

Е. В. Болотник, А. А. Черешнев, М. А. Титок, Э. И. Коломиец

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* S1, УСТОЙЧИВЫХ К БУТАНОЛУ

Оптимизированы условия химического мутагенеза бактерий *C. acetobutylicum* S1. Показано, что обработка бактериальной культуры, выращенной в течение 8 ч в стандартной синтетической среде MSS, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином в концентрации 50 мкг/мл в цитратном буфере (рН = 5,5) в течение 60 мин при 25 °С позволяет отбирать варианты мутантов, стабильно наследующих признак устойчивости к бутанолу в концентрации 2,5 %. Анализ состава жирных кислот цитоплазматической мембраны выявил наличие 2-гексилциклопропаноктановой кислоты у мутанта, характеризующегося повышенной продукцией бутанола.

Ключевые слова: биобутанол, *Clostridium acetobutylicum*, мутагенез, цитоплазматическая мембрана.

E. V. Bolotnik, A. A. Chereshev, M. A. Titok, E. I. Kolomiets

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

SELECTION OF BUTANOL-RESISTANT MUTANTS OF *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* S1

Conditions were optimized for chemical mutagenesis of bacteria *C. acetobutylicum* S1. It was shown that treatment of bacterial culture pre-grown for 8 hours in standard synthetic MSS medium, with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine at concentration 50 µg/ml in citrate buffer (pH = 5.5) during 60 min at 25 °C allowed to select mutant variants stably inheriting the trait of resistance to 2.5 % butanol. Analysis of fatty acid composition of cytoplasmic membrane has revealed presence of 2-hexylcyclopropane octanoic acid in mutant distinguished by elevated butanol production.

Keywords: biobutanol, *Clostridium acetobutylicum*, mutagenesis, cytoplasmic membrane.

Введение. Биобутанол по ряду характеристик имеет ряд преимуществ перед другими видами биотоплива. В частности, он не гигроскопичен, не летуч, имеет низкую коррозионную активность, близкое к бензину октановое число, в его выхлопах не содержится вредных веществ [1]. Однако процесс ацетонобутиловой ферментации, традиционно осуществляемой бактериями рода *Clostridium*, не рентабелен в связи с низкой продуктивностью используемых штаммов. Ключевым фактором, лимитирующим накопление бутанола в процессе ацетонобутилового брожения, является ингибирование сольвентогенных бактерий продуктами собственного метаболизма и прежде всего бутанолом. Накапливающийся в процессе ферментации бутанол влияет на свойства клеточной цитоплазматической мембраны. Воздействуя на «ионные каналы», он нарушает протонный (ΔpH) и электрохимический ($\Delta \psi$) градиенты, ингибирует мембранные АТФазы, приводит к снижению концентрации АТФ в клетке и препятствует поступлению в нее глюкозы [2]. Помимо нарушения поверхностных структур клетки бутанол денатурирует и изменяет конформацию целого ряда функционально важных молекул, в том числе белков, ДНК, РНК и липидов [3]. Все вышеперечисленные эффекты приводят к тому, что уже в концентрации 9–10 г/л бутанол нарушает жизнедеятельность бактерий *C. Acetobutylicum*, а в концентрации 13 г/л вызывает их гибель [4]. В связи с этим при создании штаммов-продуцентов n-бутанола абсолютно необходимым этапом является получение таких вариантов штаммов, которые устойчивы к воздействию продуктов метаболизма и в первую очередь бутанола.

Цель настоящей работы – получение устойчивых к бутанолу мутантов *C. acetobutylicum* S1 с помощью химического мутагенеза.

Материалы и методы исследования. В работе использовали бактерии *C. acetobutylicum* S1, отобранные в результате адаптивной селекции и характеризующиеся повышенной резистентностью к бутанолу (17 г/л). Для культивирования *C. acetobutylicum* использовали среды следующего

состава (г/л): среду Рз (мука ржаная обдирная (крахмалистость 60 %) – 100,0; вода водопроводная – до 1 л; pH $6,5 \pm 0,5$), среду MSS (глюкоза – 30,0; $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ – 3,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 0,8; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; дрожжевой экстракт – 5,0; цистеина гидрохлорид – 0,5; вода дистиллированная – до 1 л, pH $6,8 \pm 0,2$), среду MSA (глюкоза – 20,0; NH_4COOH – 3,0; KH_2PO_4 – 0,7; K_2HPO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015; NaCl – 0,01; дрожжевой экстракт – 5,0; цистеина хлорид – 0,5; бактотриптон – 1,0; вода дистиллированная – до 1 л; pH $6,8 \pm 0,2$).

