camarero S., Martínez A. T., Ballesteros O., Alcalde M. Directed evolution of ligninolytic oxidoreductases: from functional expression to stabilization and beyond. // *Cascade biocatalysis*. – 2014. – C. 1-22.
120. Gassanova L. G., Netrusov A. I., Teplyakov V. V., Modigell M. Fuel gases from organic wastes using membrane bioreactors. // *Desalination*. – 2006. – T. 198. – №. 1-3. – C. 56-66.
121. George S. P., Ahmad A., Rao M. B. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability. // *Bioresource Technology*. – 2001. – T. 78. – №. 3. – C. 221-224.
122. Gerwig G. J., Kamerling J. P., Vliegthart J. F., Morag E., Lamed R., Bayer E. A. The nature of the carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from the cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens*. // *Journal of biological chemistry*. – 1993. – T. 268. – №. 36. – C. 26956-26960.
123. Gholizadeh L. Enhanced butanol production by free and immobilized *Clostridium* sp. cells using butyric acid as co-substrate. // Master thesis. University of Boras. – 2010.
124. Goberna M., Insam H., Franke-Whittle I. H. Effect of biowaste sludge maturation on the diversity of thermophilic bacteria and archaea in an anaerobic reactor. // *Applied and environmental microbiology*. – 2009. – T. 75. – №. 8. – C. 2566-2572.
125. Gottschal J. C., Morris J. G. The induction of acetone and butanol production in cultures of *Clostridium acetobutylicum* by elevated concentrations of acetate and butyrate. // *FEMS Microbiology Letters*. – 1981. – T. 12. – №. 4. – C. 385-389.
126. Gottwald M., Gottschalk G. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. // *Archives of Microbiology*. – 1985. – T. 143. – №. 1. – C. 42-46.
127. Green E. M. Fermentative production of butanol—the industrial perspective. // *Current opinion in biotechnology*. – 2011. – T. 22. – №. 3. – C. 337-343.
128. Grimalt-Aleman A., Łężyk M., Lange L., Skiadas I. V., Gavala H. N. Enrichment of syngas-converting mixed microbial consortia for ethanol production and thermodynamics-based design of enrichment strategies. // *Biotechnology for biofuels*. – 2018. – T. 11. – №. 1. – C. 198.
129. Guerfali M., Saidi A., Gargouri A., Belghith H. Enhanced enzymatic hydrolysis of waste paper for ethanol production using separate saccharification and fermentation. // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2015. – T. 175. – №. 1. – C. 25-42.
130. Gunnarson S., Malmberg A., Mathisen B., Theander O., Thyselius L., Wünsche U. Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for biogas production. // *Biomass*. – 1985. – T. 7. – №. 2. – C. 85-97.
131. Gunnarsson I. B., Svensson S. E., Johansson E., Karakashev D., Angelidaki I. Potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a biorefinery crop. // *Industrial Crops and Products*. – 2014. – T. 56. – C. 231-240.
132. Gutierrez N. A., Maddox I. S., Schuster K. C., Swoboda H., Gapes J. R. Strain comparison and medium preparation for the acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation process using a substrate of potato. // *Bioresource Technology*. – 1998. – T. 66. – №. 3. – C. 263-265.

133. Ha S. H., Mai N. L., An G., Koo Y. M. Microwave-assisted pretreatment of cellulose in ionic liquid for accelerated enzymatic hydrolysis. // *Bioresource technology*. – 2011. – T. 102. – №. 2. – C. 1214-1219.
134. Hackstein J.H.P. Endosymbiotic methanogenic archaea. // Springer, Germany. – 2010. – C. 252.
135. Haichar F., Achouak W., Christen R., Heulin T., Marol C., Marais M. F., Mougel C., Ranjard L., Balesdent J., Berge O. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. // *Environmental Microbiology*. – 2007. – T. 9. – №. 3. – C. 625-634.
136. Haruta S., Cui Z., Huang Z., Li M., Ishii M., Igarashi Y. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2002. – T. 59. – №. 4-5. – C. 529-534.
137. Hatakka A. Biodegradation of lignin. // In Alexander S. (ed.), *Biopolymers Online*. – Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. – 2005. – T. 1.
138. Hattori S. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. // *Microbes and Environments*. – 2008. – T. 23. – №. 2. – C. 118-127.
139. He Q., Hemme C. L., Jiang H., He Z., Zhou J. Mechanisms of enhanced cellulosic bioethanol fermentation by co-cultivation of *Clostridium* and *Thermoanaerobacter* spp. // *Bioresource technology*. – 2011. – T. 102. – №. 20. – C. 9586-9592.
140. Heinze T., Schwikal K., Barthel S. Ionic liquids as reaction medium in cellulose functionalization. // *Macromolecular bioscience*. – 2005. – T. 5. – №. 6. – C. 520-525.
141. Heitz M., Capek-Menard E., Koeberle P. G., Gagne J., Chornet E. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. // *Bioresource Technology*. – 1991. – T. 35. – №. 1. – C. 23-32.
142. Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C., Schülein, M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. // *Nature Biotechnology*. – 1985. – T. 3. – №. 8. – C. 722.
143. Hespell R. B., Wolf R., Bothast R. J. Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. // *Applied and environmental microbiology*. – 1987. – T. 53. – №. 12. – C. 2849-2853.
144. Higashide W., Li Y., Yang Y., Liao J. C. Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for production of isobutanol from cellulose. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – T. 77. – №. 8. – C. 2727-2733.
145. Hipolito, C. N., Crabbe, E., Badillo, C. M., Zarrabal, O. C., Mora, M. A. M., Flores, G. P., Cortazar M.H., Ishizaki, A. Bioconversion of industrial wastewater from palm oil processing to butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). // *Journal of Cleaner Production*. – 2008. – T. 16. – №. 5. – C. 632-638.
146. Ho D. P., Ngo H. H., Guo W. A mini review on renewable sources for biofuel. // *Bioresource technology*. – 2014. – T. 169. – C. 742-749.
147. Holwerda E. K., Thorne P. G., Olson D. G., Amador-Noguez D., Engle N. L., Tschaplinski T. J., Van Dijken J.P., Lynd L. R. The exometabolome of *Clostridium thermocellum* reveals overflow metabolism at high cellulose loading. // *Biotechnology for biofuels*. – 2014. – T. 7. – №. 1. – C. 155.
148. Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K. L., Pace N. R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. // *Journal of bacteriology*. – 1998. – T. 180. – №. 2. – C. 366-376.
149. Illumina® [Электронный ресурс] / Illumina Inc. // Дата обновления: 2019. URL: <http://www.illumina.com>.
150. Ishizaki A., Michiwaki S., Crabbe E., Kobayashi G., Sonomoto K., Yoshino S. Extractive acetone-butanol-ethanol fermentation using methylated crude palm oil as extractant in batch culture of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 1999. – T. 87. – №. 3. – C. 352-356.

151. Janusz G., Pawlik A., Sulej J., Świdarska-Burek U., Jarosz-Wilkolazka A., Paszczyński A. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. // FEMS microbiology reviews. – 2017. – T. 41. – №. 6. – C. 941-962.
152. Jesse T. W., Ezeji T. C., Qureshi N., Blaschek H. P. Production of butanol from starch-based waste packing peanuts and agricultural waste. // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2002. – T. 29. – №. 3. – C. 117-123.
153. Jiang Y., Guo D., Lu J., Dürre P., Dong W., Yan W., Zhang W., Ma J., Jiang M., Xin F. Consolidated bioprocessing of butanol production from xylan by a thermophilic and butanogenic *Thermoanaerobacterium* sp. M5. // Biotechnology for biofuels. – 2018. – T. 11. – №. 1. – C. 89.
154. Johansson D. J. A., Azar C. A scenario based analysis of land competition between food and bioenergy production in the US. // Climatic Change. – 2007. – T. 82. – №. 3-4. – C. 267-291.
155. Johnson J. L., Francis B. S. Taxonomy of the clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. // Microbiology. – 1975. – T. 88. – №. 2. – C. 229-244.
156. Johnson E. A., Madia A., Demain A. L. Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*. // Applied and Environmental Microbiology. – 1981. – T. 41. – №. 4. – C. 1060.
157. Jones D. T., Keis S. Origins and relationships of industrial solvent-producing clostridial strains. // FEMS microbiology reviews. – 1995. – T. 17. – №. 3. – C. 223-232.
158. Jones T., Vandecasteele J. P. Petroleum Microbiology. // Editions OPHRYS, 2008.
159. Jones D. T., Woods D. R. Acetone-butanol fermentation revisited. // Microbiological reviews. – 1986. – T. 50. – №. 4. – C. 484.
160. Kallistova A. Y., Goel G., Nozhevnikova A. N. Microbial diversity of methanogenic communities in the systems for anaerobic treatment of organic waste. // Microbiology. – 2014. – T. 83. – №. 5. – C. 462-483.
161. Kamiński W., Tomczak E., Gorak A. Biobutanol-production and purification methods. // Ecological chemistry and engineering S. – 2011. – T. 18. – №. 1. – C. 31 - 37.
162. Keller F. A., Hamilton J. E., Nguyen Q. A. Microbial pretreatment of biomass. // Biotechnology for Fuels and Chemicals. – Humana Press, Totowa, NJ, 2003. – C. 27-41.
163. Kerem Z., Friesem D., Hadar Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. // Applied and environmental microbiology. – 1992. – T. 58. – №. 4. – C. 1121-1127.
164. Khasin A., Alchanati I., Shoham Y. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. // Applied and Environmental Microbiology. – 1993. – T. 59. – №. 6. – C. 1725-1730.
165. Kilburn D. G., Assouline Z., Din N., Gilkes N. R., Ong E., Tomme P., Warren R.A.J. *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases. // Eds. P.Suominen, T.Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation. Helsinki.– 1993. – C. 281.
166. Kirk T. K., Cullen D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. // In: Young RA, Akhtar M (eds). Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Wiley, New York. – 1998. – C. 273-307.
167. Kitchaiya P., Intanakul P., Krairiksh M. Enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic wastes by microwave pretreatment under atmospheric pressure. // Journal of wood chemistry and technology. – 2003. – T. 23. – №. 2. – C. 217-225.
168. Kiyoshi K., Furukawa M., Seyama T., Kadokura T., Nakazato A., Nakayama S. Butanol production from alkali-pretreated rice straw by co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. // Bioresource technology. – 2015. – T. 186. – C. 325-328.
169. Koeck D. E., Maus I., Wibberg D., Winkler A., Zverlov V. V., Liebl W., Pühler A., Schwarz W. H., Schlüter A. Draft genome sequence of *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55T, a new thermophilic cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. // Journal of biotechnology. – 2015. – T. 214. – C. 59-60.

170. Koeck D. E., Wibberg D., Maus I., Winkler A., Albersmeier A., Zverlov V. V., Liebl W., Pühler A., Schwarz W. H., Schlüter A. Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosi* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. // *Journal of biotechnology*. – 2014. – T. 188. – C. 136-137.
171. Kopečný J., Hodrova B. The effect of yellow affinity substance on cellulases of *Ruminococcus flavefaciens*. // *Letters in applied microbiology*. – 1997. – T. 25. – №. 3. – C. 191-196.
172. Köpke M., Dürre P. Biochemical production of biobutanol. // *Handbook of Biofuels Production*. – Woodhead Publishing, 2011. – C. 221-257.
173. Kovács K., Willson B.J., Schwarz K., Heap J.T., Jackson A., Bolam D.N., Winzer K., Minton N.P. Secretion and assembly of functional mini-cellulosomes from synthetic chromosomal operons in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. // *Biotechnology for biofuels*. – 2013. – T. 6. – №. 1. – C. 117.
174. Kraulis P. J., Clore G. M., Nilges M., Jones T. A., Pettersson G., Knowles J., Gronenborn A. M. Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. // *Biochemistry*. – 1989. – T. 28. – №. 18. – C. 7241-7257.
175. Kubicek C. P. Release of carboxymethyl-cellulase and β -glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*. // *European journal of applied microbiology and biotechnology*. – 1981. – T. 13. – №. 4. – C. 226-231.
176. Kublanov, I. V., Perevalova, A. A., Slobodkina, G. B., Lebedinsky, A. V., Bidzhieva, S. K., Kolganova, T. V., Kaliberda E.N., Rumsh L.D., Haertlé T., Bonch-Osmolovskaya, E. A. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). // *Applied and environmental microbiology*. – 2009. – T. 75. – №. 1. – C. 286-291.
