

SODIUM ALGINATE AS A BASIS FOR IMMOBILIZATION AND CONCENTRATING OF BACTERIA OF GENUS *CLOSTRIDIUM*

S. Skrotskyi, L. Khomenko, V. Pidgorskyi

Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Ukraine

Key words:

Sodium alginate
Clostridium
Acetobutylicum
Calcium chloride
*Complex activator of
acetanobutyl fermentation*
Gel
Granules
Release form

Article history:

Received 14.03.2019
Received in revised form
01.04.2019
Accepted 18.04.2019

Corresponding author:

S. Skrotskyi

E-mail:

bio-imv@ukr.net

ABSTRACT

One of the priority directions of biofuel technology development is the production of bio-butyl alcohol. The main problem in obtaining this biofuel is the toxicity of final products for the microorganisms themselves which limits the possibilities of its microbial synthesis. Today different approaches are used to solve this problem and to intensify the process of ABE-fermentation. One of such solutions is the search of new super-active strains of bacterial producers, obtained by methods of genetic engineering and also through optimization of production, use of more advanced systems of accumulation and withdrawal of final products.

In this study we investigated the technological parameters of immobilization of microorganisms in the “net” of alginate gel (biodegradation of calcium alginate by strains of microorganisms). There was also selected the optimal ratio of concentrations of sodium alginate and calcium chloride in order to optimize the composition of granules. The main properties of immobilized microorganisms which are included in the complex activator of acetanobutyl fermentation (CAABF) were studied (such as fermentation initial time, titre of cells in the alginate granules, amounts of consumed glucose and synthesized butanol).

It has been shown that the minimum concentration of sodium alginate needed for gel formation and subsequent immobilization of microorganisms is 20 g/L and the concentration of calcium salts for these processes must be not less than 5 g/L. The optimum size of wet granules as an effective release form of the fermentation activator should be 1.5—2 mm. The total loss of viable (CFU) cells when processing from the culture fluid to the dry granular preparation is about 20—25%. With use of CAABF fractional administration method there was achieved the bio-butanol yield of 14.2 g/L in 42 hours from glucose fermentation.

АЛЬГІНАТ НАТРІЮ ЯК ОСНОВА ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ТА КОНЦЕНТРУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *CLOSTRIDIUM*

С.О. Скроцький, Л.А. Хоменко, В.С. Підгорський

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

Одним із пріоритетних напрямків розвитку технології біопалив є отримання біобутилового спирту. Основною проблемою при отриманні цього біопалива є токсичність кінцевих продуктів для самих мікроорганізмів, що обмежує можливості його мікробного синтезу. Сьогодні використовуються різні підходи для розв'язання цієї проблеми та інтенсифікації процесу АБЕ-ферментації. Зокрема, за рахунок пошуку нових надактивних штамів бактерій-продуцентів, отриманих методами генної інженерії, а також за рахунок оптимізації виробництва, через використання більш досконалих систем накопичення і відведення кінцевих продуктів.

У статті визначено технологічні параметри іммобілізації мікроорганізмів у «решітку» альгінатного гелю (біодеградація альгінату кальцію штамми мікроорганізмів). Підібрано співвідношення концентрацій альгінату натрію та хлориду кальцію для оптимізації складу гранул. Досліджено основні властивості іммобілізованих мікроорганізмів (встановлення часу початку бродіння, титру клітин в альгінатних гранулах, кількість спожитої глюкози та синтезованого бутанолу), що входять до складу комплексного активатора ацетоно-бутилового бродіння (КААББ).

Встановлено, що мінімальна концентрація альгінату натрію для гелеутворення та наступної іммобілізації мікроорганізмів становить 20 г/л, а концентрація солей кальцію має бути не менша ніж 5 г/л. Оптимальний розмір вологих гранул як ефективної форми випуску активатора бродіння має становити 1,5—2 мм. Загальна втрата життєздатних клітин КУО від культуральної рідини до отримання сухого гранульованого препарату становить близько 20—25%. При зброджуванні глюкози методом дробного внесення КААББ було досягнуто отримання 14,2 г/л біобутанолу за 42 год.

Ключові слова: альгінат натрію, *Clostridium acetobutylicum*, хлорид кальцію, комплексний активатор ацетоно-бутилового бродіння, гель, гранули, форма випуску.

Постановка проблеми. На сучасному етапі бутиловий спирт є одним з перспективних біопалив. Він має високу енергоємність, за рахунок якої можливий високий коефіцієнт його змішування з бензином і дизельним паливом. При його використанні не потрібна зміна конструкції двигуна. Бутиловий спирт може використовуватись як розчинник у промисловому виробництві (у лакофарбовій промисловості, у виробництві смол і пластифікаторів) тощо. Для отримання бутанолу біологічним способом використовують сольвентогенні бактерії роду *Clostridium*, які здатні зброджувати не тільки зернові та субстрати, а й широкий спектр відходів харчової та сільськогосподарської промисловості [1; 2]. В процесі зброджування види цього

роду виробляють три основні класи продуктів: розчинник (ацетон, бутанол і етанол), органічні кислоти (ацетат і бутират) і гази (діоксид вуглецю і водень). Але класична схема отримання біобутанолу має певні недоліки, до яких відносяться дегенерація штамів, токсичність кінцевих продуктів, утворення побічних продуктів, низька концентрація бутанолу та висока вартість субстрату. Тому основним напрямком досліджень обрано розробку економічно-ефективних технологій виробництва біобутанолу з використанням сольвентогенних бактерій роду *Clostridium* [3]. Отже, актуальним є питання пошуку методик їх активації, розробки мікробіологічних і технологічних прийомів з високою ефективністю продукування розчинників. Одним із способів підняття ефективності технологій отримання біопалив є застосування іммобілізованих клітин. Використання іммобілізованих мікроорганізмів у процесі ферментації має певні переваги, а саме: збільшення продуктивності ацидогенезу та сольвентогенезу при ферментації, можливість і полегшення організації безперервного культивування (запобігає надлишковій втраті біомаси клітин), підвищує стійкість до високих концентрацій продуктів бродіння (бутанол, масляна кислота, ацетон, етанол), обумовлення нижчих витрат на відновлення для наступного циклу ферментації [2—4]. Відомі такі методи іммобілізації клітин, як адсорбція (чи адгезія), зшивання, мікрокапсулювання, використання мембранних реакторів (рис. 1).