В лабораторных условиях бактерии хранили в глубинной культуре при +4 °C и поддерживали путем периодических пересевов в жидкой среде MSS.

Для создания анаэробных условий использовали герметичную камеру для чашек Петри AnaeroJar Assembly (AG25) объемом 2,5 л и газогенерирующие пакеты BD GasPak, обеспечивающие снижение концентрации кислорода (≤ 1 об. %) и обогащение атмосферы углекислым газом (≥ 13 об. %).

Мутагенез осуществляли с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина производства Fluka Chemie GmbH, применяя мутаген в концентрации 100 мкг/мл в фосфатном (615 мл/л 1 М K_2HPO_4 , 385 мл/л 1 М KH_2PO_4 , вода дистиллированная – до 1 л, pH 7,0) или цитратном (137 мл/л 0,1 М лимонной кислоты, 363 мл/л 0,1 М цитрата натрия, вода дистиллированная – до 1 л, pH 5,5) буфере.

Титр жизнеспособных клеток бактерий (КОЕ/мл) в культуральной жидкости (КЖ) определяли методом предельных разведений с последующим высевом на агаризованную среду MSS. Учет колоний осуществляли через 48–72 ч культивирования в анаэробной атмосфере при 37 °C.

Выход биомассы определяли весовым методом после высушивания клеток до постоянной массы при 105 °C. Оптическую плотность бактериальной суспензии измеряли с помощью фотокориметра КФК-2-УХЛ4.2 (РФ) при длине волны 590 ± 10 нм.

Процент жизнеспособных бактерий (*A*) после воздействия мутагеном определяли по формуле $A = 100a/c$, где *a* – титр жизнеспособных бактерий после обработки мутагеном, *c* – титр жизнеспособных бактерий до обработки мутагеном. Процент погибших бактерий (*B*) рассчитывали по формуле $B = 100\% - A$.

Активную кислотность (pH) определяли потенциометрически, используя pH-метр HI-221 (HANNA Instruments, Польша).

Липиды из клеточной биомассы экстрагировали методом Фолча в модификации Блайя и Дайэра смесью хлороформа и метанола в соотношении 1:2 по объему [5]. Экстракт липидов высушивали на ротационном испарителе, а затем подвергали метанолизу для получения метиловых эфиров жирных кислот. Качественный и количественный состав последних изучали методом хромато-масс-спектрометрии с помощью газового хроматографа Agilent 6890N с масс-селективным детектором Agilent 5975 Inert в режиме регистрации полного ионного тока (Scan). Интервал масс $m/z = 40$ –750 Да. Колонка – HP-5MS (Agilent 19091S-433 30 м×0,25 мм×0,25 мкм), газ-носитель – гелий. Скорость потока – 0,8 л/мин. Температура испарителя – 250 °C. Для анализа хроматограмм и масс-спектров использовали программное обеспечение Agilent MassHunter Workstation Software version B.01.03 (Agilent Technologies Inc., США).

Продуцирующую способность клостридий определяли путем измерения концентрации растворителей (ацетон, бутанол, этанол) в КЖ бактерий методом газо-адсорбционной хроматографии. Перед проведением анализа пробы КЖ центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 мин. К 1,8 мл осветленной КЖ добавляли 0,2 мл 5 %-ного пропанола. В газохроматографическую колонку вводили 5 мкл полученной смеси. Использовали прибор «Хром-5» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором, стальной колонкой (длина 270 см, внутренний диаметр 4 мм), заполненной пористым полимером Porapak Q 80–100 меш. Температура термостата колонки (изотермический режим) составляла 190 °C в течение 6 мин. Расход газа-носителя (гелия) – 35 мл/мин, температура инжектора и детектора – 250 °C. Идентификацию веществ определяли по относительному времени удерживания с использованием пропанола в качестве внутреннего стандарта. Площади пиков измеряли с помощью цифрового интегратора CI-100A (Чехия). Для количественного определения продуктов брожения предварительно рассчитывали относительный фактор чувствительности для каждого из компонентов смеси:

$$F = A_x[S]/[X]A_s,$$

где F – относительный фактор чувствительности; A_x, A_s – площади пиков определяемого вещества и внутреннего стандарта соответственно; $[X], [S]$ – концентрации определяемого вещества и внутреннего стандарта соответственно.

