

BIOTECHNOLOGICAL FEATURES OF RECEIVING ORGANIC COMPOUNDS FOR PRODUCTION OF PLASTICIZERS

O. Skrotska, K. Tsvietkov

National University of Food Technologies

Yu. Penchuk

Taras Shevchenko National University of Kyiv

Key words:

Plasticizers

Organic acids

Phenols

Alcohols

Microbial synthesis

Article history:

Received 25.01.2023

Received in revised form

06.02.2023

Accepted 17.02.2023

Corresponding author:

O. Skrotska

E-mail:

skrotska@ukr.net

ABSTRACT

Plasticizers are used in the production of various polymers. They give these materials flexibility, strength and elasticity. Different groups of compounds are used for obtaining plasticizers in particular acids, phenols and alcohols. They can be obtained both by chemical synthesis and by using microorganisms. Information in this article is focused on the microbial synthesis of various compounds that are the basis for the production of plasticizers.

Organic acids such as oleic, linolenic, linoleic, adipic, etc. are used in the production of plasticizers. Among the producers of these acids are bacteria of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*; yeast *Rhodospiridium*, *Saccharomyces*; fungi *Thamnidium*, *Mucor*; microalgae *Botryococcus* etc. The second group of compounds used in the production of plasticizers consists of phenols and their derivatives. Phenols can be obtained by cultivating recombinant strains of bacteria, in particular *Escherichia coli*. Metacresol is phenol derivative which is used for the production of plasticizers. It can be obtained using genetically modified cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidulans*.

The main raw materials for the production of plasticizers are alcohols — hexanol, glycerol, butanol, isobutanol. Hexanol is synthesized by both natural and recombinant bacteria and yeast. 2.5% of the total percentage of alcohol in production of plasticizers is hexanol. Glycerol is used less often in the production of plasticizers. The share of the use of this alcohol is 1.8%. The percentage of isobutanol in the production of plasticizers is 4.5% of the total amount of alcohols used for this purpose. This alcohol is obtained by cultivating recombinant bacteria *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Zymomonas mobilis* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The largest percentage of the use of alcohols in the creation of plasticizers is butanol — 36%. Bacteria of the genus *Clostridium* are distinguished among the natural producers of butanol. Recombinant strains of bacteria capable for synthesizing butanol have also been constructed — *Escherichia coli*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium cellulovorans* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

DOI: 10.24263/2225-2924-2023-29-1-4

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ У ВИРОБНИЦТВІ ПЛАСТИФІКАТОРІВ

О. І. Скроцька, К. О. Цвєтков

Національний університет харчових технологій

Ю. М. Пенчук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Пластифікатори використовують при виробництві різних полімерів. Саме вони надають цим матеріалам гнучкості, міцності й еластичності. Для отримання пластифікаторів використовують різні групи сполук, зокрема кислоти, феноли і спирти. Їх можна отримувати як хімічним синтезом, так і з використанням мікроорганізмів. У статті приділена увага саме мікробному синтезу різних сполук, які є основою при виробництві пластифікаторів.

При виробництві пластифікаторів використовують такі органічні кислоти: олеїнову, ліноленову, лінолеву, адипінову тощо. Серед продуцентів цих кислот виділяють бактерії родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, дріжджі *Rhodospiridium*, *Saccharomyces*, гриби *Thamnidium*, *Mucor*, а також мікродорослі *Botryococcus* тощо.

Другу групу сполук, що використовують при виробництві пластифікаторів, складають феноли та їх похідні. Феноли можна отримати при культивуванні рекомбінантних штамів бактерій, зокрема *Escherichia coli*. Серед похідних фенолів для виробництва пластифікаторів використовують метакрезол. Його можна отримати з використанням генно-модифікованих клітин *Saccharomyces cerevisiae* та *Aspergillus nidulans*.

Основною сировиною для виробництва пластифікаторів є спирти — гексанол, гліцерол, бутанол, ізобутанол. Гексанол синтезують як природні, так і рекомбінантні бактерії й дріжджі. Частка використання гексанолу у виробництві пластифікаторів становить 2,5% від загального відсотка спиртів. Гліцерол менше використовують у виробництві пластифікаторів. Частка використання цього спирту — 1,8%. Використання ізобутанолу у виробництві пластифікаторів складає 4,5% від загальної кількості спиртів, що використовуються для цього. Цей спирт отримують при культивуванні рекомбінантних бактерій *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Zytoponas mobilis* дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Найбільший відсоток використання спиртів у створенні пластифікаторів займає бутанол — 36%. Серед природних продуцентів бутанолу виділяють бактерії роду *Clostridium*. Також сконструйовані рекомбінантні штами бактерій, які здатні синтезувати бутанол — *Escherichia coli*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium cellulovorans*, а також дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*.

Ключові слова: пластифікатори, органічні кислоти, феноли, спирти, мікробний синтез.

Постановка проблеми. Пластифікатори займають свою вагому частину у виробничій галузі, що зумовлене їх властивостями і потребою на ринку пластмас,

до складу яких входять пластифікатори, які слугують стабілізуючим фактором усіх пластмас, надаючи цим матеріалам гнучкості, міцності й еластичності. Пластифікатори знижують напругу деформації, твердість, щільність, в'язкість та електростатичний заряд полімеру, при цьому вони одночасно підвищують гнучкість полімерного ланцюга та опір руйнуванню. Упродовж останніх 10—15 років світове виробництво пластифікаторів складало близько 5 млн т на рік. Самі ж пластифікатори використовують при виробництві близько 60 полімерів і більш ніж 30 груп продуктів (Białęcka-Florjańczyk, & Florjańczyk, 2007).

Оскільки пластмасова промисловість постійно розвивається, попит на пластифікатори також зростає. Сучасний ринок пропонує безліч варіантів пластифікаторів з різними характеристиками, які можна вибрати для конкретних застосувань, щоб задовольнити критичні вимоги до матеріалів.

Для отримання пластифікаторів використовують різні групи сполук, зокрема кислоти, феноли і спирти, які можна отримувати як хімічним синтезом, так і мікробним шляхом з використанням про- та еукаріот. При цьому сполуки, які отримують за допомогою мікробного синтезу, є екологічними, а під час культивування мікроорганізмів у складі поживних середовищ часто використовують відходи різних виробництв, що дає змогу отримувати цінні продукти, використовуючи мінімум коштів. Тому **метою цього огляду** є аналіз сучасної наукової літератури щодо продуцентів органічних кислот, фенолів та їх похідних, а також спиртів, які використовуються як основа при виробництві пластифікаторів.

Матеріали і методи. Матеріалами дослідження стали сучасні наукові публікації зарубіжних і вітчизняних вчених у міжнародних та українських виданнях. Проаналізовані публікації стосуються використання різних груп органічних сполук, які можна отримати за допомогою мікроорганізмів для виробництва пластифікаторів. Пошук публікацій здійснювали з використанням світових наукометричних баз даних PubMed та Google Scholar.

Викладення основних результатів дослідження. Для виробництва складноєфірних пластифікаторів використовують різні продукти мікробного синтезу (табл. 1).

Таблиця 1. Речовини мікробного походження для виробництва пластифікаторів

Органічна сполука	Органічні речовини	Група пластифікаторів
Кислоти	Олеїнова кислота	Складноєфірні пластифікатори на основі жирних кислот
	Ліноленова кислота	
	Лінолева кислота	
	Адипінова кислота	Пластифікатори на основі аліфатичних кислот
	Себацінова кислота	
Феноли та їх похідні	Фенол	Фосфоровмісні пластифікатори
	Метакрезол	
Спирти	Гексанол	Складноєфірні пластифікатори на основі спиртів
	Гліцерол	
	Ізобутанол	
	Бутанол	

Розглянемо детальніше окремі групи органічних сполук, що використовуються у виробництві пластифікаторів, а також групи мікроорганізмів, які здатні синтезувати дані сполуки.