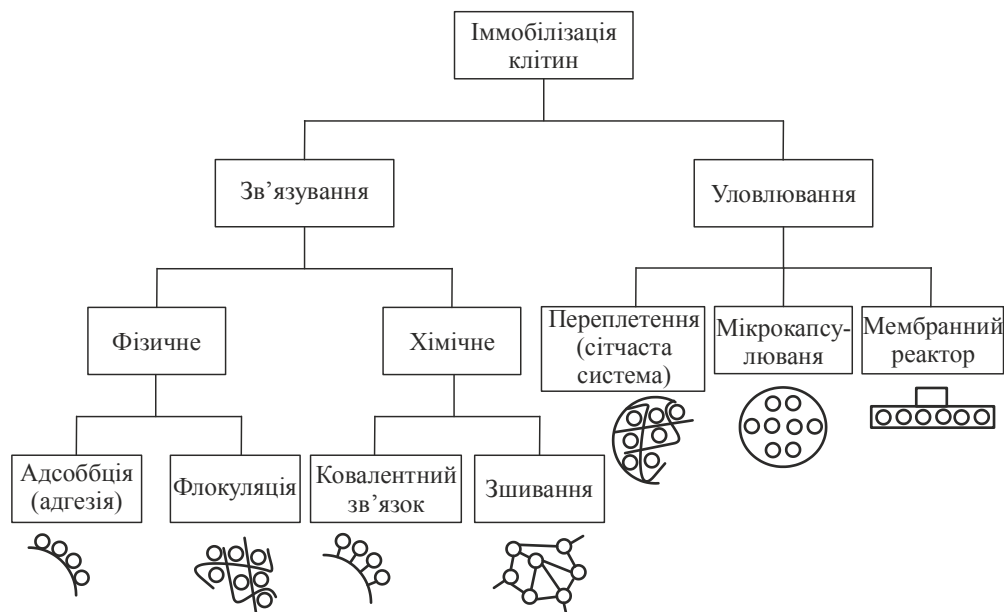


Рис. 1. Методи іммобілізації клітин мікроорганізмів

Схема, зображена на рис. 1, є простою класифікацією на основі механізму дії з клітиною. Іммобілізація клітин не є суто технологічним поняттям, а відображає існуючі явища, які спостерігаються в природі. У природних умовах певні мікроорганізми здатні рости у вигляді плівок, адсорбуватися на різноманітних біотичних і абіотичних речовинах (наприклад, пісок, ґрунт,

цегла, рослини, мінеральні та металеві поверхні). Адсорбція — це процес, що відбувається на різних природних або синтетичних поверхнях та може бути використаний як носій для прикріплення мікробних клітин. Тому багатьма дослідниками був вивчений вплив різних типів іммобілізації клітин клостридій на збільшення утворення розчинників (табл. 1). Дослідження проводились з використанням високої щільності клітин клостридій на різних типах носіїв, таких як активоване вугілля [5], цегла [5—8], рослинні рештки [9—12], волокнисті матеріали [13] та матеріали з трикотажу, з нержавіючої сталі або поліуретану [12; 14].

Таблиця 1. Синтез бутанолу іммобілізованими бактеріями роду Clostridium

Мікроорганізм	Тип іммобілізації	Концентрація бутанолу, г/л	Вихід розчинника, г/г	Джерело
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Біореактор з волокнистим шаром з використанням тростинної патоки	26,2*	0,47	[16]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> CICC 801	Біоплівкова іммобілізація на активованому вугіллі, макусі та цеглі	5,8	0,42	[5]
<i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1461	Іммобілізація на цеглі	5,80	0,14	[6]
	Іммобілізація на цеоліті	8,58	0,16	
<i>Clostridium pasteurianum</i> DSM 525	Іммобілізація на шматочка кукурудзяної соломи	10,4	0,33	[9]
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Іммобілізація на цеглі (0,15—2,4 мм)	8,71	нв	[7]
<i>Clostridium beijerinckii</i>	Адсорбція на відходах пальмового дерева, (шкаралупа, волокна, листя)	17,5 — 31,5	нв	[10]
<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	Біореактор з фіброзним шаром	4,9 — 5,3	0,41	[17]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792	Адсорбція на кокосовому волокні та на волокнах деревної маси	14,32	нв	[11]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 55025	Біореактор з волокнистим шаром	нв	0,42	[13]
<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	Пористий гідрофільний носій з додаванням бутирату	11,2	0,44	[14]
<i>Clostridium beijerinckii</i> BA101	Адсорбція на глиняній цеглі	15,8	0,38	[8]
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	Альгінат, стальна щітка, нейлонова щітка, поліуретан, пальмова олія, фруктові щітки	16,24	нв	[12]

Примітка: * — концентрація бутирату, нв — не визначали.

Метод уловлювання — найбільш вивчений метод. Мікробні клітини фізико-механічно уловлюються (включаються) безпосередньо в полімерні пористі сітки або матриці. Результати використаної методики залежать від іонів полімеру, його властивостей (наприклад, розчинності) і механізмів іммобілізації. Досліджені такі полімерні матриці: агар, альгірати натрію, калію, каррагінан, целюлоза та її похідні, хітозан, колаген, желатин, епоксидні смоли, нейлонові форполи, поліакриламін і поліефір [12; 15], які використовують і для проведення біосинтезу на мембранах [16; 17]. Тип і структура носія також має велике значення для стабільності процесу, тому для зменшення недоліків іммобілізації все більше приділяється уваги вибору методів іммобілізації [15]. Отже, найбільшими технологічно цікавими та популярними методами іммобілізації є уловлювання (включення) й адсорбція, бо вони зручні, нетоксичні, не потребують великих затрат.