Концентрацию продуктов рассчитывали по формуле $[X] = A_x[S]/FA_s$.

Результаты и их обсуждение. Для отбора толерантных к бутанолу бактерий *C. acetobutylicum* применяют разные методические подходы. В частности, методы адаптивной селекции, индуцированного мутагенеза, генно-инженерного конструирования позволяют получать штаммы, характеризующиеся повышенной устойчивостью к сольвентам и способностью более эффективно продуцировать бутанол [6]. Ранее в результате адаптивной селекции был отобран штамм *C. acetobutylicum* S1, устойчивый к бутанолу в концентрации 1,7 % [7]. В настоящей работе для увеличения его толерантности к сольвентам использовали метод химического мутагенеза. Следует отметить, что данный методический подход является классическим и знание оптимальных условий для отбора мутантного потомства позволяет эффективно изменить генетические свойства исследуемых бактерий и разработать систему их генетического анализа.

В качестве мутагена использовали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, обладающий по сравнению с аналогами высокой мутагенной активностью при низких концентрациях, что не оказывает значительного влияния на жизнеспособность обрабатываемых бактерий [8].

На первом этапе с целью стандартизации условий проведения экспериментов подбирали синтетическую среду для культивирования *C. acetobutylicum* S1. Испытанные среды MSS и MSA отличались концентрациями солей, источника углерода и энергии, а кроме того, среда MSA содержала бактотриптон. Среды засеивали посевным материалом в объеме 2 %, после чего ставили на брожение в течение 24 ч при температуре 37 °С. Для установления динамики роста бактерий каждый час измеряли показатели оптической плотности культуры и производили высеив на агаризованные среды для определения титра жизнеспособных клеток. На основании полученных данных определяли кинетические параметры роста бактерий (рис. 1).

Как видно из данных, приведенных на рис. 1, для штамма *C. acetobutylicum* S1 удельная скорость роста на среде MSS была в 2,17 раза выше ($\mu_{\max} = 0,52 \text{ ч}^{-1}$, время генерации $g = 1,34 \text{ ч}$), чем

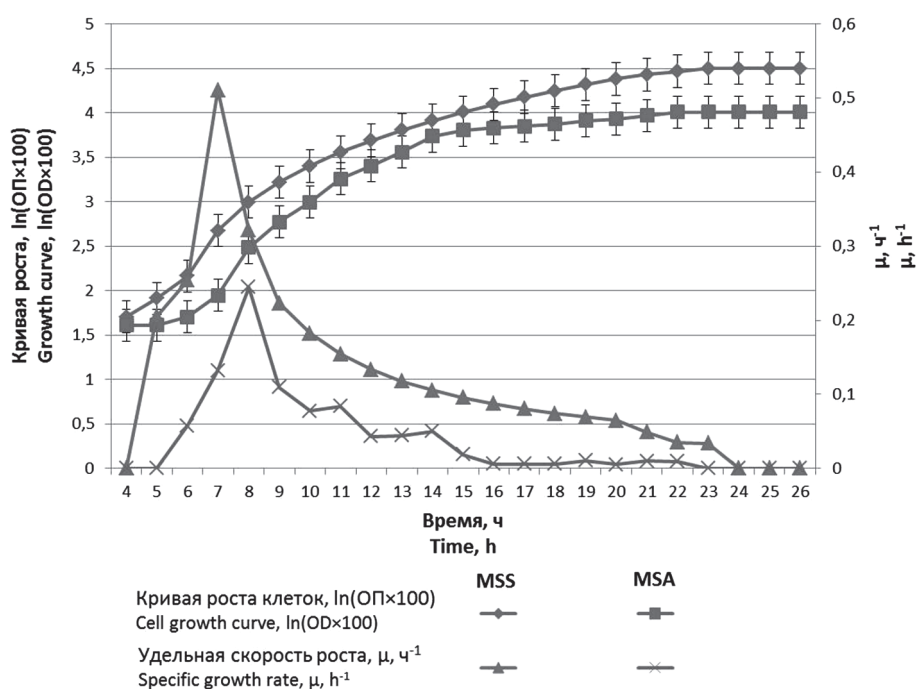


Рис. 1. Показатели роста бактерий *C. acetobutylicum* S1 на селективных средах MSS и MSA