Органічні кислоти як основа для виробництва пластифікаторів. Органічні кислоти можна отримувати з використанням мікроорганізмів, які, крім основного цільового продукту, можуть синтезувати спектр інших речовин, що використовуються не тільки у виробництві пластифікаторів, а й в інших галузях промисловості. Перелік продуцентів, що здатні синтезувати органічні кислоти, наведено в табл. 2.

Таблиця 2. **Продуценти органічних кислот**

Продуцент	Тип продуцента	Концентрація кислоти, г/л	Особливості біосинтезу	Джерело
<i>Олеїнова кислота</i>				
<i>Botryococcus braunii</i> UTEX 572	Мікрободорості	0,193	Температура 25 °C, pH 6,7, швидкість перемішування — 100 об/хв, безперервне освітлення	Choi, Kim, Ahn, & Oh, 2011
<i>Botryococcus</i> sp.	Мікрободорості	0,00503	Температура 25 °C, pH 7,0 інтенсивність світла 5200 люкс	Marwani, & Kurniawan, 2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHU3046-4A	Генно-модифікований штам дріжджів	0,424	Температура 30 °C, pH 6,0, перемішування 40 об/хв	Yazawa, Kamisaka, Kimura, Yamaoka, & Uemura, 2011
<i>Ліноленова кислота</i>				
<i>Thamnidium elegans</i> CCF-1465	Природний штам грибів	1,014	Температура 28 °C, pH 6,0, перемішування 180 об/хв	Zikou, Chatzifragkou, Koutinas, & Papanikolaou, 2013
<i>Mucor circinelloides</i> PRR3	Природний штам грибів	0,48	Температура 28 °C, pH 6,5, перемішування 150 об/хв	Shah, Mohamed, Zhang, & Song, 2021
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Природний штам дріжджів	0,633	Температура 28 °C, pH 5,5, перемішування 180 об/хв	Diamantopoulou та ін., 2020
<i>Лінолева кислота</i>				
<i>Bifidobacterium breve</i> 2258	Природний штам бактерій	0,42	Температура 37 °C, pH 6,7, анаеробні умови культивування	Coakley та ін., 2003
<i>Lactobacillus plantarum</i> L3C1E8	Природний штам бактерій	0,01	Температура 30 °C, pH 6,0, анаеробні умови культивування	Ribeiro, Stanton, Yang, Ross, & Silva, 2018

<i>Lactobacillus acidophilus</i> AKU 1137	Природний штам бактерій	4,9	Температура 28 °C, pH 6,5, швидкість перемішування 120 об/хв	Ogawa, Matsumura, Kishino, Omura, & Shimizu, 2001
---	-------------------------	-----	--	---

Як продуценти олеїнової кислоти були досліджені мікрободорості роду *Botryococcus* (Choi, Kim, Ahn, & Oh, 2011; Marwani, & Kurniawan, 2019). Дослідження стосувалося впливу дефіциту джерела азоту в поживному середовищі на ріст та розвиток *Botryococcus braunii* UTEX 572, а також на здатність цих клітин продукувати певний спектр ліпідів у стресових ситуаціях. Автори дослідження встановили ряд концентрацій джерела азоту, при яких спостерігалась найнижча та найвища концентрація внутрішньоклітинних ліпідів, а точніше, жирних кислот, з яких синтезуються ліпіди: найвища концентрація внутрішньоклітинних ліпідів досягається при використанні поживного середовища, в складі якого міститься 0,04 мМ нітрату; найнижча концентрація ліпідів спостерігається при використанні нітрату у кількості 3,66 мМ. При цьому 86% усіх жирних кислот в культуральній рідині складає олеїнова кислота, а експресія гену стеароїл-АСР-десатурази була в 2,6 раза вищою в умовах лімітування джерела азотного живлення, ніж при використанні його достатньої кількості (Choi, Kim, Ahn, & Oh, 2011).

Була досліджена здатність мікрободоростей *Botryococcus* sp. синтезувати жирні кислоти на середовищах, до складу яких входила різна кількість джерела азоту: 5, 28, 55 та 350 мг/л, що призвело до отримання олеїнової кислоти у кількості 2,29%, 24,52%, 26,99% та 8,81% від загальної кількості жирних кислот відповідно. Основною метою дослідження було визначення такої концентрації джерела азоту, при якій буде синтезуватися найбільша кількість жирних кислот, що використовується *Botryococcus* sp. для біоперетворення на біодизель (Marwani, & Kurniawan, 2019).

Водночас науковці з Науково-дослідного інституту біопродукції у Японії для отримання олеїнової кислоти використовували генно-модифікований штам дріжджів *S. Cerevisiae* YHU3046-4A. Для отримання даної кислоти дослідниками було проведено ряд тестів, що включали в себе вирощування дріжджів на поживних середовищах, які містили етанол у концентраціях від 0 до 8%, та визначення такої кількості етанолу, при якій досягається найбільший вихід олеїнової кислоти. В результаті дослідження було визначено, що при використанні 8% спирту в поживному середовищі кількість синтезованої олеїнової кислоти є найбільшою (Yazawa, Kamisaka, Kimura, Yamaoka, & Uemura, 2011).

Для біосинтезу ліноленової кислоти пропонується використовувати дикі штамми грибів *T. Elegans* CCF-1465 та *M. circinelloides* PRR3. Досліджено біотинтетичну здатність *T. Elegans* CCF-1465 синтезувати важливу для медицини та харчової галузі ліноленову кислоту на середовищах, склад яких змінювався для максимізації біосинтезу цієї жирної кислоти. Основним компонентом субстрату, що піддавався зміні, було джерело вуглецевого живлення, що складалося з глюкози і ксилози. Комбінуючи ці речовини та використовуючи тільки одну із них, було визначено, що найвища концентрація ліноленової кислоти 1,014 г/л досягається

на ранній стаціонарній фазі росту при використанні глюкози як єдиного джерела вуглецю, або в суміші з ксилозою, де частка кожного компоненту становить приблизно 50%, що призводить до біосинтезу ліноленової кислоти у концентрації 0,936 г/л. Якщо ж використовувати як єдине джерело вуглецю ксилозу, то концентрація ліноленової кислоти не перевищує 0,339 г/л, що пов'язано з особливостями метаболітичних шляхів біосинтезу кислоти в штаму CCF-1465 (Zikou, Chatzifragkou, Koutinas, & Papanikolaou, 2013).

Вчені з Шаньдунського технологічного університету (Китай) досліджували здатність різних груп грибів синтезувати внутрішньоклітинні ліпіди. Було відібрано 51 зразок з навколишнього середовища, з яких лише 13 мали високий показник біосинтезу ліпідів. Серед цих продуцентів було вибрано штам міцеліальних грибів *M. circinelloides* PRR3, що синтезує найбільшу кількість ліноленової кислоти, решта штамів, хоч і характеризується більшою біосинтетичною здатністю відносно ліпідів, але частка ліноленової кислоти в цих ліпідах є меншою, ніж при використанні штаму PRR3 (Shah, Mohamed, Zhang, & Song, 2021).

Досліджено здатність дикого штаму дріжджів *R. toruloides* DSM 4444 синтезувати ліпіди (в тому числі і ліноленову кислоту) на неочищеному гліцерині в суміші з ксилозою та окремо один від одного, що дало певний спектр результатів: найвищу кількість ліноленової кислоти було синтезовано з використанням гліцерину як єдиного джерела вуглецю — 0,633 г/л; найнижчу концентрацію ліноленової кислоти — 0,055 г/л було отримано на середовищі, в склад якого входило 75% гліцерину та 25% ксилози (Diamantopoulou та ін., 2020).