Пошук активних штамів мікроорганізмів, підбір їх видового складу, форми випуску ефективних активаторів ацетоно-бутилового бродіння обумовлені необхідністю вирішення ряду проблем. Основними серед них, при отриманні кінцевих продуктів бродіння бутирату та біобутанолу, є висока специфічність і, як наслідок, низька ефективність зброджування широкого спектра субстратів монокультурами, вплив токсичної дії на АББ самих продуктів бродіння, технологічна складність управління двостадійним процесом зброджування тощо [18].

Одним із методів підвищення ефективності зброджування є сумісне використання декількох штамів. Такий підхід дає змогу розширити спектр субстратів, що зброджуються, та вести швидше та глибше їх зброджування внаслідок комбінованого використання штамів (ефективних продуцентів масляної кислоти) на початку процесу, а на другій стадії — ефективних сольвентогенних бактерій [19]. Використання багатокомпонентного комплексного активатора ацетоно-бутилового бродіння (КААББ) є перспективним для збільшення ефективності технологічного процесу ацетоно-бутилового бродіння, його популяризації через ефект спрощення допоміжних стадій технологічного процесу.

Необхідною умовою застосування в технології «прямого внесення» будь-якого бактерійного концентрату є оптимальна (зручна) для використання форма його випуску. Поняття «зручності» використання в біотехнології об'єднує в собі і отримання готової форми випуску з мінімальними втратами активності, і ефективність та довгий час зберігання, зручність внесення та додатковий захист або стимулюючі властивості порівняно із застосуванням звичайних суспензій мікроорганізмів. Саме таким критеріям відповідає форма випуску бактерійних концентратів, іммобілізованих у решітку гелю з подальшою полімеризацією та висушуванням препарату [20]. Готова форма бактеріального концентрату у вигляді сухих альгіратних гранул є саме такою, що відповідає всім вказаним вище критеріям. Розробка основ технології отримання біологічного активатора КААББ — *комплексного активатора ацетоно-бутилового бродіння* та рекомендацій щодо його застосування дасть змогу значно спростити проведення процесу отримання бутирату та біобутанолу і, як наслідок, розширити спектр потенційних його виробників.

Мета дослідження: визначити технологічні параметри іммобілізації мікроорганізмів у «решітку» альгінатного гелю, дослідити основні технологічні властивості іммобілізованих мікроорганізмів, що входять до складу активатора ацетоно-бутилового бродіння, розробити технологічні прийоми отримання зручної у використанні й ефективної для зберігання форми випуску концентрату ацетоно-бутилових бактерій-активатора ацетоно-бутилового бродіння КААББ для його широкого застосування.

Матеріали і методи. *Об'єкт дослідження:* консорціум зі штамів мікроорганізмів *Clostridium tyrobutyricum* ІМВ В-7701, *Clostridium beijerinckii* ІМВ В-7806, *Clostridium acetobutylicum* ІМВ В-7807 як комплексний активатор ацетоно-бутилового бродіння (КААББ) для отримання масляної кислоти та бутанолу. Використання альгінатного гелю як іммобілізуючого агента з додатковими антитоксичними властивостями, ефективного засобу концентрування висушування та зберігання мікроорганізмів-активаторів ацетоно-бутилового бродіння. Альгінатні сухі гранули — технологічна і зручна форма для широкого використання комплексного активатора бродіння при отриманні бутирату та розчинників з різноманітних субстратів.

Для проведення вибору найоптимальнішої кількості поживних речовин, необхідних для максимального утворення розчинників у результаті ацетоно-бутилового бродіння, використовували синтетичне середовище такого складу (г/л): глюкоза — 50; KH_2PO_4 — 0,5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ — 0,01; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01, NaCl — 0,01; ацетат амонію — 2,2, параамінобензойна кислота — 0,001, біотин — 0,00001.

Перед використанням вказане стерилізоване середовище відновлювали в киплячій воді, а потім швидко охолоджували на крижаній бані до бажаної температури. Цей процес дав змогу усунути розчинений кисень з навколишнього середовища й отримати умови анаеробіозу без додаткових відновників.

Концентрація глюкози в середовищі становила 5% і була достатньою для отримання значного рівня перетворення цукрів у розчинники (від 28 до 32%). Ефекти впливу концентрації кожного компонента поживної речовини досліджені шляхом визначення концентрації бутирату, бутанолу та глюкози.

Для визначення ефективності збродження субстратів різними штамми та їх консорціумами спирались на раніше отримані дані [21; 22]. Штами, що були ідентифіковані, визначені як непатогенні та нетоксичні, депоновані у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України як *Clostridium tyrobutyricum* ІМВ В-7701, *Clostridium beijerinckii* ІМВ В-7806, *Clostridium acetobutylicum* ІМВ В-7807. Для порівняння використовувалось збродження глюкози при послідовному внесенні інокуляту штамів *Clostridium tyrobutyricum* ІМВ В-7701, *Clostridium beijerinckii* ІМВ В-7806, та при досягненні значень рН — 4,5 — додатковим внесенням інокуляту штамів *Clostridium acetobutylicum* ІМВ В-7807. Значення рН при проведенні процесу підтримували на рівні не нижче за показник 4,5.

Оптичну густина суспензій бактерій вимірювали при довжині хвилі 590 нм нефелометричним методом за допомогою спектрофотометра Specord M-40 (Carl Zeiss, Jena, Німеччина) в кварцових кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Динаміку приросту біомаси оцінювали за даними нефелометричних вимірювань оптичної густини клітинних суспензій. Питому швидкість росту бактеріальних культур визначали методом нелінійної регресії [23].