Fig. 1. Growth parameters of bacteria *C. acetobutylicum* S1 on selective media MSS and MSA

на среде MSA ($\mu_{\max} = 0,24 \text{ ч}^{-1}$, время генерации $g = 2,83 \text{ ч}$). Интенсивность накопления биомассы от момента засева бактерий на среды MSS и MSA достигала максимума через 7 и 8 ч соответственно. После этого скорость роста начинала снижаться, а интенсивный прирост биомассы продолжался следующие 8–10 ч. Следует отметить, что плотность популяции бактерий *C. acetobutylicum* S1 в течение логарифмической фазы роста (6–8 ч) была несколько выше на среде MSS. Исходя из полученных данных, для дальнейших исследований использовали синтетическую среду MSS.

Известно, что мутагенная активность N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина зависит от pH-среды, в которой осуществляется мутагенез. Поэтому на следующем этапе работы клетки *C. acetobutylicum* S1 обрабатывали разными концентрациями мутагена в различных буферных системах. Мутагенез осуществляли при следующих условиях: концентрация N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина – 10, 15, 25 и 50 мкг/мл; буферная система – цитратный буфер с pH 5,5, фосфатный буфер с pH 7,0; время обработки бактерий *C. acetobutylicum* S1 – 60 мин [9].

Для оценки эффективности мутагенеза определяли выживаемость бактерий (титр, КОЕ/мл) после мутагенного воздействия. При этом учитывали, что для модельных систем (например, бактерий *E. coli*) самая высокая частота мутирования генетического материала регистрируется при выживаемости бактериальной популяции 0,01 % [10]. Кроме того, показателем эффективности мутагенеза являлось количество клонов, образующихся на плотной агаризованной среде MSS, содержащей 2 % бутанола (количество мутантов, толерантных к бутанолу), а также количество жизнеспособных бактерий через 24 ч культивирования в жидкой среде MSS, содержащей 2 % бутанола. Предполагали, что скорость накопления биомассы в селективной среде напрямую коррелирует с количеством устойчивых к бутанолу жизнеспособных клеток после обработки бактериальной популяции мутагеном.

В результате проведенных экспериментов установлено, что снижение выживаемости клеток при обработке бактериальной культуры мутагеном происходит как в фосфатном (pH 7), так и в цитратном буфере (pH 5,5). Однако только в вариантах с цитратным буфером наблюдалась корреляция между титром жизнеспособных бактерий и концентрацией мутагена (рис. 2). Кроме того, использование при мутагенезе цитратного буфера, в отличие от фосфатного, позволило отобрать на плотной среде MSS, содержащей 2; 2,5 и 3 % бутанола, устойчивые к бутанолу мутанты, а также достигнуть наибольшего накопления биомассы обработанных клеток (концентрация мутагена – 50 мкг/мл, время обработки – 60 мин) при их культивировании в жидкой среде MSS с 2 % бутанола (37 °С, 24 ч), несмотря на наибольшее падение показателя

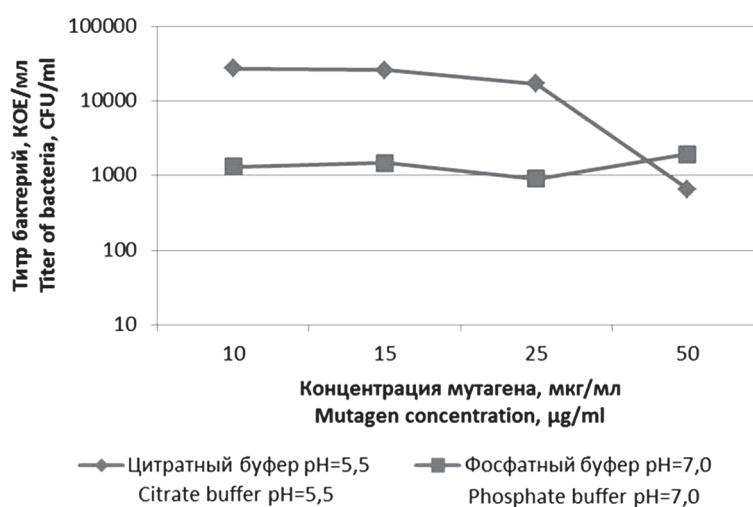


Рис. 2. Титр жизнеспособных клеток бактерий *C. acetobutylicum* после обработки мутагеном в зависимости от его концентрации в цитратном и фосфатном буферах