У виробництві пластифікаторів також використовують лінолеву кислоту, яка синтезується за допомогою бактерій *B. breve* 2258, *L. plantarum* L3C1E8 та *L. Acidophilus* AKU 1137 і використовується переважно у кон'югованій формі. Серед досліджених бактеріальних продуцентів лінолевої кислоти саме клітини *B. Breve* 2258 перетворювали до 65% лінолевої кислоти в необхідну кон'юговану форму. Істотним недоліком цього методу біосинтезу є те, що сама культура не може синтезувати лінолеву кислоту і її необхідно вводити з поживним середовищем (Coakley та ін., 2003).

Також було досліджено здатність молочнокислих бактерій здійснювати біотрансформацію вільної форми лінолевої кислоти в її кон'юговану форму. Автори проаналізували два штами бактерій *L. plantarum*, що вирощувалися в однакових умовах і порівнювалися їхні властивості, зокрема гідрофобність клітинної поверхні, здатність до автоагрегації, вплив на ріст жовчних солей, панкреатину, низького значення рН і здатність синтезувати кон'юговану форму лінолевої кислоти. Найкращим продуцентом виявився штам L3C1E8, що має найвищий показник біосинтезу лінолевої кислоти 0,01 г/л (Ribeiro, Stanton, Yang, Ross, & Silva, 2018).

Крім того, японські вчені провели дослідження стосовно здатності бактерій роду *Lactobacillus* синтезувати кон'юговану форму лінолевої кислоти. Так, природний штам молочнокислих бактерій *L. Acidophilus* AKU 1137 здатний синтезувати цю кислоту в концентрації 4,9 г/л. Висока продуктивність цього штаму щодо кислоти пов'язана з умовами культивування, біосинтетичними шляхами самого штаму та складом поживного середовища. Так, було виявлено, що для біосинтезу лінолевої кислоти необхідне накопичення 10-гідрокси-цис-12-октадекаєнової кислоти та 10-гідрокси-транс-12-октадекаєнової кислоти. Виділена 10-гідрокси-

цис-12-октадекаєнова кислота була перетворена в кон'юговану форму лінолевої кислоти під час інкубації з промитими клітинами штаму АКУ 1137, що свідчить про те, що ця кислота є одним із проміжних продуктів біосинтезу кон'югованої форми лінолевої кислоти. В складі поживного середовища була наявна вільна лінолева кислота. Саме її присутність у культуральній рідині індукує біосинтез кон'югованої форми, про що може свідчити відсоток залученості цього попередника в процесі біосинтезу — 95%, а загальний відсоток синтезованої кон'югованої форми лінолевої кислоти з-поміж інших кислот складає 80%, що й пояснює таку високу її концентрацію в культуральній рідині під кінець культивування (Ogawa, Matsumura, Kishino, Omura, & Shimizu, 2001).

Для створення пластифікаторів на основі жирних кислот необхідна досить велика кількість цих кислот. При цьому мікробний синтез кислот має низьку ефективність (табл. 2). Також слід наголосити на необхідності використання специфічних попередників біосинтезу, що призводить до високих витрат на їх отримання, підвищуючи таким чином вартість самих пластифікаторів. При цьому пластифікатори на основі органічних кислот мають нижчу якість, ніж отримані на основі фенолів і спиртів.

Використання фенолів та їх похідних у виробництві пластифікаторів. Пластифікатори на основі фенолів мають схожі показники еластичності, міцності і якості з пластифікаторами на основі спиртів. Проте відсоток їх використання при виробництві пластифікаторів є досить низьким саме через складність отримання самих фенолів. При цьому феноли можуть бути отримані за допомогою різних груп мікроорганізмів (табл. 3).

Таблиця 3. Особливості біотехнології фенолів та їх похідних

Продуцент	Тип продуцента	Концентрація фенолу, г/л	Особливості біосинтезу фенолу	Джерело
<i>Метакрезол</i>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JHY162	Генно-модифікований штаб дріжджів	0,18	Температура 30 °C, рН 6,7, перемішування 180 об/хв	Hitschler, & Boles, 2019
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A1145ΔSTAΔEM	Генно-модифікований штаб грибів	2,03	Температура 37 °C, рН 6,5, перемішування 250 об/хв	Wang, An, Yao, Meng, & Gao, 2021
<i>Фенол</i>				
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> VLB120Δ5-TPL36	Генно-модифікований штаб бактерій	0,32	Температура 30 °C, рН 7,1, перемішування 200 об/хв	Wynands та ін., 2018

<i>Escherichia coli</i> UY3R:DY1–3, <i>Escherichia coli</i> UY2R:DY2–3	Генно- модифікований штам бактерій	0,283	Температура 37 °С, рН 7,0, перемішування 250 об/хв	Guo та ін., 2019
<i>Escherichia coli</i> PheBL21	Генно- модифікований штам бактерій	3,79	Температура – 25 °С, рН 6,8, перемішування 200 об/хв	Kim, Park, Na, & Lee, 2014

Для отримання фенолів, що будуть використовуватися у виробництві пластифікаторів, можна використовувати різні групи мікроорганізмів, а сам спектр використовуваних фенолів та їх похідних досить значний, але найбільш часто вживаними можна вважати метакрезол і фенол.

Досліджено здатність рекомбінантних дріжджів *S. Cerevisiae* JHY162 синтезувати метакрезол з цукру. При конструюванні генно-інженерного штаму був реалізований гетерологічний шлях, що ґрунтується на декарбоксилюванні полікетидуб-метилсаліцилової кислоти, який є попередником метакрезолу. При цьому концентрація 6-метилсаліцилової кислоти у культуральній рідині досягала понад 2 г/л. Також автори показали, що при надмірній концентрації метакрезолу в культуральній рідині (приблизно при 450—750 мг/л) відбувається пригнічення росту і розвитку дріжджів, що пов'язано з токсичною дією самого метакрезолу (Hitschler, & Boles, 2019).

Показано біосинтез метакрезолу за допомогою грибів *A. nidulans* FGSC A1145ΔSTΔEM, клітини якого споживають крохмаль як джерело вуглецю. Для біосинтезу метакрезолу грибною культурою ген *pat*, що кодує синтазу 6-метилсаліцилової кислоти, і ген *pat G*, що кодує декарбоксилазу 6-метилсаліцилової кислоти коекспресували в клітинах *A. nidulans*. Для підвищення синтезу метакрезолу було застосовано кілька стратегій, включаючи промоторну інженерію, клонування генів та ферментацію з підживленням, що призвело до синтезу метакрезолу у високих концентраціях — 1,29 г/л та 2,03 г/л (Wang, An, Yao, Meng, & Gao, 2021).