Швидкість перебігу стадії кислотоутворення визначали за швидкістю зниження показника рН. Динаміка зміни вказаного показника при зброджуванні субстратів від нейтрального до значень 4,5 є важливим технологічним показником. Швидкість вимірювалась у годинах від початку внесення культури бактерій у субстрат і до досягнення значень рН — показника 4,5. Значення цього показника дає змогу визначити ефективність кислотоутворення штамми АББ (ацетонобутилових бактерій). Після досягнення значень рН — 4,5 подальше його зниження досягалось додаванням до субстрату, що зброджувався 0,1М NaOH.

Визначення розчинників бутанолу, етанолу, ацетону проводили двома методами. Перший метод, розроблений Б.М. Нахмановичем [24; 25], ґрунтується на окисленні спиртів і ацетону біхроматом калію за наявності сірчаної кислоти [26].

Визначення вмісту розчинників і бутирату проводили також і на газорідинному хроматографії. Кількісне визначення коротколанцюгових жирних кислот вивчали методом газової хроматомас-спектрометрії на приладі Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, USA), колонка капілярна HP-INNOWax (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) (J & W Scientific, USA). Розділення проводили з градієнтом температури 20°C/хв від 40 до 250°C, газ-носії — гелій, швидкість потоку через колонку 1 мл/хв. Об'єм інжекції — 0,2 мкл. Як внутрішній стандарт використовували ізовалеріанову кислоту. Ідентифікацію коротколанцюгових жирних кислот проводили з використанням бібліотек мас-спектрів NIST02 і стандартних розчинів коротколанцюгових жирних кислот (Sigma-Aldrich, USA).

Проведення іммобілізації мікроорганізмів. Іммобілізацію мікроорганізмів проводили в кальцій-альгінатному гелі. Для процесу іммобілізації використовували інжекторну установку, що складалась з перистальтичного насоса, інжектора та ротаметра для вимірювання витрати повітря. Заздалегідь приготувану суміш компонентів для іммобілізації з колби пропускали через установку зі швидкістю 500 мл/год, в ділянку відриву крапель подавали повітряний струмінь з компресора зі швидкістю $2 \times 10 \sim 3 \text{ м}^3/\text{хв}$. Відриваючись, краплі потрапляли в розчин хлориду кальцію, де відбувалася полімеризація альгінату натрію шляхом зшивання катіонами кальцію. Отримані гранули 30 хв витримували в розчині хлориду кальцію, після цього декантували, промивали водопровідною водою і використовували для експериментів.

Визначення глюкози за допомогою рефрактометричного методу аналізу з використанням калібрувального графіка стандартних розчинів.

Вміст глюкози, г/мл, розраховували за формулою:

$$X = \frac{n - n_0}{0,00142 \cdot 100},$$

де n — показник заломлення препарату; n_0 — показник заломлення води; 0,00142 — величина приросту показника заломлення при збільшенні концентрації глюкози на 1% (F).

Статистична обробка отриманих результатів Результати досліджень обробляли статистичними методами [27] з використанням t-критерію Стьюдента.

Підрахунки проводили за допомогою пакета програмних засобів Microsoft Excel [28].

Результати і обговорення. Технологію отримання біобутанолу умовно можна розділити на декілька етапів, а саме: робота з культурами мікроорганізмів — активаторами ацетано-бутилового бродіння, проведення процесу зброджування цими мікроорганізмами субстратів, та отримання (концентрування, очищення) готових продуктів. Технологія була впроваджена як єдине ціле на великих заводах з виробництва біобутанолу в 50—60-х роках минулого століття [29]. За таким же принципом розвивають цю галузь сучасні великі компанії [30]. Описана технологія є досить складною, адже за своєю суттю поєднує в собі два різних виробництва — біотехнологічне та бродильно-ректифікаційне. Як наслідок, виникає потреба у вузьких спеціалістах цих різних сфер, спеціалізованому обладнанні різних напрямів, дотриманні різних вимог тощо і, відповідно, в значних капіталовкладеннях для його організації. Це ускладнює популяризацію впровадження технологій, унеможливорює їх широке використання, наприклад, через створення невеликих малотонажних виробництв біобутанолу.

Логічним розв'язанням цієї проблеми є раціоналізація організації виробництв, а саме: розділення біотехнологічної частини та спеціалізованої технології. За цим принципом розвиваються інші галузі, що використовують мікроорганізми, зокрема етанольне виробництво, хлібопекарська та молочна промисловість, виноробство тощо. Отже, необхідно отримати на спеціалізованих біотехнологічних підприємствах активних, вузькоспеціалізованих бактерійних концентратів у зручній для зберігання та використання формі випуску для технології так званого «прямого внесення». Отримані бактерійні концентрати мають сталі показники якості і здатні забезпечити стабільне, прогнозоване проходження основного технологічного процесу. Їх використання забезпечує значне спрощення технології зброджування різних субстратів, зробить можливим відтворення цієї технології за допомогою нескладних технологічних установок.

Одним з надважливих завдань при створенні бактерійного концентрату, що буде використовуватись як активатор, (часто використовують термін — біокатализатори) ацетано-бутилового бродіння (КААББ), є розробка зручної форми для його зберігання й ефективного застосування. Готова форма випуску має відповідати таким критеріям: зберігати кількісно-якісний перехід клітин мікроорганізмів після їх культивування, створювати високу концентрацію мікроорганізмів при невеликому об'ємі, зберігати основні специфічні властивості мікроорганізмів або навіть покращувати їх, забезпечувати максимально тривале збереження мікроорганізмів концентрату в активному стані, легкість і технологічність подальшого використання бактеріального концентрату як біологічного активатора процесу зброджування.