177. Kujawska A., Kujawski J., Bryjak M., Kujawski W. ABE fermentation products recovery methods—a review. // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2015. – T. 48. – C. 648-661.
178. Kumar M., Gayen K. Developments in biobutanol production: new insights. // *Applied Energy*. – 2011. – T. 88. – №. 6. – C. 1999-2012.
179. Kumar A. K., Parikh B. S. Cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus terreus* D34 and enzymatic saccharification of mild-alkali and dilute-acid pretreated lignocellulosic biomass residues. // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2015. – T. 2. – №. 1. – C. 7.
180. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. // *Molecular biology and evolution*. – 2018. – T. 35. – №. 6. – C. 1547-1549.
181. Kuo C. H., Lee C. K. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by N-methylmorpholine-N-oxide pretreatment. // *Bioresource Technology*. – 2009. – T. 100. – №. 2. – C. 866-871.
182. Lakshmi A. S., Narasimha G. Production of cellulases by fungal cultures isolated from forest litter soil. // *Annals of forest research*. – 2012. – T. 55. – №. 1. – C. 85-92.
183. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing. // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. – 1991. – C. 115-175.
184. Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1985. – T. 82. – №. 20. – C. 6955-6959.
185. Lee J. W., Gwak K. S., Park J. Y., Park M. J., Choi D. H., Kwon M., Choi I. G. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. // *The Journal of Microbiology*. – 2007. – T. 45. – №. 6. – C. 485-491.

186. Levén L., Eriksson A. R. B., Schnürer A. Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. // FEMS microbiology ecology. – 2007. – T. 59. – №. 3. – C. 683-693.
187. Li Y., Khanal S. K. Bioenergy: Principle and Application. // John Wiley & Sons, Inc. – 2017. – C. 338-360.
188. Li L., Li L., Wang Y., Du Y., Qin S. Biorefinery products from the inulin-containing crop Jerusalem artichoke. // Biotechnology letters. – 2013. – T. 35. – №. 4. – C. 471-477.
189. Li Y., Tschaplinski T. J., Engle N. L., Hamilton C. Y., Rodriguez M., Liao J. C., Schadt C.W., Guss A.M., Yang Y., Graham, D. E. Combined inactivation of the *Clostridium cellulolyticum* lactate and malate dehydrogenase genes substantially increases ethanol yield from cellulose and switchgrass fermentations. // Biotechnology for biofuels. – 2012. – T. 5. – №. 1. – C. 2.
190. Li S. B., Qian Y., Liang Z. W., Guo Y., Zhao M. M., Pang Z. W. Enhanced butanol production from cassava with *Clostridium acetobutylicum* by genome shuffling. // World journal of Microbiology and Biotechnology. – 2016. – T. 32. – №. 4. – C. 53.
191. Li T., Zhang C., Yang K. L., He J. Unique genetic cassettes in a *Thermoanaerobacterium* contribute to simultaneous conversion of cellulose and monosugars into butanol. // Science advances. – 2018. – T. 4. – №. 3. – C. e1701475.
192. Lienhardt J., Schripsema J., Qureshi N., Blaschek H. P. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 in an immobilized cell biofilm reactor. // Applied biochemistry and biotechnology. – 2002. – T. 98. – №. 1-9. – C. 591-598.
193. Ljungdahl L. G., Pettersson B., Eriksson K. E., Wiegel J. A yellow affinity substance involved in the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum*. // Current Microbiology. – 1983. – T. 9. – №. 4. – C. 195-199.
194. Lin X., Wu J., Fan J., Qian W., Zhou X., Qian C., Jin X., Wang L., Bai J., Ying H. Adsorption of butanol from aqueous solution onto a new type of macroporous adsorption resin: studies of adsorption isotherms and kinetics simulation. // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2012. – T. 87. – №. 7. – C. 924-931.
195. Liu D., Chen Y., Ding F.Y., Zhao T., Wu J.L., Guo T., Ren H.F., Li B.B., Niu H.Q., Cao Z., Lin X.Q., Xie J.J., He X.J., Ying H.J. Biobutanol production in a *Clostridium acetobutylicum* biofilm reactor integrated with simultaneous product recovery by adsorption. // Biotechnology for biofuels. – 2014. – T. 7. – №. 1. – C. 5.
196. Liu Y. Taxonomy of Methanogens. // In Handbook of hydrocarbon and lipid Microbiology, Ed. Timmis K.N. – Berlin: Springer. – 2010. – C. 549-558.
197. Ljungdahl L. G. The Cellulase/Hemicellulase System of the Anaerobic Fungus *Orpinomyces* PC-2 and Aspects of Its Applied Use. // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2008. – T. 1125. – №. 1. – C. 308-321.
198. López-Contreras A. M., Martens A. A., Szijarto N., Mooibroek H., Claassen P. A., van der Oost J., de Vos W. M. Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 of CelG, a cellulosomal glycoside hydrolase belonging to family 9. // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – T. 69. – №. 2. – C. 869-877.
199. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // Journal of biological chemistry. – 1951. – T. 193. – №. 1. – C. 265-275.
200. Luo H., Ge L., Zhang J., Zhao Y., Ding J., Li Z., He Z., Chen R., Shi, Z. Enhancing butanol production under the stress environments of co-culturing *Clostridium acetobutylicum*/*Saccharomyces cerevisiae* integrated with exogenous butyrate addition. // PloS one. – 2015. – T. 10. – №. 10. – C. e0141160.
201. Lynd L. R., Van Zyl W. H., McBride J. E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. // Current opinion in biotechnology. – 2005. – T. 16. – №. 5. – C. 577-583.

202. Lynd L. R., Weimer P. J., Van Zyl W. H., Pretorius I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. // Microbiology and molecular biology reviews. – 2002. – T. 66. – №. 3. – C. 506-577.
203. Lynd L. R., Wyman C. E., Gerngross T. U. Biocommodity engineering. // Biotechnology progress. – 1999. – T. 15. – №. 5. – C. 777-793.
204. Lv W., Yu Z. Isolation and characterization of two thermophilic cellulolytic strains of *Clostridium thermocellum* from a compost sample. // Journal of applied microbiology. – 2013. – T. 114. – №. 4. – C. 1001-1007.