Наступним важливим компонентом у виробництві фосфоровмісних пластифікаторів виступає фенол, який можна отримати за допомогою рекомбінантних бактерій. Так, на основі клітин *P. taiwanensis* VLB120, сконструйовано штам псевдомонад, що має здатність синтезувати фенол з використанням відновлюваних джерел вуглецю. Для біосинтезу виключно фенолу було інактивовано численні катаболічні шляхи деградації ароматичних і споріднених сполук, таким чином отримали штам *P. Taiwanensis* VLB120Δ5-TPL36, нездатний рости на 4-гідроксibenзоаті (*ΔproA*), тирозині (*Δhpd*) і хінаті (*ΔquiC*, *ΔquiC1*, *ΔquiC2*). Така маніпуляція була необхідна для ідентифікації певного гену, що сприяє кінатному катаболізму — *quiC2*. Продукція фенолу була забезпечена гетерологічною експресією кодон-оптимізованого та інтегрованого у геном *P. Taiwanensis* гену *Pantoea agglomerans* AJ2985*PaTPL2*, що кодує тирозин-фенол-ліазу. Геномна модифікація ендегенних генів, що кодують *TrpEP290S*, *AroF-1P148L* і *PheAT310I*, і делеція *rykA* підвищили синтез фенолу в 17 разів. Додаткова надекспресія у *P. Taiwanensis* окремих генів *Escherichia coli*, що кодують певні ферменти

(*AroGfbr* та *TyrAfbr*), ще більше посилила концентрацію фенолу у процесі його біосинтезу (Wynands та ін., 2018).

Досліджено здатність генно-модифікованих клітин *E. Coli* синтезувати фенол на середовищі з глюкозою як єдиним джерелом вуглецю. При цьому були створені штами ентеробактерій (*E. coli* UY3R:DY1–3 та *E. coli* UY2R:DY2–3), що мали два незалежні шляхи біосинтезу фенолу через 4-гідроксибензоат і тирозин. При цьому автори показали, що найвища концентрація фенолу в культуральній рідині спостерігається при їх сумісному культивуванні (Guo та ін., 2019).

Синтезують фенол і клітини генно-модифікованого штаму *E. Coli* PheBL21. Надмірна експресія генів, що залучені до шляху біосинтезу тирозину разом із тирозинфенолліазою в клітинах *E. coli*, призвела до здатності бактеріальних клітин синтезувати фенол з глюкози. Під час культивування штаму PheBL21 синтезується попередник фенолу — тирозин, а клітини цього штаму характеризуються високою активністю тирозинфенолліази і стійкістю до високих концентрацій фенолу (Kim, Park, Na, & Lee, 2014).

При використанні органічних кислот, фенолів та їх похідних можна отримувати пластифікатори різної міцності і якості. Основним недоліком використання цих органічних сполук є вища вартість, порівняно з пластифікаторами на основі спиртів, оскільки мікробний синтез кислот, фенолів та їх похідних є дороговартісним через малий вихід цільового продукту, а також необхідність підтримання специфічних умов культивування для надсинтезу цих сполук і високу вартість поживних середовищ порівняно з культивуванням продуцентів спиртів, які можна культивувати на відходах різних виробництв і при цьому отримувати високу концентрацію цільового продукту.

Спирти мікробного походження як основа для хімічного синтезу пластифікаторів. Основною сировиною для виробництва пластифікаторів є спирти, адже саме на їх основі, шляхом конденсації, синтезується 2-етилгексанол, який є складовою частиною більшості пластифікаторів.

Гексанол. Одним зі спиртів, що використовується для виробництва пластифікаторів є гексанол. Частка виробництва пластифікаторів на основі гексанолу складає 2,5% від загального відсотка спиртів, що застосовуються при отриманні пластифікаторів (Wuruch, 2004). Продуценти гексанолу характеризуються синтезом великої кількості побічних продуктів, що пов'язано з метаболічними шляхами біосинтезу гексанолу, зокрема наявністю альтернативних шляхів синтезу відмінних від гексанолу спиртів, що знижує вихід цільового продукту (Kottenhahn, 2021; Phillips, 2015; Cheon, 2014). Для біосинтезу цього спирту використовуються різні штами бактерій роду *Clostridium*, а також штами дріжджів роду *Kluyveromyces* (табл. 4).

Нещодавно був виділений штам *Clostridium carboxidivorans* P7, здатний синтезувати гексанол. Було досліджено вплив різних концентрацій суміші газів $N_2:CO_2:CO:H_2$ на біосинтетичну здатність цього продуцента. Також було визначено лімітуючий фактор біосинтезу гексанолу, зокрема токсичність самого цільового продукту. Експериментальним шляхом автори показали, що додавання олійного спирту як екстрагуючого розчинника і підтримання температури на рівні 30 °C підвищує вихід гексанолу в 2,5 раза. Застосування інших розчинників не дало необхідного результату, а при підвищенні температури до 37 °C взагалі

відміняється позитивний ефект при додаванні олеїнового спирту (Kottenhahn, Philipps, & Jennewein, 2021).

Таблиця 4. Особливості культивування продуцентів спиртів, що можуть використовуватися при виробництві пластифікаторів

Продуцент	Тип продуцента	Джерело вуглецевого та азотного живлення	Концентрація цільового продукту, г/л	Відсоток використання у виробництві пластифікаторів, %	Література
Гексанол					
<i>C. carboxidivorans</i> P7	Природний штам бактерій	Дріжджовий екстракт, хлорид амонію, суміш газів: 65% CO, 15% N ₂ , 15% CO ₂ , 5% H ₂	2,4	2,5	Kottenhahn, Philipps, & Jennewein, 2021
<i>K. marxianus</i> H4TM	Генно-модифікований штам дріжджів	Галактоза, середовище YP	0,15		Cheon та ін., 2014
Гліцерол					
<i>S. cerevisiae</i> 2-1190	Природний штам дріжджів	Меляса	80	1,8	Wang, Zhuge, Fang, & Prior, 2001
<i>D. tertiolecta</i> LB-999	Мікророзрості	Середовище ATCC-1174 DA	5,8		Chow та ін., 2013
<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Генно-модифікований штам бактерій	Середовище BG11	1,3		Hirokawa, Maki, Tatsuke, & Hanai, 2016
<i>C. magnoliae</i> ІB (NRRL YB4226)	Природний штам дріжджів	Глюкоза, дріжджовий екстракт, сечовина	85,0		Sahoo, & Agarwal, 2001
Ізобутанол					
<i>E. coli</i> BLpLISOpntAB	Генно-модифікований штам бактерій	Глюкоза, дріжджовий екстракт	2,4	4,5	Song та ін., 2020
<i>C. glutamicum</i> iBALPK-4	Генно-модифікований штам бактерій	Глюкоза, сечовина, дріжджовий екстракт	20,7		Hasegawa, Jojima, Suda, & Inui, 2020

Продовження таблиці 4

<i>S. cerevisiae</i> YEZ167-4	Генно-модифікований штам дріжджів	Глюкоза, дріжджовий екстракт	8,5	4,5	Zhao та ін., 2018
<i>Z. mobilis</i> ZM4	Генно-модифікований штам бактерій	Глюкоза, дріжджовий екстракт	4,0		Qiu та ін., 2020
<i>E. coli</i> BFA7.001(DE3) pCT13	Генно-модифікований штам бактерій	Глюкоза, дріжджовий екстракт	1,9		Trinh, Li, Blanch, & Clark, 2011
Бутанол					
<i>C. saccharobutylicum</i> DSM 13864	Природний штам бактерій	Гідролізат водоростей	8,05	36	Gao, Orr, & Rehmann, 2016
<i>C. beijerinckii</i> YBS3	Природний штам бактерій	Глюкоза, дріжджовий екстракт	12,32		Zhou та ін., 2020
<i>C. acetobutylicum</i> PTCC 1492, <i>Nesterenkonia</i> sp. F	Природні штами бактерій	Глюкоза, дріжджовий екстракт	13,6		Ebrahimi, Amiri, Asadol-lahi, & Sho-jaosadati, 2020
<i>C. saccharoperbutyla-cetonicum</i> N1-4	Природний штам бактерій	Глюкоза, масляна кислота	11,9		Zhou, Liu, &Yuan, 2020
<i>E. coli</i> BuT-3EA	Генно-модифікований штам бактерій	Глюкоза, середовище M9Y	6,2		Saini, Hong Chen, Chiang, & Chao, 2015
<i>E. coli</i> BW25113	Генно-модифікований штам бактерій	Глюкоза, середовище TB	30		Ferreira, Pereira, Wahl, & Rocha, 2020
<i>S. cerevisiae</i> UFMG-CM-Y267	Генно-модифікований штам дріжджів	Глюкоза, гідролізат шротів субпродуктів	0,042		Santos, Azam-buja, Avila, Pacheco, & Goldbeck, 2020
<i>C. acetobutylicum</i> YM1	Природний штам бактерій	Гідролізат рисових висівок	5,9		Al-Shorgani та ін., 2019
<i>C. cellulovorans</i> DSM 743B	Генно-модифікований штам бактерій	Лужний екстракт качанів кукурудзи	3,47		Bao та ін., 2021
<i>C. cellulovorans</i> 743B, <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	Природні штами бактерій	Лужний екстракт качанів кукурудзи	8,3	Wen та ін., 2014	