Саме цим критеріям відповідають готові препаративні форми, в основі яких лежить явище іммобілізації клітин мікроорганізмів. Відомо, що іммобілізовані клітини мають ряд переваг перед інтактними. Процеси ферментації

субстратів з вільними клітинами наштовхуються на ряд технологічних проблем (мала питома концентрація клітин, обмеження в споживанні поживних речовин, проведення культивувань у періодичному режимі з пролонгованим у часі низхідним потоком, обмеження швидкості розведення при безперервній ферментації внаслідок вимивання) [31]. Процес іммобілізації нівелює більшість обмежень характерних для системи вільних клітин [32].

Іммобілізація клітин мікроорганізмів дає змогу проводити з ними складні багатостадійні процеси, сприяє кращій захищеності клітин від впливу негативних факторів, створити та втримати протягом технологічного процесу високу концентрацію мікроорганізмів [26]. Крім того, іммобілізовані мікроорганізми в багатьох випадках менш чутливі до токсичних субстратів [33]. На основі іммобілізованих клітин також є можливість розробляти ефективні біотехнологічні процеси багатократною періодичною та безперервною дією з використанням взаємодії рухомої й нерухомої фаз. Основними методами іммобілізації живих клітин мікроорганізмів є абсорбція на крупнопористому носії, ковалентне зв'язування, адсорбція, поперечна шивка, включення в структуру гелю. Метод включення в структуру гелю іноді ще має назву уловлювання пористою мембраною. Прикладами іммобілізації клітин шляхом їх уловлювання в мембрани є використання карагану, хітозану, альгінату кальцію [34]. Відомо про досить високу продуктивність отримання розчинників з використанням іммобілізованих в кальцій-альгінаті клітин ацетоно-бутилових бактерій — $4,02 \text{ г л}^{-1}/\text{год}^{-1}$. Хоча таку ж продуктивність вдалось отримати і при використанні для іммобілізації методу адсорбції на твердих носіях [35]. Метод іммобілізації в гелі має декілька переваг: первинна стабільність процесу, коли іммобілізовані клітини краще захищені від змін під час ферментації субстрату (зміни температури, джерела вуглецю, рН, їх різкої зміни тощо), а також додатковий захист клітин від механічного впливу на них. Завдяки цим та багатьом іншим перевагам при використанні таким чином іммобілізованих клітин ацетоно-бутилових бактерій є можливість проведення бутилового зброджування при відносно високих швидкостях розведення субстрату [11; 13]. Для використання в процесі ацетоно-бутилового бродіння максимально підходить метод іммобілізації мікроорганізмів — включенням їх решітку в кальцій-альгінатного гелю, завдяки якому можна отримувати препаративну форму, яка відповідає вказаним критеріям.

Для визначення можливості використання кальцій-альгінатного гелю при отриманні стійкої, зручної препаративної форми біокатализатора АББ проведено ряд досліджень. Зокрема, визначено біодеградацію альгінату кальцію штамами мікроорганізмів, що входять до складу біокатализатора АББ *S. Tyrobutyricum* ІМВ В-7701, *S. beijerinckii* ІМВ В-7806, *S. acetobutylicum* ІМВ В-7807. Отримані дані порівняння біодеградації альгінатного гелю штамами АББ з стандартним агаризованим середовищем, які проводились протягом 24 год, відображено в табл. 2.

Як видно з отриманих даних, штами, що входять до КААББ, не проводять деградацію альгінату кальцію. Зокрема, час, необхідний до появи колоній від посіву до досягнення першими колоніями діаметра 1 мм при використанні як

загущувача альгінату кальцію, був таким же, як і в контролі з використанням агаризованого середовища. Для бактерії *Clostridium beijerinckii* IMB B-7806 досягнення колоніями розміру 1 мм на альгінатному середовищі проходило швидше, ніж у контролі з агаром. Радіальні швидкості росту колоній досліджуваних штамів були майже такими ж, як і в контролі. Для штаму *C. tyrobutyricum* IMB B-7701 радіальна швидкість росту дещо перевищувала таку ж у контролі. Також у всіх зразках за час дослідження не спостерігалось розрідження твердого середовища та проростання колоній у його товщу. Тобто можна стверджувати, що альгінат натрію не чинить токсичної дії на штами бактерій, що досліджувались.

Таблиця 2. Деструкція кальцій-альгінатного гелю клостридіями

Штами	Час до появи колоній (d — 1мм)		Радіальна швидкість росту колоній (від 1мм)		Проростання в товщу твердого середовища		Розрідження твердого середовища	
	год		(d) мм/год		+/-		+/-	
	Агар	Кальцій-альгінат	Агар	Кальцій-альгінат	Агар	Кальцій-альгінат	Агар	Кальцій-альгінат
<i>Clostridium beijerinckii</i> IMB B-7806	10	9	0,3	0,3	-	-	-	-
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> IMB B-7701	8	8	0,3	0,4	-	-	-	-
<i>Clostridium acetobutylicum</i> IMB B-7807	11	10	0,15	0,15	-	-	-	-

Полімерна структура альгінату кальцію здатна вільно проводити поживні речовини. Бактерії КААББ не мають специфічної ферментативної активності до кальцій-альгінатного гелю і не проводять його деградацію. Використання кальцій-альгінатного гелю як іммобілізатора та основи препаративної форми для КААББ є доцільним і технічно можливим. Найефективнішою препаративною формою іммобілізованих у структуру альгінатного гелю мікроорганізмів КААББ є гранули. Така форма є зручною для отримання, зберігання й ефективного використання КААББ. Гранули отримуються шляхом гомогенізації суспензії мікроорганізмів з розчином альгінату натрію з подальшим її крапельним внесенням у розчин осаджувача, що містить іони кальцію. При розробці технологічних режимів іммобілізації необхідною умовою є отримання гранул саме сферичної форми та відповідної концентрації гелю. Базовим моментом при цьому є підбір співвідношення концентрацій носія й осаджувача. Для цього необхідно отримати робочий розчин носія альгінату натрію з в'язкістю, що забезпечує вільну текучість розчину та його прокапування. Також технологічно-необхідним є отримання сферичних гранул з густиною більшою за розчини осаджувача. Також перевірено різні співвідношення концентрацій розчинів альгінату натрію (носія) та хлориду кальцію (осаджувача). Основними критеріями було отримання гранул сферичної форми, негативної