205. Maddox I. S., Steiner E., Hirsch S., Wessner S., Gutierrez N. A., Gapes J. R., Schuster K. C. The Cause of " Acid Crash" and " Acidogenic Fermentations" During the Batch Acetone-Butanol-Ethanol (ABE-) Fermentation Process. // Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2000. – T. 2. – №. 1. – C. 95-100.
206. Malakhova D. V., Egorova M. A., Prokudina L. I., Netrusov A. I., Tsavkelova E. A. The biotransformation of brewer's spent grain into biogas by anaerobic microbial communities. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2015. – T. 31. – №. 12.
207. Mandels M., Reese E. T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. // Journal of Bacteriology. – 1957. – T. 73. – №. 2. – C. 269.
208. Manzoor S., Bongcam-Rudloff E., Schnürer A., Müller B. First genome sequence of a syntrophic acetate-oxidizing bacterium, *Tepidanaerobacter acetatoxydans* strain Re1. // Genome announcements. – 2013. – T. 1. – №. 1. – C. e00213-12.
209. Marchesi J. R., Sato T., Weightman A. J., Martin T. A., Fry J. C., Hiom S. J., Wade W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. // Applied and environmental microbiology. – 1998. – T. 64. – №. 2. – C. 795-799.
210. Marchessault R. H., Howsmon J. A. Experimental evaluation of the lateral-order distribution in cellulose. // Textile Research Journal. – 1957. – T. 27. – №. 1. – C. 30-41.
211. Marchessault R. H., Sundararajan P. R. The polysaccharides. Chapter: Cellulose. // Academic Press, Inc. – New York. – 1993. – vol. 2. – p. 11-95.
212. Martinot E., Dienst C., Weiliang L., Qimin C. Renewable energy futures: Targets, scenarios, and pathways. // Annual Review of Environment and Resources. – 2007. – T. 32.
213. Matkar K., Chapla D., Divecha J., Nighojkar A., Madamwar D. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – T. 78. – C. 24-33.
214. Maus I., Koeck D. E., Cibis K. G., Hahnke S., Kim Y. S., Langer T., Kreubel J., Erhard M., Bremges A., Off S., Stolze Y., Jaenick S., Goesmann A., Sczyrba A., Scherer P., König H., Schwarz W. H., Zverlov V. V., Liebl W., Pühler A., Schlüter A., Klocke M. Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. // Biotechnology for biofuels. – 2016. – T. 9. – №. 1. – C. 171.
215. Mbaneme-Smith V., Chinn M. S. Consolidated bioprocessing for biofuel production: recent advances. // Energy and Emission Control Technologies. – 2015. – T. 3. – C. 23.
216. McCutchen C. M., Duffaud G. D., Leduc P., Petersen A. R., Tayal A., Khan S. A., Kelly R.M. Characterization of extremely thermostable enzymatic breakers (α -1, 6-galactosidase and β -1, 4-mannanase) from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* 5068 for hydrolysis of guar gum. // Biotechnology and Bioengineering. – 1996. – T. 52. – №. 2. – C. 332-339.
217. Medve J., Ståhlberg J., Tjerneld F. Adsorption and synergism of cellobiohydrolase I and II of *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. // Biotechnology and bioengineering. – 1994. – T. 44. – №. 9. – C. 1064-1073.
218. Meneses N. G., Martins S., Teixeira J. A., Mussatto S. I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. // Separation and Purification Technology. – 2013. – T. 108. – C. 152-158.

219. Menon V., Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. // Progress in Energy and Combustion Science. – 2012. – T. 38. – №. 4. – C. 522-550.
220. Merkel A.Y., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Tarnovetskii I.Yu., Frolov E.N., Dubin A.V., Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs. // Extremophiles. – 2016. – T. 21. – №. 2. – C. 307-317.
221. Mes-Hartree M., Dale B. E., Craig W. K. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1988. – T. 29. – №. 5. – C. 462-468.
222. Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. // Analytical chemistry. – 1959. – T. 31. – №. 3. – C. 426-428.
223. Minton N. P., Clarke D. J. (ed.). // Clostridia. – Springer Science & Business Media. – 2013. – T. 3.
224. Montingelli M. E., Tedesco S., Olabi A. G. Biogas production from algal biomass: a review. // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2015. – T. 43. – C. 961-972.
225. Moreira A. R., Ulmer D. C., Linden J. C. Butanol toxicity in the butylic fermentation. // Biotechnology Bioengineering Symposium;(United States). – Colorado State Univ., Fort Collins, 1981. – T. 11.
226. Moset V., Poulsen M., Wahid R., Højberg O., Møller H. B. Mesophilic versus thermophilic anaerobic digestion of cattle manure: methane productivity and microbial ecology. // Microbial biotechnology. – 2015. – T. 8. – №. 5. – C. 787-800.
227. Moussa T. A. A., Tharwat N. A. Optimization of cellulase and β -glucosidase induction by sugarbeet pathogen *Sclerotium rolfsii*. // African Journal of Biotechnology. – 2007. – T. 6. – №. 8.
228. Mshandete A., Björnsson L., Kivaisi A. K., Rubindamayugi S. T., Mattiasson B. Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment. // Water Research. – 2005. – T. 39. – №. 8. – C. 1569-1575.
229. Mussatto S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2014. – T. 94. – №. 7. – C. 1264-1275.
230. Mussatto S. I., Roberto I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. // Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology. – 2006. – T. 81. – №. 3. – C. 268-274.
231. Muthangya M., Manoni Mshandete A., Kajumulo Kivaisi A. Two-stage fungal pre-treatment for improved biogas production from sisal leaf decortication residues. // International journal of molecular sciences. – 2009. – T. 10. – №. 11. – C. 4805-4815.
232. Muyzer G., Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – T. 73. – №. 1. – C. 127-141.
233. Naik S. N., Goud V. V., Rout P. K., Dalai A. K. Production of first and second-generation biofuels: a comprehensive review. // Renewable and sustainable energy reviews. – 2010. – T. 14. – №. 2. – C. 578-597.
234. Nakayama S., Kiyoshi K., Kadokura T., Nakazato A. Butanol production from crystalline cellulose by cocultured *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – T. 77. – №. 18. – C. 6470-6475.