<i>C. tyrobutyricum</i> (Δack)-pTBA	Генно-модифікований штамп бактерій	Гідролізат лущиння сої	15,7	36	Yu, Xu, Tang, & Yang, 2015
<i>C. acetobutylicum</i> SS-2	Природний штамп бактерій	Житній затоп	11,2		Скроцький, Хоменко, Войчук, & Підгорський, 2018

Показано здатність до синтезу гексанолу рекомбінантних дріжджів *Kluveromyces marxianus* H4TM. Клітини дріжджів модифікували шляхом інтеграції п'яти комбінацій семи генів — *AtoB* (кодує ацетил-КоА-ацетилтрансферазу), *BktB* (кодує β-кетотіолазу), *Crt* (кодує кротоназу), *Hbd* (кодує 3-гідроксибутирил-КоА-дегідрогеназу), *MCT1* (кодує трансацилазу), *Ter* (кодує транс-еноіл-КоА-редуктазу) та *TES1* (кодує ацил-КоА-тіоестеразу), за рахунок чого штамп H4TM синтезує гексанол у концентрації 0,15 г/л. Для отримання цих генів використовували штамми *E. coli* (для отримання гену *AtoB*), *Ralstonia eutropha* (для отримання гену *BktB*), *Clostridium acetobutylicum* (для отримання генів *Crt* і *Hbd*), *Treponema denticola* (для отримання гену *Ter*), *S. cerevisiae* (для отримання гену *MCT1*), ген *TES1* міститься у геномі дріжджів *K. Marxianus* (Cheon та ін., 2014).

Використання цих продуцентів і їх технологій біосинтезу гексанолу дає змогу отримати цільовий продукт у відносно невисокій концентрації (табл. 4). Це пояснюється тим, що природних мікроорганізмів, які можуть синтезувати цей спирт у високих концентраціях, поки не виявлено, а ті, що відомі, синтезують гексанол лише як частину широкого спектра різноманітних вторинних метаболітів.

Гліцерол. Іншим спиртом, що використовується для синтезу пластифікаторів, є гліцерол (табл. 4). Частка використання цього спирту у виробництві пластифікаторів становить 1,8% (Wyrych, 2004). Як продуценти гліцеролу можна використовувати представників прокаріотичних культур і еукаріотичних організмів (Sahoo, 2001; Wang, 2001; Chow, 2013; Hirokawa, 2016; Semkiv, 2020).

Досліджено кілька стратегій біосинтезу гліцеролу на вуглеводневій сировині з використанням дріжджів: утворення комплексу між ацетальдегідом і бісульфіт-іонами, що уповільнює вироблення етанолу та відновлює окислювально-відновний баланс шляхом синтезу гліцеролу; вирощування дріжджів при значеннях рН близько 7 або вище; використання осмотолерантних дріжджів. Найкращою стратегією виявилася остання, що включає в себе використання осмотолерантних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* 2-1190, при культивуванні яких можна отримати до 130 г/л гліцеролу. Але досягнення такої концентрації можливо лише при використанні лабораторних методів ферментації, в промислову масштабі найбільша концентрація гліцеролу становить 80 г/л, де як субстрат виступає м'яса (Wang, 2001; Semkiv, 2020).

Досліджено здатність до синтезу гліцеролу мікроводоростей *Dunaliella tertiolecta* LB-999. Продуцент не потребує генетичних модифікацій і здатний синтезувати гліцерол за допомогою власних систем синтезу. Було виявлено, що клітини

штаму LB-999 синтезують як внутрішньоклітинний (18%), так і позаклітинний (82%) гліцерол навіть при мізерній концентрації поживних речовин і у фазі загибелі клітини (Chow та ін., 2013).

Створено генно-модифікований штам ціанобактерій *Synechococcus elongatus* PCC 7942, клітини якого синтезують гліцерол. Продуцент культивували з додаванням вітаміну B₁₂ і без нього. В результаті було виявлено, що наявність цього вітаміну суттєво не впливає на вихід гліцеролу, оскільки генетичні маніпуляції, що були проведені над цим штамом, дають змогу клітинам *S. elongatus* PCC 7942 синтезувати гліцерол незалежно від наявності вітаміну B₁₂. Також було проведено ряд дослідів, що були направлені на встановлення оптимальної концентрації вуглекислого газу для інтенсифікації біосинтезу гліцеролу. В результаті було встановлено, що при подачі 3% газу концентрація спирту в культуральній рідині була найвищою — 1,3 г/л (Hirokawa, Maki, Tatsuke, & Hanai, 2016).

Проведені дослідження стосовно впливу умов культивування на вихід гліцеролу при використанні осмофільних дріжджів *Candidamagnoliae* I2B NRRLYB-4226. У результаті було виявлено, що на біосинтез гліцеролу впливають такі фактори: початкова концентрація глюкози, яка суттєво впливає на ріст самої культури, і її здатність до надсинтезу гліцеролу; через підвищення швидкості росту, споживання глюкози та збільшення кількості виробленого гліцеролу співвідношення C:N необхідно підтримувати у співвідношенні 20:1, оскільки його збільшення призводить до зменшення біосинтезу гліцеролу; для інтенсифікації процесу розчинення кисню швидкість аерації має становити 500 об/хв (Sahoo, & Agarwal, 2001).

Ізобутанол. Наступним спиртом, що використовується у виробництві пластифікаторів, є ізобутанол. Його використання складає 4,5% від загальної кількості спиртів, що використовуються для створення пластифікаторів (Wurpych, 2004). Як продуценти ізобутанолу використовуються різні штами бактерій і дріжджів (Qiu, 2020; Song, 2020; Hasegawa, 2020; Zhao, 2018; Trinh, 2011).

У 2020 р. створено генно-інженерний штам *Corynebacterium glutamicum* iBALPK-4, який при нестачі кисню здатний синтезувати досить велику кількість ізобутанолу. Для інтенсифікації процесу біосинтезу було проведено оптимізацію активності кожного ферменту, що бере участь у продукуванні цими бактеріями ізобутанолу: збільшення експресії генів *AHAS* і *KDC*; інактивація гену *pcrA* для зменшення побічного виробництва сукцинату та покращення виходу ізобутанолу; введення гену *EDP* для збільшення споживання глюкози та виробництва ізобутанолу; надекспресія гену *PTS* та інактивація гену *ilvE* для інактивації синтезу побічних продуктів і підвищення продуктивності ізобутанолу (Hasegawa, Jojima, Suda, & Inui, 2020).