плавучості та таких, що забезпечували активний транспорт поживних речовин і метаболітів всередину та назовні мембрани. Об'ємні співвідношення альгінат натрію/хлорид кальцію були сталими для всіх зразків та становили $\frac{1}{4}$. За критерій транспорту активних речовин вважали різницю часу початку бродіння зразків, засіяних дослідними гранульованими зразками, до часу початку бродіння контрольних зразків, інокульованих еквівалентними, за кількістю, вільними клітинами мікроорганізмів КААББ. Дані цих досліджень відображені в табл. 3.

При підборі оптимальних для гранулювання концентрацій носія і осаджувача виявили, що при концентрації носія нижче за 20 г/л та одночасному використанні осаджувача в співвідношенні концентрацій $\frac{1}{2}$ (при сталому об'ємному співвідношенні $\frac{1}{4}$) мали показники часу початку бродіння, що не відрізнялися від таких при використанні інтактних клітин. Показники ΔT початку бродіння (імобілізований зразок КААББ-/вільні клітини КААББ) дорівнюють 0. З цього можна зробити висновок, що при концентраціях носія до 20 г/л активний транспорт поживних речовин в гранулу та з неї є таким, як і при використанні вільних клітин. Разом з тим дані зразки не мали сферичної форми та мали позитивну плавучість, що є негативним фактором для ефективного використання отриманих таким чином гранул у технології зброджування субстратів і для анаеробних мікроорганізмів КААББ зокрема. І навпаки, при концентраціях носія, що перевищували показники 30 г/л, гранули мали сферичну форму та негативну плавучість.

Таблиця 3. Вплив різних концентрацій носія та осаджувача на якість гранульованої препаративної форми КААББ

№	Співвідношення концентрацій альгінат натрію/хлорид кальцію, г/л	Сферична форма гранул, так/ні	Плавучість гранул, +/-	ΔT початку бродіння (імобілізований зразок КААББ / вільні клітини КААББ), год
1	10:2	ні	-	0
2	10:5	ні	+	0
3	20:5	так	-	+0,5
4	20:10	так	+	+0,5
5	30:6	так	-	+1
6	30:15	так	-	+1
7	40:10	так	-	+2
8	40:20	так	-	+2

При їх використанні для зброджування субстратів час початку бродіння затримувався відносно вільних клітин на 1 год при 30 г/л та на 2 год при 40 г/л альгінату. Також при таких концентраціях альгінату проявлялось ускладнення процесу текучості гелю, що є негативним фактором у процесі отримання однорідних гомогенних гранул. Оптимальним співвідношенням носій/осаджувач виявилась концентрація носія альгінату натрію 20 г/л та концентрація осаджувача 5 г/л при співвідношенні їх об'ємів $\frac{1}{4}$. При такому співвідношенні форма гранул була оптимально сферичною, плавучість негативною, а час бродіння майже не відрізнявся від такого для інтактних клітин.

Також було проведено дослідження іммобілізації мікроорганізмів КААББ як ефективної технологічної стадії процесу концентрування біомаси з культуральної рідини. Базовим для можливості застосування такого технологічного прийому був принцип утворення гранул. Тобто відомо, що при утворенні гелю, який одержують методом додавання до культуральної рідини альгінату натрію, та достатній його гомогенізації утворюється стабільна гомогенна суспензійна система. В ній усі нерозчинені часточки (в тому числі і клітини та спори мікроорганізмів) знаходяться в гомогенному стані за рахунок зниження процесів седиментації в гелевій системі відносно рідинної (культуральної рідини). При дозуванні даної системи в розчин хлориду кальцію навкруги краплини гелю утворюється плівка кальцій-альгінатного полімеру. Вона є напівпроникною мембраною, через яку завдяки градієнту концентрації іонів, вода з середини гранули виходить назовні. Всі нерозчинні частинки суспензії концентруються в середині гранули. Було проведено дослідження з концентрування монокультур мікроорганізмів КААББ. Виявлено, що на стадії отримання «вологих» гранул досягався ефект концентрування біомаси в 7—9 р. При перевірці титру КУО (колонієутворювальних одиниць) до процесу гранулювання та титру КУО в гранулах було виявлено, що втрати титру не перевищували 12%. Вологі гранули піддавали висушуванню конвективною сушкою при температурі 45°C упродовж 2 год. Отримували «сухі» гранули КААББ. При перевірці титру КУО, при їх висушуванні, було виявлено, що втрати титру на цій стадії не перевищували 10%. Тобто загальні втрати КУО від культуральної рідини до отримання сухого гранульованого препарату КААББ становлять 20—22%. Визначено, що отримані сухі альгінатні гранули можуть зберігатись при кімнатній температурі 16 місяців без втрати бродильної активності. Втрата титру КУО за цей строк не перевищує 15%.

Для стандартизації процесу необхідно було перевірити ефективність використання окремої фракції альгінатних гранул. Цей показник визначали за здатністю «сухих» гранул КААББ різного розміру утворювати максимальну кількість розчинників (рис. 2).