235. Nakayama S. I., Kosaka T., Hirakawa H., Matsuura K., Yoshino S., Furukawa K. Metabolic engineering for solvent productivity by downregulation of the hydrogenase gene cluster hupCBA in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. // Applied microbiology and biotechnology. – 2008. – T. 78. – №. 3. – C. 483-493.
236. NCBI National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс] / U.S. National Library of Medicine // Дата обновления: 2019. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

237. Ni Y., Sun Z. Recent progress on industrial fermentative production of acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. // Applied microbiology and biotechnology. – 2009. – T. 83. – №. 3. – C. 415.
238. Ni Y., Wang Y., Sun Z. Butanol production from cane molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: batch and semicontinuous fermentation. // Applied biochemistry and biotechnology. – 2012. – T. 166. – №. 8. – C. 1896-1907.
239. Nidetzky B., Steiner W., Hayn M., Claeysens M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. // Biochemical Journal. – 1994. – T. 298. – №. 3. – C. 705-710.
240. Nimcevic D., Schuster M., Gapes J. R. Solvent production by *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 growing on different potato media. // Applied microbiology and biotechnology. – 1998. – T. 50. – №. 4. – C. 426-428.
241. Nobles D. R., Romanovicz D. K., Brown R. M. Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? // Plant physiology. – 2001. – T. 127. – №. 2. – C. 529-542.
242. Nölling J., Breton G., Omelchenko M.V., Makarova K.S., Zeng Q., Gibson R., Lee H.M., Dubois J., Qiu D., Hitti J., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Sabathe F., Doucette-Stamm L., Soucaille P., Daly M.J., Bennett G.N., Koonin E.V., Smith D.R. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. // Journal of bacteriology. – 2001. – T. 183. – №. 16. – C. 4823-4838.
243. O'Sullivan C. A., Burrell P. C., Clarke W. P., Blackall L. L. Comparison of cellulose solubilisation rates in rumen and landfill leachate inoculated reactors. // Bioresource technology. – 2006. – T. 97. – №. 18. – C. 2356-2363.
244. Okeke B. C., Lu J. Characterization of a defined cellulolytic and xylanolytic bacterial consortium for bioprocessing of cellulose and hemicelluloses. // Applied biochemistry and biotechnology. – 2011. – T. 163. – №. 7. – C. 869-881.
245. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Ugene Team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. // Bioinformatics. – 2012. – T. 28. – №. 8. – C. 1166-1167.
246. Olofsson K., Bertilsson M., Lidén G. A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. // Biotechnology for biofuels. – 2008. – T. 1. – №. 1. – C. 7-20.
247. Olson D. G., McBride J. E., Shaw A. J., Lynd L. R. Recent progress in consolidated bioprocessing. // Current opinion in biotechnology. – 2012. – T. 23. – №. 3. – C. 396-405.
248. Owens J. M., Chynoweth D. P. Biochemical methane potential of municipal solid waste (MSW) components. // Water science and technology. – 1993. – T. 27. – №. 2. – C. 1-14.
249. Padmavathi T., Nandy V., Agarwal P. Optimization of the medium for the production of cellulases by *Aspergillus terreus* and *Mucor plumbeus*. // European Journal of Experimental Biology. – 2012. – T. 2. – №. 4. – C. 1161-1170.
250. Pagès S., Bélaïch A., Bélaïch J. P., Morag E., Lamed R., Shoham Y., Bayer E. A. Species-specificity of the cohesin-dockerin interaction between *Clostridium thermocellum* and *Clostridium cellulolyticum*: prediction of specificity determinants of the dockerin domain. // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 1997. – T. 29. – №. 4. – C. 517-527.
251. Patakova P., Linhova M., Rychtera M., Paulova L., Melzoch K. Novel and neglected issues of acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by clostridia: *Clostridium* metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. // Biotechnology advances. – 2013. – T. 31. – №. 1. – C. 58-67.
252. Patel G. B., Khan A. W., Agnew B. J., Colvin J. R. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic microorganism, *Acetivibrio cellulolyticus* gen. nov., sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1980. – T. 30. – №. 1. – C. 179-185.
253. Pauly M., Keegstra K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. // The Plant Journal. – 2008. – T. 54. – №. 4. – C. 559-568.

254. Pei J., Pang Q., Zhao L., Fan S., Shi H. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. // Biotechnology for biofuels. – 2012. – T. 5. – №. 1. – C. 31.
255. Peitersen N. Production of cellulase and protein from barley straw by *Trichoderma viride*. // Biotechnology and Bioengineering. – 1975. – T. 17. – №. 3. – C. 361-374.
256. Pérez J., Munoz-Dorado J., de la Rubia T. D. L. R., Martinez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. // International microbiology. – 2002. – T. 5. – №. 2. – C. 53-63.
257. Plaza A., Merlet G., Hasanoglu A., Isaacs M., Sanchez J., Romero J. Separation of butanol from ABE mixtures by sweep gas pervaporation using a supported gelled ionic liquid membrane: Analysis of transport phenomena and selectivity. // Journal of membrane science. – 2013. – T. 444. – C. 201-212.
258. Podosokorskaya O. A., Bonch-Osmolovskaya E. A., Beskorovaynny A. V., Toshchakov S. V., Kolganova T. V., Kublanov I. V. *Mobilitalea sibirica* gen. nov., sp. nov., a halotolerant polysaccharide-degrading bacterium. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2014. – T. 64. – №. 8. – C. 2657-2661.
259. Podosokorskaya O. A., Merkel A. Y., Kolganova T. V., Chernyh N. A., Miroshnichenko M. L., Bonch-Osmolovskaya E. A., Kublanov I. V. *Fervidobacterium riparium* sp. nov., a thermophilic anaerobic cellulolytic bacterium isolated from a hot spring. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2011. – T. 61. – №. 11. – C. 2697-2701.
260. Pommier S., Llamas A. M., Lefebvre X. Analysis of the outcome of shredding pretreatment on the anaerobic biodegradability of paper and cardboard materials. // Bioresource technology. – 2010. – T. 101. – №. 2. – C. 463-468.
261. Prazmowski A. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien. // Arten. Inaug. Diss. Hugo Voigt, Leipzig. – 1880. – C. 1-58.