Було досліджено вплив світла на синтез ізобутанолу рекомбінантним штамом *Saccharomyces cerevisiae* YEZ167-4. У клітини дріжджів були введені нові генетичні шляхи, що забезпечили перехід клітин від фази росту, яка спостерігалась за наявності світла, до фази біосинтезу спирту, що відбувалась у темряві. В результаті цього з'явилась можливість контролю процесу біосинтезу лише при використанні зміни освітлення в ферментаційному обладнанні (Zhao та ін., 2018).

Сконструйовано штам *Zymomonas mobilis* ZM4, в геномі якого присутній гетеролітичний ген *kdc* *ALactococcus lactis*, що кодує 2-кетоізовалерат декарбокси-

лозу. Також було визначено, що надекспресія гетерологічного гена *als* і двох нативних генів *ilvC* і *ilvD*, які беруть участь у метаболізмі валіну в рекомбінантному штамі ZM4, що експресує *kdcA*, може заблокувати перетворення пірувату на етанол і тим самим привести до біосинтезу ізобутанолу. Встановлено, що рекомбінантні клітини *Z. mobilis* ZM4, що містять синтетичний оперон, *als-ilvC-ilvD*, керований *Ptet*, так і ген *kdcA*, керований конститутивним сильним промотором *Pgap*, синтезують ізобутанол у концентрації до 4г/л (Qiu та ін., 2020).

Клітини рекомбінантного штаму *E. Coli* BFA7.001 (DE3) pCT13 синтезують до 1,9 г/л ізобутанолу. При цьому особливістю процесу з використанням цього штаму є те, що біосинтез ізобутанолу відбувається в анаеробних умовах і при цьому синтезується мінімальна кількість побічних продуктів (Trinh, Li, J., Blanch, & Clark, 2011). На основі клітин *E. coli*, які синтезують ізобутанол, сконструйовано штам BLpLISOpnt AB за рахунок введення в геном клітин гетерологічного синтетичного оперону, що кодує синтез полігідроксибутирату. Введення оперону створило метаболічні переваги для синтезу ізобутанолу за рахунок конкуренції за використання джерела вуглецю через відмінності в силі промоторів. При цьому ізобутанол є екзогенним метаболітом, а полігідроксибутират синтезується в самій клітині, що дає змогу легко розділити ці два продукти (Song та ін., 2020).

Продукти ізобутанолу характеризуються різною біосинтетичною здатністю до продукції цього спирту (табл. 4), що зумовлено особливостями біосинтетичних систем даних клітин. Біосинтез ізобутанолу відбувається лише при певних умовах, які досить важко підтримувати в стабільному стані, і тому під час культивування синтезується певний спектр речовин, що перетягують більшу частину поживних речовин на власний біосинтез, не дозволяючи таким чином отримати ізобутанол у великих концентраціях.

Бутанол. Вищеназвані спирти використовуються для створення пластифікаторів лише в малій кількості, що робить масштабування їх виробництва на промисловий рівень не вигідним. Найбільший відсоток використання спиртів у створенні пластифікаторів (майже 36%) займає бутанол (Wuruch, 2004). Для культивування продуцентів бутанолу можна використовувати різні поживні середовища, що можуть складатися з набору певних відомих речовин (глюкоза, гліцерин, різні солі тощо), або з комплексних субстратів невизначеного складу (екстракти, гідролізати тощо).

У дослідженнях з біосинтезу бутанолу дослідники часто використовують середовища визначеного складу, а продуцентами бутанолу виступають переважно різні представники роду *Clostridium* (табл. 4), а також генно-модифіковані штами *Escherichia coli* (Gao, 2016; Saini, 2015; Zhou, 2020; Ebrahimi, 2020; Ferreira, 2020) та *Saccharomyces cerevisiae* (Потапенко, & Скроцька, 2020). Але використання дорогих синтетичних середовищ для культивування продуцентів бутанолу є невиправданим, тому що концентрація цього спирту не така висока, як при використанні середовищ з природними компонентами (Скроцький, 2018). До речі, вони характеризуються відновлюваністю, дешевизною і високим ступенем засвоєння штамми клостридій, для яких така сировина є типовою. У дикій природі ці мікроорганізми якраз і використовують як субстрат такі джерела вуглецю. Саме тому в них розвинулися певні механізми, що дають змогу швидко перероблювати

природні субстрати в поживні речовини, які надалі включаються у метаболізм клостридіальних клітин.

Так, досліджено здатність клітин *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 до синтезу бутанолу. При цьому як джерело вуглецю використовували гідролізат водоростей, які обробляли гексаном. У результаті вивільнявся великий спектр вуглеводів, які використовувались штамом DSM 13864 для росту та біосинтезу спирту. Така технологія потребувала детоксикації через підвищену кислотність після гідролізу. Автори також перевірили біосинтетичні можливості клостридій при культивуванні на середовищі з використанням гідролізату водоростей без попередньої детоксикації. В результаті концентрація бутанолу зменшилася на 17% (Gao, Ott, & Rehmann, 2016).

В іншому дослідженні автори оптимізували склад поживного середовища та умови культивування клостридій *Clostridium beijerinckii* YBS3. При цьому дослідили вплив окремих концентрацій різних джерел вуглецю на вихід бутанолу при вирощуванні штаму YBS3 (Zhou та ін., 2020). Встановлено вплив різних концентрацій глюкози та масляної кислоти в складі поживного середовища на біосинтез бутанолу при культивуванні штаму *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (Zhou, Liu, & Yuan, 2020).

Проведені дослідження стосовно здатності клостридій продукувати бутанол в присутності кисню. В результаті було виявлено, що штами клостридій не можуть рости в присутності кисню, але при спільному культивуванні двох штамів *Clostridium acetobutylicum* PTCC 1492 та *Nesterenkonia* sp. F можна досягти певної стабільності процесу навіть у присутності кисню. Штам *Nesterenkonia* sp. F, здатний синтезувати бутанол, споживає кисень з атмосфери, виробляючи таким чином бутанол та інші метаболіти, що можуть бути засвоєні і перероблені штамом клостридій. У результаті концентрація бутанолу в культуральній рідині становила 13,6 г/л (Ebrahimi, Amiri, Asadollahi, & Shojaosadati, 2020).

Серед рекомбінантних продуцентів бутанолу досліджені штами *Escherichia coli* BuT-3EA та *Escherichia coli* BW25113. Ці продуценти культивують на відносно дорогих комплексних середовищах, але при цьому концентрація самого бутанолу в культуральній рідині є досить високою — 30 г/л для штаму BW25113 (Saini, 2015; Ferreira, 2020).

Альтернативним варіантом біосинтезу бутанолу є використання як субстратів різноманітних відходів. Це економічно вигідно, оскільки вартість відновлюваних компонентів відносно низька. Також використання відходів у біотехнології бутанолу є екологічно доцільним.

Як біологічні агенти, що використовуються для біопереробки відходів різних виробництв та біосинтезу бутанолу, використовують природні штами та генномодифіковані клітини клостридій і дріжджів. Ці продуценти здатні засвоювати поживні речовини з різних гідролізатів і шротів, що виступають єдиним джерелом вуглецю та азоту, оскільки клостридії можуть рости навіть при відносно невеликих концентраціях необхідних мікроелементів. Головною умовою для їх продуктивного росту і розвитку є повна відсутність кисню у ферментаційному середовищі, тому що вони належать до облигатних анаеробів. Також конструюють рекомбінантні штами дріжджів, що здатні синтезувати бутанол та рости на середовищах, в складі яких є відходи різних виробництв, але при цьому концен-

трація спирту в культуральній рідині є надто низькою (Wen, 2014; Wen, 2019; Al-Shorgani, 2019; Bao, 2021; Santos, 2020).