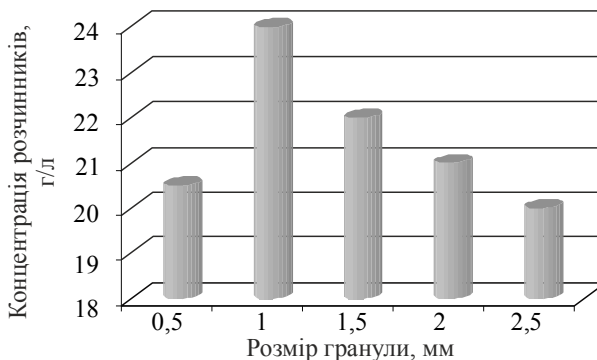


Рис. 2. Ефект розміру альгінатної гранули на клітинну активність щодо синтезу розчинників

Встановлено, що при діаметрі гранули 1 мм відбувається найбільше накопичення розчинників (ацетон, етанол, бутанол) — 24,0 г/л. Найменш ефектив-

ним було використання КААББ розміром 0,5 та 2,5 мм, у яких визначали кількість розчинників лише 20,5 та 19,7 г/л.

Також було досліджено здатність до накопичення бутанолу асоціацією мікроорганізмів, до якої входили три найбільш активні штами, надалі вільні клітини та КААББ (сухі гранули) — іммобілізовані клітини на синтетичному середовищі з початковою концентрацією глюкози 50,0 г/л (рис. 3).

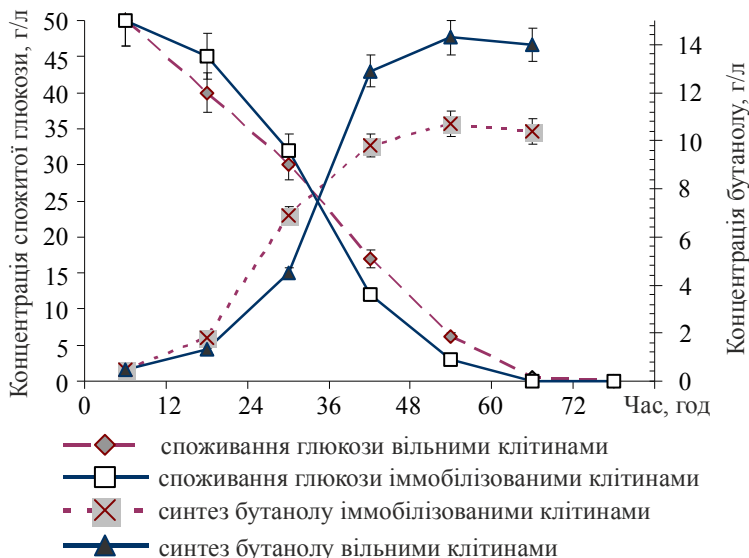


Рис. 3. Синтез бутанолу та споживання глюкози іммобілізованими в «решітку» кальцій-альгінатного полімеру та вільними клітинами (КААББ)

Встановлено, що гранульовані КААББ були здатні до синтезу бутанолу — 14,2 г/л, тоді як вільні клітини лише 10,5 г/л. Необхідно відзначити, що споживання глюкози у КААББ було швидше, і вже на 60 год росту цей субстрат було спожито повністю. Цей же показник для вільних клітин на цю годину досліджу був вищим. Підтверджено доцільність використання КААББ для отримання бутанолу. Це пояснюється більш високою концентрацією клітин та їх додатковим захистом від лімітуючих факторів, зокрема токсичного впливу бутанолу.

Висновки

Отже, оптимальна концентрація альгінату натрію для гелеутворення та подальшої іммобілізації мікроорганізмів становить 20 г/л, а концентрація солей кальцію як «зшиваючого» агента має бути не нижча за 5 г/л. Оптимальний розмір вологих гранул як ефективної форми випуску активатора бродіння має становити 1,5—2 мм. Час для процесу полімеризації гранул, іммобілізованих у полімерну решітку АББ із середнім діаметром 1,5—2 мм, має бути не меншим 1—1,5 год. При проведенні технологічного процесу отримання сухого гранульованого препарату КААББ втрати КУО становлять близько 20—25%, що є позитивним показником та корелює з таким при використанні ліофільного

висушування. Зберігання альгінатних гранул при температурі 20°C без втрати їх активності може бути не меншим за 16 місяців.

При зброджуванні традиційних субстратів методом роздільного, дробного внесення активатора бродіння у вигляді іммобілізованого в решітку альгінатного гелю КААББ, якщо порівняти з використанням вільних клітин, було досягнуто збільшення біосинтезу бутанолу на 26%, що становило 14,2 г/л біобутанолу за 42 год.

Дослідження проводились у рамках проекту цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Розробка наукових основ ефективних біотехнологій отримання рідких біопалив з органічних відходів із використанням наноматеріалів» (№ 0115U004278).