Fig. 2. Viable cell titer of bacteria *C. acetobutylicum* upon mutagen treatment as a function of its concentration in phosphate and citrate buffers

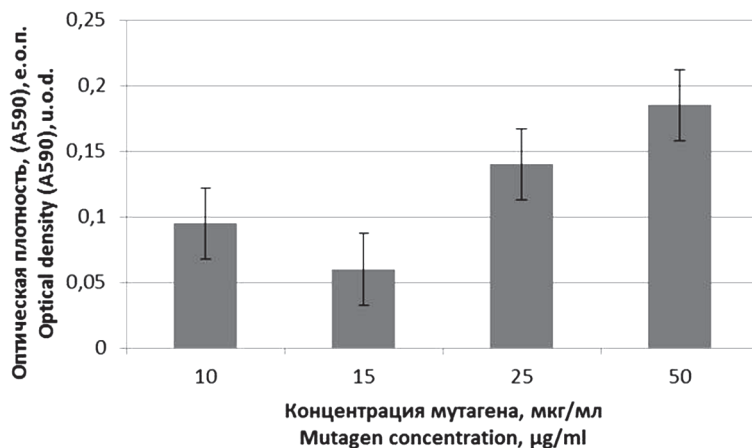


Рис. 3. Влияние концентрации мутагена на накопление биомассы *C. acetobutylicum* через 24 ч культивирования в среде MSS с бутанолом

Fig. 3. Effect of mutagen concentration of accumulation of *C. acetobutylicum* biomass after 24 h fermentation in MSS medium with butanol

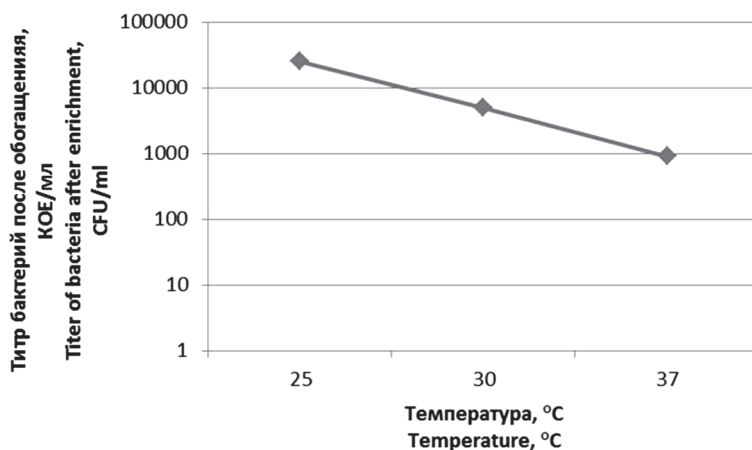


Рис. 4. Влияние температурного фактора на выход мутантов *C. acetobutylicum*, устойчивых к бутанолу

Fig. 4. Effect of temperature on yield of *C. acetobutylicum* mutants resistant to butanol

выживаемости (рис. 3). Таким образом, использованный в эксперименте метод обогащения позволил не только выбрать оптимальную буферную систему и концентрацию мутагена (цитратный буфер, pH 5,5, концентрация мутагена 50 мкг/мл), но и увеличить выход мутантного потомства, устойчивого к бутанолу.

На следующем этапе анализировали влияние температурного фактора на эффективность мутагенеза. Для этого бактериальную суспензию обрабатывали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином в концентрации 50 мкг/мл в цитратном буфере при температуре 25; 30 и 37 °C и высевали на агаризованную среду MSS, содержащую бутанол в концентрации 2,5 и 3,0 %. Как видно из данных, приведенных на рис. 4, наибольший выход мутантов *C. acetobutylicum* S1, устойчивых к бутанолу, наблюдали при температуре 25 °C. При других испытанных температурных режимах выход мутантных бактерий снижался в 10–15 раз.

Таким образом, показано, что наибольший выход мутантов *C. acetobutylicum* S1 наблюдается при их обработке N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином в концентрации 50 мкг/мл в цитратном буфере в течение 60 мин при 25 °C.