262. Qu X., Vavilin V. A., Mazéas L., Lemunier M., Duquennoi C., He P. J., Bouchez T. Anaerobic biodegradation of cellulosic material: Batch experiments and modelling based on isotopic data and focusing on aceticlastic and non-aceticlastic methanogenesis. // Waste Management. – 2009. – T. 29. – №. 6. – C. 1828-1837.
263. Qureshi N. Agricultural residues and energy crops as potentially economical and novel substrates for microbial production of butanol (a biofuel). // Plant Sci. Rev. – 2010. – T. 249.
264. Qureshi N., Blaschek H. P. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. // Renewable Energy. – 2001. – T. 22. – №. 4. – C. 557-564.
265. Qureshi N., Saha B. C., Hector R. E., Hughes S. R., Cotta M. A. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I—Batch fermentation. // Biomass and bioenergy. – 2008. – T. 32. – №. 2. – C. 168-175.
266. Ramanathan G., Banupriya S., Abirami D. Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. // J. of Scientific & Industrial Research. – 2010. – T. 69. – C. 454-459.
267. Ranjan A., Moholkar V. S. Comparative study of various pretreatment techniques for rice straw saccharification for the production of alcoholic biofuels. // Fuel. – 2013. – T. 112. – C. 567-571.
268. Raskin L., Stromley J. M., Rittmann B. E., Stahl D. A. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. // Applied and environmental microbiology. – 1994. – T. 60. – №. 4. – C. 1232-1240.
269. Riedel K., Bronnenmeier K. Intramolecular synergism in an engineered exo-endo-1, 4- β -glucanase fusion protein. // Molecular microbiology. – 1998. – T. 28. – №. 4. – C. 767-775.
270. Robles G., Nair R. B., Kleinstaub S., Nikolausz M., Horváth I. S. Biogas Production: Microbiological Aspects. // Biogas. – Springer, Cham, 2018. – C. 163-198.
271. Rogers P., Gottschalk G. Biochemistry and regulation of acid and solvent production in clostridia. // Biotechnology Series. – 1993. – C. 25-25.

272. Ryu S., Karim M. N. A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2011. – T. 91. – №. 3. – C. 529-542.
273. Sabathé F., Bélaïch A., Soucaille P. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. // *FEMS microbiology letters*. – 2002. – T. 217. – №. 1. – C. 15-22.
274. Saddler J. N., Chan M. K. H. Optimization of *Clostridium thermocellum* growth on cellulose and pretreated wood substrates. // *European journal of applied microbiology and biotechnology*. – 1982. – T. 16. – №. 2-3. – C. 99-104.
275. Sagar A. D., Kartha S. Bioenergy and sustainable development? // *Annu. Rev. Environ. Resour.* – 2007. – T. 32. – C. 131-167.
276. Saha B. C. Hemicellulose bioconversion. // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2003. – T. 30. – №. 5. – C. 279-291.
277. Sajith S., Priji P., Sreedevi S., Benjamin S. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. // *J Nutr Food Sci*. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 461.
278. Salimi F., Mahadevan R. Characterizing metabolic interactions in a clostridial co-culture for consolidated bioprocessing. // *BMC biotechnology*. – 2013. – T. 13. – №. 1. – C. 95.
279. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular cloning: A laboratory manual*, the third edition. – 2001.
280. Sasaki T., Tanaka T., Nanbu N., Sato Y., Kainuma K. Correlation between X-ray diffraction measurements of cellulose crystalline structure and the susceptibility to microbial cellulase. // *Biotechnology and bioengineering*. – 1979. – T. 21. – №. 6. – C. 1031-1042.
281. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 1997. – T. 61. – №. 2. – C. 262-280.
282. Schwarz W. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2001. – T. 56. – №. 5-6. – C. 634-649.
283. Scott F., Quintero J., Morales M., Conejeros R., Cardona C., Aroca G. Process design and sustainability in the production of bioethanol from lignocellulosic materials. // *Electronic journal of biotechnology*. – 2013. – T. 16. – №. 3. – C. 13-13.
284. Sebola R., Tesfagiorgis H., Muzenda E. Production of Biogas through Anaerobic Digestion of various Waste. // *Procced of Int Conf on Chemical, Integrated Waste Management & Environmental Engineering (ICCIWEE'2014)*, Johannesburg. – 2014.
285. Sehgal K. Current State and Future Prospects of Global Biogas Industry. // In: Tabatabaei M., Ghanavati H. (eds) *Biogas. Biofuel and Biorefinery Technologies* – Springer, Cham, 2018. – T. 6. – C. 449-472.
286. Selig M. J., Knoshaug E. P., Adney W. S., Himmel M. E., Decker S. R. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. // *Bioresource technology*. – 2008. – T. 99. – №. 11. – C. 4997-5005.
287. Shaw A. J., Hogsett D. A., Lynd L. R. Natural competence in *Thermoanaerobacter* and *Thermoanaerobacterium* species. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – T. 76. – №. 14. – C. 4713-4719.
288. Shi S., Si T., Liu Z., Zhang H., Ang E. L., Zhao H. Metabolic engineering of a synergistic pathway for n-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Scientific reports*. – 2016. – T. 6. – C. 25675.
289. Sieber J.R., McInerney M.J., Plugge C.M., Schink B., Gunsalus R.P. K. Degradation of long-chain fatty acids by sulfate-reducing and methanogenic communities. // In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, Ed. Timmis K.N. – Berlin: Springer. – 2010. – C. 338–350.
290. Silverstein R. A., Chen Y., Sharma-Shivappa R. R., Boyette M. D., Osborne J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. // *Bioresource technology*. – 2007. – T. 98. – №. 16. – C. 3000-3011.
291. Sinitsyn A. P., Osipov D. O., Rozhkova A. M., Bushina E. V., Dotsenko G. S., Sinitsyna O. A., Kondrat`eva E. G., Zorov I. N., Okunev O. N., Nemashkalov V. A., Koshelev A.V., Matys

- V. Y. The production of highly effective enzyme complexes of cellulases and hemicellulases based on the *Penicillium verruculosum* strain for the hydrolysis of plant raw materials. // Applied biochemistry and microbiology. – 2014. – T. 50. – №. 8. – C. 761-772.