Література

1. Gottumukkala D.L., Haigh K., Gorgens J. Trends and advances in conversion of lignocellulosic biomass to biobutanol: Microbes, bioprocesses and industrial viability. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2017, 76: 963—973. doi: 10.1016/j.rser.2017.03.030.
2. Green E.M. Fermentative production of butanol — the industrial perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011, 22 (3): 337—343. doi: 10.1016/j.copbio.2011.02.004.
3. Zhu C., Chen L., Xue C., Bai F. A novel close-circulating vapour stripping-vapor permeation technique for boosting biobutanol production and recovery. *Biotechnol. Biofuels.* 2018, 11. doi: 10.1186/s13068-018-1129-5.
4. Jiang L., Wang J., Liang S., Wang X., Cen P., Xu Z. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. *Bioresour Technol.* 2009, 100 (13): 3403—3409. doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.032.
5. Zhou W., Liu J., Fan S., Xiao Z., Qiu B., Wang Y., Li J., Liu Y. Biofilm immobilization of *Clostridium acetobutylicum* on particulate carriers for acetone-butanol-ethanol (ABE) production. *Bioresour Technol. Report.* 2018, 3: 211—217. doi: 10.1016/j.biteb.2018.08.008.
6. Vichuvitwat R., Boonsombuti A., Luengnarumitchai A., Wongkasemjit S. Enhanced butanol production by immobilized *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 using zeolite 13X as a carrier. *Bioresour Technol.* 2014, 172: 76—82. doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.008.
7. Yen H.-W., Li R.-J., Ma T.-W. The development process for a continuous acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *J. Taiwan. Inst. Chem. E.* 2011, 42 (6): 902—907. doi:10.1016/j.jtice.2011.05.006
8. Qureshi N., Schripsema J., Leinhardt J., Blaschek H.P.. Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA101 immobilized by adsorption onto brick. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 16: 377—382. doi: 10.1023/A:1008984509404.
9. Gallazzi A., Branska B., Marinelli F., Patakova P. Continuous production of n-butanol by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 using suspended and surface-immobilized cells. *J Biotechnol.* 2015, 216: 29—35. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.10.008.
10. Loyarkat S., Cheirsilp B., Prasertsan P. Two-stage repeated-batch fermentation of immobilized *Clostridium beijerinckii* on oil palm fronds for solvents production. *Process Biochem.* 2015, 50: 1167—1176. doi:10.1016/j.procbio.2015.04.016.
11. Survase S.A., van Heiningen A., Granstrom T. Continuous bio-catalytic conversion of sugar mixture to acetone-butanol-ethanol by immobilized *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012, 93 (6): 2309—2316. doi: 10.1007/s00253-011-3761-x.
12. Shamsudin S., Kalil M.S.H., Yusoff W.M.W. Production of acetone, butanol and ethanol (ABE) by *Clostridium saccharoperbutylacetonium* N1-4 with different immobilization systems. *Pak. J. Biol. Sci.* 2006, 9 (10): 1923-1928. doi: 10.3923/pjbs.2006.1923.1928
13. Huang W.C., Ramey D.E., Yang S.T. Continuous production of butanol by *Clostridium acetobutylicum* immobilized in a fibrous bed bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004, 113: 887—898.

14. Lee S.M., Cho M.O., Park C.H., Chung Y., Kim J.H., Sang B., Um Y. Continuous butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate. *Energy Fuels*. 2008, 22 (5): 3459-3464. doi: 10.1021/ef800076j.
15. Borner R.A., Aliaga M.T., Mattiasson B. Microcultivation of anaerobic bacteria single cells entrapped in alginate microbeads. *Biotechnol. Lett.* 2013, 35 (3): 397—405. doi: 10.1007/s10529-012-1094-1.
16. Jiang L., Wang J., Liang S., Wang X., Cen P., Xu Z. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. *Bioresour. Technol.* 2009, 100 (13): 3403—3409. doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.032.
17. Liu J., Liu Z., Guo T. Repeated-batch fermentation by immobilization of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 in a fibrous bed bioreactor for ABE (acetone-butanol-ethanol) production. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*. 2018, 10 (1). doi: 10.1063/1.5007133.
18. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія. К.: НУХТ. 2009, 336 с.
19. Tiginova O.A., Shulga S.M., Blume Y.B. Biobutanol as an alternative type of fuel. *Cytol. Genet.* 2013, 47 (6): 366—382. doi: 10.3103/S0095452713060042.
20. Mollah A.H., Stuckey D.C. Stuckey maximizing the production of acetone-butanol in an alginate bead fluidized bed reactor using *Clostridium acetobutylicum*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1993, 56: 83—88. doi: 10.1002/jctb.280560115.
21. Скроцький С.О. Органовмісні відходи виробництва як субстрати для біосинтезу бутанолу бактеріями роду *Clostridium*. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*. 2018, 24(2): 34—43. doi: 10.24263/2225-2924-2018-24-2-6.
22. Скроцький С.О., Хоменко Л.А., Войчук С.І., Підгорський В.С. Особливості росту та біосинтетична активність солвентогенних бактерій роду *Clostridium*. *Mikrobiol. Z.* 2018, 80 (2): 3—13. doi: 10.15407/microbiolj80.02.003.
23. Varfolomeev S.D., Gurevich K.G. Biokinetics: a practical course. Moscow: FAIR-PRESS, 1999, 720 p.
24. Нахманович Б.М. О возможности частичной замены пищевого сырья в ацетоно-бутиловом производстве. *Спиртовая промышленность*. 1957, 4.
25. Нахманович Б.М. Вопросы пищевой и бродительной микробиологии. К.: изд. АН УССР, 1958.
26. Фомичев В.Т., Доскина Э.П., Воронович Н.В. и др. Интенсификация биологической очистки в аэротенках. *Поволжский экологический вестник*. 2001, 8: 88—92.
27. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 198. 293 с.
28. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с применением «Excel». К.: Морион. 2000. 320 с.
29. Степаненко П. Из истории биобутанола. *The Chemical Journal*. 2008. 9: 30—33.
30. Lee S.Y., Park J.H., Jang S.H., Nielsen L.K., Kim J., Jung K.S Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008. 101 (2): 209—228. doi: 10.1002/bit.22003.
31. Ramakrishna S.V., Prakasham R.S. Microbial fermentations with immobilized cells. *Curr. Sci.* 1999 77: 87—100.
32. de Vasconcelos J.N., Lopes C.E., de Franca F.P. Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. *Braz. J. Chem. Eng.* 2004, 21: 357—365. doi: 10.1590/s0104-66322004000300002.
33. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Грегирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти. *Прикл. биохимия и микробиология*. 2005, 41(1): 58—63.
34. Frick Ch., Schugerl, K. Continuous acetone-butanol production with free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986. 25: 186—193. doi: 10.1007/bf00253646.
35. Qureshi N., Maddox I.S. Reduction in butanol inhibition by perstraction: utilization of concentrated lactose/whey permeate by *Clostridium acetobutylicum* to enhance butanol fermentation economics. *Food and Bioproducts Processing*. 2005, 83 (1): 43—52.