Розроблено технологію культивування клостридій (*Clostridium acetobutylicum* SS-2 і *Clostridium acetobutylicum* SS-5) для одержання бутанолу, де як джерела вуглецю й азоту використовують житній затор. Вказані штами не піддавалися генетичним маніпуляціям і були виділені з навколишнього середовища: штам SS-2 — з курячого посліду, а штам SS-5 — із силосних ям. Найвища концентрація бутанолу при культивуванні обох штамів досягається при значенні pH, що є близьким до нейтрального — 6,5). Клітини *C. acetobutylicum* SS-2 і *C. Acetobutylicum* SS-5 синтезують відносно велику кількість бутанолу в культуральній рідині, не продукуючи при цьому велику кількість побічних продуктів, що вигідно виділяє ці штами з-поміж інших клостридій (Скроцький, Хоменко, Войчук, & Підгорський, 2018).

Як джерело вуглецю під час біосинтезу бутанолу можна використовувати гідролізат лушпиння сої (Пирог, Скроцька, & Скроцький, 2019), який отримують шляхом кислотного гідролізу лушпиння сої соляною кислотою при 121 °C. При культивуванні *Clostridium tyrobutyricum* (Δack)-pTBA на середовищі з цим джерелом вуглецю синтезується бутанол у концентрації 15,7 г/л (Yu, Xu, Tang, & Yang, 2015).

Перелік перспективних продуцентів спиртів, які використовуються у виробництві пластифікаторів, наведено в табл. 4.

При культивуванні продуцентів бутанолу може синтезуватися певна кількість ізобутанолу, який можна використовувати для отримання бутанолу шляхом ізомеризації, що підвищує цінність цього побічного продукту порівняно з іншими спиртами, які синтезуються під час культивування різних штамів клостридій. Так, під час культивування *Clostridium beijerinckii* YBS3 та *Clostridium tyrobutyricum* Δcat1:adhE2 синтезується ізобутанол у концентрації 2, 5 та 1 г/л відповідно (Zhou, 2020; Wen, 2019).

Отже, серед усіх спиртів, які є основою при виробництві пластифікаторів, слід виділити бутанол, природні продуценти якого синтезують його у високих кількостях. Також у процесі культивування продуцентів бутанолу можливий синтез ізобутанолу, який можна використовувати для отримання саме бутанолу. При цьому пластифікатори на основі бутанолу характеризуються високою міцністю, еластичністю та справедливим відношенням ціни до якості з-поміж інших сполук, які використовують при виробництві пластифікаторів.

Висновки

Для виробництва пластифікаторів використовують різні групи сполук — органічні кислоти, феноли та їх похідні, а також спирти. При цьому спирти найбільш часто використовуються як основа для виробництва пластифікаторів. Під час біосинтезу спиртів з використанням мікроорганізмів їх можна отримувати у високих концентрації, використовуючи при цьому як джерела вуглецю та азоту різні відходи промисловості, що робить біотехнологію спиртів надзвичайно дешевою й екологічною.

Література

Пирог, Т. П., Скроцька, О. І., Скроцький, С. О. (2019). Лігноцелюлозні відходи як сировина для синтезу бутанолу клостридіями. *Наукові праці НУХТ*, 25(1), 16—32. doi: 10.24263/2225-2924-2019-25-1-4.

Потапенко В. В., Скроцька О. І. (2020). Отримання практично цінних сполук з використанням рекомбінантних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Частина 1: синтез етанолу, бутанолу та ізобутанолу. *Наукові праці НУХТ*, 26(5), 41—52. doi: 10.24263/2225-2924-2020-26-5-7.

Скроцький, С. О. (2018). Органовмісні відходи виробництва як субстрати для біосинтезу бутанолу бактеріями роду *Clostridium*. *Наукові праці НУХТ*, 24(2), 34—43. doi:10.24263/2225-2924-2018-24-2-6.

Скроцький, С. О., Хоменко, Л. А., Войчук, С. І., Підгорський, В. С. (2018). Особливості росту та біосинтетична активність сольвентогенних бактерій роду *Clostridium*. *Мікробіол. журн.*, 80(2), 3—13. doi: 10.15407/microbiolj80.02.003.

Al-Shorgani, N. K. N., Al-Tabib, A. I., Kadier, A., Zani, M. F., Lee, K. M., Kalil, M. S. (2019). Continuous butanol fermentation of dilute acid-pretreated de-oiled rice bran by *Clostridium acetobutylicum* YM1. *Sci. Rep.*, 9, 4622. doi: 10.1038/s41598-019-40840-y.

Bao, T., Hou, W., Wu, X., Lu, L., Zhang, X., Yang, S. T. (2021). Engineering *Clostridium cellulovorans* for highly selective n-butanol production from cellulose in consolidated bioprocessing. *Biotechnol. Bioeng.*, 118(7), 2703—2718. doi: 10.1002/bit.27789.

Bialecka-Florjańczyk, E., Florjańczyk, Z. (2007). Solubility of plasticizers, polymers and environmental pollution. T. Letcher (Ed.), *Biology*, Elsevier, New York, pp. 397—407. doi: 10.1016/B978-044452707-3/50024-0.

Cheon, Y., Kim, J.-S., Park, J.-B., Heo, P., Lim, J. H., Jung, G. Y., ..., Kweon, D.-H. (2014). A biosynthetic pathway for hexanoic acid production in *Kluyveromyces marxianus*. *J. Biotechnol.*, 182—183, 30—36. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.04.010.

Choi, G. G., Kim, B. H., Ahn, C. Y., Oh, H. M. (2011). Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.*, 23, 1031—1037. doi: 10.1007/s10811-010-9636-1.

Chow, Y. Y., Goh, S. J., Su, Z., Ng, D. H., Lim, C. Y., Lim, N. Y., ..., Lee, Y. K. (2013). Continuous production of glycerol from carbon dioxide by *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.*, 136, 550—555. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.040.

Coakley, M., Ross, R. P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R., Stanton, C. (2003). Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium species*. *J. Appl. Microbiol.*, 94(1), 138—145. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01814.x.

Diamantopoulou, P., Filippousi, R., Antoniou, D., Varfi, E., Xenopoulos, E., Sarris, D., Papanikolaou, S. (2020). Production of added-value microbial metabolites during growth of yeast strains on media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends. *Microbiology Letters*, 367(10), fnaa063. doi:10.1093/femsle/fnaa063.

Ebrahimi, E., Amiri, H., Asadollahi, M. A., Shojasadati, S. A. (2020). Efficient butanol production under aerobic conditions by coculture of *Clostridium acetobutylicum* and *Nesterenkonia* sp. strain F. *Biotechnol. Bioeng.*, 117(2), 392—405. doi: 10.1002/bit.27221.

Ferreira, S., Pereira, R., Wahl, S. A., Rocha I. (2020). Metabolic engineering strategies for butanol production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, 117(8), 2571—2587. doi:10.1002/bit.27377.

Gao, K., Orr, V., Rehmann, L. (2016). Butanol fermentation from microalgae-derived carbohydrates after ionic liquid extraction. *Bioresour. Technol.*, 206, 77—85. doi:10.1016/j.biortech.2016.01.036.

Guo, X., Li, Z., Wang, X., Wang, J., Chala, J., Lu, Y., Zhang, H. (2019). De novo phenol bioproduction from glucose using biosensor-assisted microbial co-culture engineering. *Biotechnol. Bioeng.*, 116, 3349—3359. doi:10.1002/bit.27168.