292. Sizova M. V., Izquierdo J. A., Panikov N. S., Lynd L. R. Cellulose-and xylan-degrading thermophilic anaerobic bacteria from biocompost. // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – T. 77. – №. 7. – C. 2282-2291.
293. Skennerton C. T., Haroon M. F., Briegel A., Shi J., Jensen G. J., Tyson G. W., Orphan V. J. Phylogenomic analysis of Candidatus '*Izimaplasma*' species: free-living representatives from a *Tenericutes* clade found in methane seeps. // The ISME journal. – 2016. – T. 10. – №. 11. – C. 2679.
294. Song H., Clarke W. P. Cellulose hydrolysis by a methanogenic culture enriched from landfill waste in a semi-continuous reactor. // Bioresource technology. – 2009. – T. 100. – №. 3. – C. 1268-1273.
295. Srivastava N., Srivastava M., Mishra P. K., Gupta V. K., Molina G., Rodriguez-Couto S., Manikanta A., Ramteke P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2017.
296. Stackebrandt E., Kramer I., Swiderski J., Hippe H. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. // FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 1999. – T. 24. – №. 3. – C. 253-258.
297. Stahl D.A., Amann R. Development and application of nucleic acid probes. // In: E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. – John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK. – 1991. – C. 205–248.
298. Stams A. J. M. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. // Antonie van Leeuwenhoek. – 1994. – T. 66. – №. 1-3. – C. 271-294.
299. Stim-Herndon K. P., Petersen D. J., Bennett G. N. Characterization of an acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase) gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. // Gene. – 1995. – T. 154. – №. 1. – C. 81-85.
300. Stojceska V., Ainsworth P., Plunkett A., İbanoğlu E., İbanoğlu Ş. Cauliflower by-products as a new source of dietary fibre, antioxidants and proteins in cereal based ready-to-eat expanded snacks. // Journal of Food Engineering. – 2008. – T. 87. – №. 4. – C. 554-563.
301. Stone B. Cellulose: Structure and distribution //e LS. – 2005.
302. Stone J. E., Scallan A. M., Donefer E., Ahlgren E. Digestibility as a simple function of a molecule of similar size to a cellulase enzyme. // Advances in Chemistry Series. – 1969. – №. 95. – C. 219.
303. Swana J., Yang Y., Behnam M., Thompson R. An analysis of net energy production and feedstock availability for biobutanol and bioethanol. // Bioresource technology. – 2011. – T. 102. – №. 2. – C. 2112-2117.
304. Sullivan L., Bennett G. N. Proteome analysis and comparison of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Spo0A strain variants. // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2006. – T. 33. – №. 4. – C. 298-308.
305. Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. // Bioresource technology. – 2002. – T. 83. – №. 1. – C. 1-11.
306. Tailliez P., Girard H., Millet J., Beguin P. Enhanced cellulose fermentation by an asporogenous and ethanol-tolerant mutant of *Clostridium thermocellum*. // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – T. 55. – №. 1. – C. 207-211.
307. Teeri T. T., Koivula A., Linder M., Wohlfahrt G., Divne C., Jones T. A. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? // Biochem. Soc. Trans. – 1998. – №. 26 – C. 173–178.
308. Teeri T.T., Penttilä M., Keränen S., Nevalainen H., Knowles J. K. C. Structure, function, and genetic of cellulases. // In «Biotechnology of Filamentous Fungi», Eds. Finkelstein D.B., Ball C. – Butterworth–Heinemann, London. – 1991. – C. 417 - 444.

309. Teghammar A., Yngvesson J., Lundin M., Taherzadeh M. J., Horváth I. S. Pretreatment of paper tube residuals for improved biogas production. // *Bioresource technology*. – 2010. – Т. 101. – №. 4. – С. 1206-1212.
310. The SILVA ribosomal RNA database project [Электронный ресурс] / Max Planck Institute for Marine Microbiology and Jacobs University, Bremen, Germany. // Дата обновления: 2019. URL: <https://www.arb-silva.de>.
311. Thring R. W., Chornet E., Overend R. P. Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ratio, acid concentration and temperature. // *Biomass*. – 1990. – Т. 23. – №. 4. – С. 289-305.
312. Tomme P., Warren R. A. J., Gilkes N. R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. // *Advances in microbial physiology*. – Academic Press, 1995. – Т. 37. – С. 1-81.
313. Torto-Alalibo T., Purwantini E., Lomax J., Setubal J. C., Mukhopadhyay B., Tyler B. M. Genetic resources for advanced biofuel production described with the Gene Ontology. // *Frontiers in microbiology*. – 2014. – Т. 5. – С. 528.
314. Tsapekos P., Kougias P. G., Treu L., Campanaro S., Angelidaki I. Process performance and comparative metagenomic analysis during co-digestion of manure and lignocellulosic biomass for biogas production. // *Applied energy*. – 2017. – Т. 185. – С. 126-135.
315. Tsavkelova E., Prokudina L., Egorova M., Leontieva M., Malakhova D., Netrusov A. The structure of the anaerobic thermophilic microbial community for the bioconversion of the cellulose-containing substrates into biogas. // *Process Biochemistry*. – 2017. – Т. 66. – С. 183-196.
316. Uzodinma E. O., Ofoefule A. U. Effect of abattoir cow liquor waste on biogas yield of some agro-industrial wastes. // *Carbon*. – 2008. – Т. 47. – С. 079.
317. Wang D. I. C., Avgerinos G. C., Biocic I., Wang Z., Fang H. Y. Ethanol from cellulosic biomass. // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*. – 1983. – Т. 300. – №. 1100. – С. 323-333.
318. Wang Z., Cao G., Jiang C., Song J., Zheng J., Yang Q. Butanol production from wheat straw by combining crude enzymatic hydrolysis and anaerobic fermentation using *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. // *Energy & Fuels*. – 2013. – Т. 27. – №. 10. – С. 5900-5906.
319. Wang Z., Cao G., Zheng J., Fu D., Song J., Zhang J., Zhao L., Yang Q. Developing a mesophilic co-culture for direct conversion of cellulose to butanol in consolidated bioprocess. // *Biotechnology for biofuels*. – 2015. – Т. 8. – №. 1. – С. 84.