Отбор мутантов *C. acetobutylicum* S1, устойчивых к бутанолу, осуществляли в среде MSS, содержащей 2 % бутанола или 500 ммоль/л NaCl. При этом предполагали, что присутствие в среде культивирования высокой концентрации NaCl обеспечит отбор устойчивых к осмотическому

шоку мутантов, которые, согласно литературным данным, характеризуются значительными изменениями состава их мембраны, повышенной толерантностью к бутанолу и способностью продуцировать больше сольвентов [11]. Следует отметить, что любые химические соединения, нарушающие физиологические параметры роста бактерий, являются стрессовыми и могут быть использованы в качестве селективных для отбора мутантов. Поскольку бактерии *C. acetobutylicum* синтезируют целый спектр биологически активных химических соединений (например, уксусную и масляную кислоты, бутанол, этанол, ацетон) и способны противостоять их действию, можно предположить наличие в их геноме систем, обеспечивающих выживание клеток при воздействии на них стрессовых факторов. Такой запас прочности в целом характерен для живых организмов, а для синтезирующих их бактерий он жизненно необходим.

Поскольку в задачу настоящего этапа работы входил отбор бактерий *C. acetobutylicum*, устойчивых к бутанолу, все полученные с использованием метода реплик мутанты были проанализированы на их способность к росту на средах, содержащих различные концентрации бутанола (2; 2,5 и 3 %). Установлено, что из 200 испытанных клонов 26 росли на среде с 3 % бутанола, при этом 22 из них по продукции бутанола не уступали или незначительно превосходили исходный штамм *C. acetobutylicum* S1 и только 4 клон (l, m, n, 3E) характеризовались более низкой продуцирующей способностью (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. **Продуцирующая способность мутантных вариантов *C. acetobutylicum***

Table 1. **Productive capacity of *C. acetobutylicum* mutant variants**

Мутант	Среда для обогащения мутантов	Продукты ацетобутилового брожения, г/л				
		Этанол	Ацетон	Бутанол	Общее к-во растворителей	Масляная кислота
Б4-1	MSS + бутанол (2 %)	1,23	4,76	14,42	20,41	–
7		0,86	3,74	12,20	16,80	–
1G		1,70	5,63	13,57	20,90	–
2G		0,44	4,14	11,32	15,90	–
9G		0,76	5,06	11,94	17,76	–
14G		0,75	5,91	11,25	17,91	–
15G		1,33	5,41	14,31	21,05	–
21G		1,95	5,73	14,13	21,81	–
24G		1,46	6,14	14,73	22,33	–
1H		2,38	5,70	14,19	22,27	–
2H		0,64	3,16	10,80	14,60	0,57
5H		1,53	5,26	15,08	21,87	–
6H		0,86	4,30	10,05	15,21	0,46
7H		1,60	4,91	13,58	20,09	–
8H		1,40	6,06	11,84	19,30	–
9H		1,63	6,21	13,30	21,14	–
a		1,22	6,17	13,50	20,89	–
c		1,06	5,25	13,85	20,16	0,23
e		0,77	3,07	12,07	15,91	–
k		0,76	6,22	14,76	21,74	–
l	0,08	0,81	1,36	2,25	3,18	
m	MSS + NaCl (500 ммоль/л)	–	1,04	0,25	1,29	10,60
n		–	0,71	0,18	0,89	6,99
1E		1,22	5,79	13,74	20,75	–
2E		1,43	6,23	13,61	21,27	–
3E		0,08	0,87	1,49	2,44	5,77
<i>C. acetobutylicum</i> S1 (контроль)		1,75	3,84	12,56	18,15	–

Отобранные бутанолрезистентные клоны с высокой продуцирующей способностью были проверены на стабильность наследования мутантного фенотипа путем их последовательного пересева на селективные среды, содержащие 2, 2,5 и 3 % бутанола (три пассажа). В результате установлено стабильное наследование признака устойчивости к бутанолу в концентрации 2,5 % для 6 высокоактивных мутантных вариантов (1E, 2E, 15G, 24G, 5H, K). Отмечаемая у большинства исследованных мутантов утрата способности наследовать признак устойчивости к бутанолу может быть обусловлена присутствием в бактериальных популяциях различных морфотипов, отличающихся скоростью роста.

Известно, что увеличение количества насыщенных жирных кислот обеспечивает стабилизацию мембранных структур и уменьшает их проницаемость для бутанола [12]. В этой связи представлялось важным определить состав жирных кислот у отобранных мутантов *C. acetobutylicum* S1, способных расти в присутствии 2,5 % бутанола.