Hasegawa, S., Jojima, T., Suda, M., Inui, M. (2020). Isobutanol production in *Corynebacterium glutamicum*: Suppressed succinate by-production by pckA inactivation and enhanced productivity via the Entner–Doudoroff pathway. *Metab. Eng.*, 59, 24—35. doi: 10.1016/j.ymben.2020.01.004.

Hirokawa, Y., Maki, Y., Tatsuke, T., Hanai, T. (2016). Cyanobacterial production of 1,3-propanediol directly from carbon dioxide using a synthetic metabolic pathway. *Metab. Eng.*, 34, 97—103. doi:10.1016/j.ymben.2015.12.008.

Hitschler, J., Boles, E. (2019). De novo production of aromatic m-cresol in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by heterologous polyketide synthases combined with a 6-methylsalicylic acid decarboxylase. *Metab. Eng. Commun.*, 9, e00093. doi: 10.1016/j.mec.2019.e00093.

Kim, B., Park, H., Na, D., Lee, S. Y. (2014). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of phenol from glucose. *Biotechnol. J.*, 9(5), 621—629. doi:10.1002/biot.201300263.

Kottenhahn, P., Philipps, G., Jennewein, S. (2021). Hexanol biosynthesis from syngas by *Clostridium carboxidivorans* P7 — product toxicity, temperature dependence and in situ extraction. *Heliyon*, 7(8), e07732. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07732.

Marwani, E., Kurniawan, I. (2019). Biomass and Algal Oil Productivity with Fatty Acid Profiles of *Botryococcus* Sp. Cultures Under Different Concentrations of Nitrogen. *Indian Journal of Science and Technology*, 12(47). doi: 10.17485/ijst/2019/v12i47/148651.

Ogawa, J., Matsumura, K., Kishino, S., Omura, Y., Shimizu, S. (2001). Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(3), 1246—1252. doi:10.1128/AEM.67.3.1246-1252.2001.

Phillips, J. R., Atiyeh, H. K., Tanner, R. S., Torres, J. R., Saxena, J., Wilkins, M. R., Huhnke, R. L. (2015). Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: Medium development and culture techniques. *Bioresource Technol.*, 190, 114—121. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.04.

Qiu, M., Shen, W., Yan, X., He, Q., Cai, D., Chen, S., ..., Yang, S. (2020). Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for anaerobic isobutanol production. *Biotechnol. Biofuels*, 13, 15. doi:10.1186/s13068-020-1654-x.

Ribeiro, S. C., Stanton, C., Yang, B., Ross, R. P., Silva, C. C. G. (2018). Conjugated linoleic acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* isolated from pico cheese. *LWT-Food Sci. Technol.*, 90, 403—411. doi: 10.1016/j.lwt.2017.12.065.

Sahoo, D. K., Agarwal, G. P. (2001). An investigation on glycerol biosynthesis by an osmophilic yeast in a bioreactor. *Process Biochem.*, 36(8—9), 839—846. doi:10.1016/S0032-9592(00)00291-0.

Saini, M., Hong Chen, M., Chiang, C. J., Chao, Y. P. (2015). Potential production platform of n-butanol in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2015, 27, 76—82. doi: 10.1016/j.ymben.2014.11.001.

Santos, B. A. S., Azambuja, S. P. H., Avila, P. F., Pacheco, M. T. B., Goldbeck, R. (2020). n-Butanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from protein-rich agro-industrial by-products. *Braz. J. Microbiol.*, 2020, 51, 1655—1664. doi: 10.1007/s42770-020-00370-6.

Semkiv, M. V., Ruchala, J., Dmytruk, K. V., Sibirny, A. A. (2020). 100 Years later, what is new in glycerol bioproduction? *Trends Biotechnol.*, 38(8), 907—916. doi:10.1016/j.tibtech.2020.02.001.

Shah, A. M., Mohamed, H., Zhang, Z., Song, Y. (2021). Isolation, characterization and fatty acid analysis of *Gilbertella persicaria* DSR1: A potential new source of high value single-cell oil. *Biomass and Bioenergy*, 151, 106156. doi:10.1016/j.biombioe.2021.106156.

Song, H.-S., Jeon, J.-M., Bhatia, S. K., Choi, T.-R., Lee, S. M., Park, S. L., ..., Yang, Y.-H. (2020). Enhanced isobutanol production by co-production of polyhydroxybutyrate and cofactor engineering. *J. Biotechnol.*, 320, 66—73. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.06.017.

Trinh, C. T., Li, J., Blanch, H. W., Clark, D. S. (2011). Redesigning *Escherichia coli* metabolism for anaerobic production of isobutanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(14), 4894—4904. doi:10.1128/aem.00382-11.

Wang, W., An, C., Yao, Y., Meng, X., Gao, S. S. (2021). De novo biosynthesis and gram-level production of m-cresol in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 105, 6333—6343. doi: 10.1007/s00253-021-11490-w.

Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H., Prior, B. A. (2001). Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnol. Adv.*, 19(3), 201—223. doi:10.1016/s0734-9750(01)00060-x.

- Wen, Z., Ledesma-Amaro, R., Lin, J., Jiang, Y., Yang, S. (2019). Improved n-butanol production from *Clostridium cellulovorans* by integrated metabolic and evolutionary engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85(7), e02560—18. doi: 10.1128/AEM.02560-18.
- Wen, Z., Wu, M., Lin, Y., Yang, L., Lin, J., Cen P. (2014). Artificial symbiosis for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation from alkali extracted deshelled corn cobs by co-culture of *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium cellulovorans*. *Microb. Cell Fact.*, 13, 92. doi: 10.1186/s12934-014-0092-5.
- Wynands, B., Lenzen, C., Otto, M., Koch, F., Blank, L. M., Wierckx, N. (2018). Metabolic engineering of *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 with minimal genomic modifications for high-yield phenol production. *Metab. Eng.*, 47, 121—133. doi: 10.1016/j.ymben.2018.03.011.
- Wypych, G. (2004). Handbook of Plasticizers. ChemTec Publishing.
- Yazawa, H., Kamisaka, Y., Kimura, K., Yamaoka, M., Uemura, H. (2011). Efficient accumulation of oleic acid in *Saccharomyces cerevisiae* caused by expression of rat elongase 2 gene (rELO2) and its contribution to tolerance to alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91(6), 1593—1600. doi:10.1007/s00253-011-3410-4.
- Yu, L., Xu, M., Tang, I.-C., Yang, S.-T. (2015). Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production through co-utilization of glucose and xylose. *Biotechnol. Bioeng.*, 112(10), 2134—2141. doi: 10.1002/bit.25613.
- Zhao, E. M., Zhang, Y., Mehl, J., Park, H., Lalwani, M. A., Toettcher, J. E., Avalos, J. L. (2018). Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production. *Nature*, 555, 683—687. doi:10.1038/nature26141.
- Zhou, Q., Liu, Y., Yuan, W. (2020). Kinetic modeling of butyric acid effects on butanol fermentation by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *New Biotechnol.*, 55, 118—126. doi: 10.1016/j.nbt.2019.10.004.
- Zhou, Z. Y., Yang, S. T., Moore, C. D., Zhang, Q. H., Peng, S. Y., Li, H. G. (2020). Acetone, butanol, and ethanol production from puerariae slag hydrolysate through ultrasound-assisted dilute acid by *Clostridium beijerinckii* YBS3. *Bioresour. Technol.*, 316, 123899. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123899.
- Zikou, E., Chatzifragkou, A., Koutinas, A. A., Papanikolaou, S. (2013). Evaluating glucose and xylose as cosubstrates for lipid accumulation and γ -linolenic acid biosynthesis of *Thamnidium elegans*. *J. Appl. Microbiol.*, 114(4), 1020—1032. doi: 10.1111/jam.12116.