320. Wang X., Conway P. L., Brown I. L., Evans A. J. In vitro utilization of amylopectin and high-amylose maize (amylomaize) starch granules by human colonic bacteria. // *Applied and environmental microbiology*. – 1999. – Т. 65. – №. 11. – С. 4848-4854.
321. Wang J., Majima N., Hirai H., Kawagishi H. Effective removal of endocrine-disrupting compounds by lignin peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. // *Current microbiology*. – 2012. – Т. 64. – №. 3. – С. 300-303.
322. Wang S., Zhang Y., Dong H., Mao S., Zhu Y., Wang R., Luan G., Li Y. Formic acid triggers the “acid crash” of acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – Т. 77. – №. 5. – С. 1674-1680.
323. Weiland P. Biogas production: current state and perspectives // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2010. – Т. 85. – №. 4. – С. 849-860.
324. 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. // *Metabolic engineering*. – 2017. – Т. 39. – С. 38-48.
325. Wen Z., Wu M., Lin Y., Yang L., Lin J., Cen P. A novel strategy for sequential co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium beijerinckii* to produce solvents from alkali extracted corn cobs. // *Process Biochemistry*. – 2014. – Т. 49. – №. 11. – С. 1941-1949.
326. Wietzke M., Bahl H. The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2012. – Т. 96. – №. 3. – С. 749-761.

327. Willson B. J., Kovács K., Wilding-Steele T., Markus R., Winzer K., Minton N. P. Production of a functional cell wall-anchored minicellulosome by recombinant *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. // *Biotechnology for biofuels*. – 2016. – T. 9. – №. 1. – C. 109.
328. Wilson D. B. Cellulases and biofuels. // *Current opinion in biotechnology*. – 2009. – T. 20. – №. 3. – C. 295-299.
329. Wirth S., Ulrich A. Cellulose-degrading potentials and phylogenetic classification of carboxymethyl-cellulose decomposing bacteria isolated from soil. // *Systematic and applied microbiology*. – 2002. – T. 25. – №. 4. – C. 584-591.
330. Withers S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. // *Carbohydrate polymers*. – 2001. – T. 44. – №. 4. – C. 325-337.
331. Xin F., Dong W., Zhang W., Ma J., Jiang M. Biobutanol production from crystalline cellulose through consolidated bioprocessing. // *Trends in biotechnology*. – 2019. – T. 37. – №. 2. – C. 167-180.
332. Yadvika S., Sreekrishnan T.R., Santosh S., Kohli S. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques—a review. // *Bioresource technology*. – 2004. – T. 95. – №. 1. – C. 1-10.
333. Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A. Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. // *Biotechnology for biofuels*. – 2011. – T. 4. – №. 1. – C. 8.
334. Yang X., Xu M., Yang S. T. Metabolic and process engineering of *Clostridium cellulovorans* for biofuel production from cellulose. // *Metabolic engineering*. – 2015. – T. 32. – C. 39-48.
335. Yanling H., Youfang D., Yanquan L. Two cellulolytic *Clostridium* species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1991. – T. 41. – №. 2. – C. 306-309.
336. Yu E. K. C., Chan M. K. H., Saddler J. N. Butanol production from cellulosic substrates by sequential co-culture of *Clostridium thermocellum* and *C. acetobutylicum*. // *Biotechnology letters*. – 1985. – T. 7. – №. 7. – C. 509-514.
337. Yuan X., Cao Y., Li J., Wen B., Zhu W., Wang X., Cui Z. Effect of pretreatment by a microbial consortium on methane production of waste paper and cardboard. // *Bioresource technology*. – 2012. – T. 118. – C. 281-288.
338. Yutin N., Galperin M. Y. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced *Clostridia*. // *Environmental microbiology*. – 2013. – T. 15. – №. 10. – C. 2631-2641.
339. Zámocký M., Hofbauer S., Schaffner I., Gasselhuber B., Nicolussi A., Soudi M., Pirker K. F., Furtmüller P.G., Obinger C. Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2015. – T. 574. – C. 108-119.
340. Zhang Y. H. P., Cui J., Lynd L. R., Kuang L. R. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. // *Biomacromolecules*. – 2006. – T. 7. – №. 2. – C. 644-648.
341. Zhang W. L., Liu Z. Y., Liu Z., Li F. L. Butanol production from corncob residue using *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. // *Letters in applied microbiology*. – 2012. – T. 55. – №. 3. – C. 240-246.
342. Zhang F., Zhang Y., Ding J., Dai K., Van Loosdrecht M. C., Zeng R. J. Stable acetate production in extreme-thermophilic (70 °C) mixed culture fermentation by selective enrichment of hydrogenotrophic methanogens. // *Scientific reports*. – 2014. – T. 4. – C. 5268.
343. Zhao S., Ma T., Zhang H. Butanol production from halophyte seepweed *Suaeda salsa* by simultaneous saccharification and fermentation. // *Asian Journal of Chemistry*. – 2011. – T. 23. – №. 12. – C. 5285.
344. Zheng J., Tashiro Y., Wang Q., Sonomoto K. Recent advances to improve fermentative butanol production: genetic engineering and fermentation technology. // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2015. – T. 119. – №. 1. – C. 1-9.

345. Zheng Y., Pan Z., Zhang R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. // International journal of agricultural and biological engineering. – 2009. – T. 2. – №. 3. – C. 51-68.
346. Zimmerman A. R., Kang D. H., Ahn M. Y., Hyun S., Banks M. K. Influence of a soil enzyme on iron-cyanide complex speciation and mineral adsorption. // Chemosphere. – 2008. – T. 70. – №. 6. – C. 1044-1051.
347. Zverlov V. V., Berezina O., Velikodvorskaya G. A., Schwarz, W.H. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery //Applied microbiology and biotechnology. – 2006. – T. 71. – №. 5. – C. 587-597.
348. Zverlov V. V., Köck D. E., Schwarz W. H. The role of cellulose-hydrolyzing bacteria in the production of biogas from plant biomass. // Microorganisms in biorefineries. – Springer, Berlin, Heidelberg. – 2015. – C. 335-361.
349. Zverlov V., Mahr S., Riedel K., Bronnenmeier K. Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile '*Anaerocellum thermophilum*' with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains. // Microbiology. – 1998. – T. 144. – №. 2. – C. 457-465.