Результаты изучения методом хромато-масс-спектрометрии качественного и количественного состава жирных кислот показали, что мутанты отличаются от исходного штамма *C. acetobutylicum* S1 по жирнокислотному составу цитоплазматической мембраны. В частности, для варианта *C. acetobutylicum* 5H выявлено наличие 2-гексилциклопропаноктановой насыщенной жирной кислоты, которая не обнаруживалась у штамма *C. acetobutylicum* S1. Согласно литературным данным, увеличение устойчивости бактерий к растворителям может быть обусловлено изменениями в генах, детерминирующих синтез соединений, входящих в состав клеточных мембран. Так, показано, что введение гена *cfal*, детерминирующего образование циклопропановой кислоты, повышает устойчивость генетически модифицированных бактерий *C. acetobutylicum* к бутанолу [13]. Некоторые различия были характерны и для остальных компонентов клеточной мембраны, что, однако, не приводило к изменению соотношения насыщенных кислот к ненасыщенным (S/U-коэффициента). Напротив, зарегистрированное у мутанта *C. acetobutylicum* 24G увеличение в мембране ненасыщенных жирных кислот вызывало достоверное уменьшение коэффициента S/U (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Жирнокислотный состав липидов клеточных мембран исходного штамма и мутантных вариантов *C. acetobutylicum*, %

Table 2. Lipid fatty acid composition of cell membranes of parent strain and mutant variants of *C. acetobutylicum*, %

Жирная кислота	<i>C. acetobutylicum</i> 24G	<i>C. acetobutylicum</i> 5H	<i>C. acetobutylicum</i> 1E	<i>C. acetobutylicum</i> S1
Насыщенные жирные кислоты				
Миристиновая C _{14:0}	2,79	4,56	4,89	5,13
Пальмитиновая C _{16:0}	47,5	73,22	73,19	75,85
Стеариновая C _{18:0}	3,43	5,84	9,12	4,55
Насыщенные жирные кислоты, содержащие циклопропановое кольцо				
Метил-9,10-метилен-октадекановая C _{19:0}	3,73	6,60	7,29	6,28
2-Гексил-циклопропил-октановая C _{17:0}	0,98	1,71	–	–
Ненасыщенные жирные кислоты				
Пальмитолеиновая C _{16:1}	0,98	1,89	2,28	2,73
Линолевая C _{18:2}	35,5	2,17	2,04	1,98
Олеиновая C _{18:1}	5,07	3,99	3,7	3,48
S/U	1,4	11,4	11,78	11,21

Примечание. S/U – соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот.

Заключение. С помощью оптимизированного метода химического мутагенеза (обработка N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином в концентрации 50 мкг/мл в цитратном буфере (pH 5,5) в течение 60 мин при 25 °C) отобраны мутанты бактерий *C. acetobutylicum* S1, стабильно наследующие признак устойчивости к бутанолу в концентрации 2,5 %. Установлены различия в составе жирных кислот в цитоплазматической мембране между мутантами и исходным штаммом *C. acetobutylicum* S1. В частности, бутанолрезистентность варианта *C. acetobutylicum* 5H может быть обусловлена наличием в составе мембраны 2-гексилциклопропаноктановой насыщенной жирной кислоты, которая не обнаруживалась в мембране исходных бактерий *C. acetobutylicum* S1.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Szulczyk, K. R. Which is a better transportation fuel – butanol or ethanol / K. R. Szulczyk // *Intern. J. of Energy Environment*. – 2010. – Vol. 1, N 1. – P. 501–512.
2. Bowles, L. K. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum* / L. K. Bowles, W. L. Ellefson // *Appl. and Environmental Microbiol.* – 1985. – Vol. 50, N 5. – P. 1165–1170.
3. Nicolaou, S. A. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation / S. A. Nicolaou, S. M. Gaida, E. T. Papoutsakis // *Metabolic Engineering*. – 2010. – Vol. 12. – P. 307–331.
4. Moreira, A. R. Butanol toxicity in the butylic fermentation / A. R. Moreira, D. C. Ulmer, J. C. Linden // *Biotechnol. Bioeng. Symp.* – 1981. – Vol. 11. – P. 567–579.
5. Мэдди, Э. Биохимические исследования мембран / Э. Мэдди. – М.: Мир, 1979. – 300 с.
6. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms / T. Ezeji [et al.] // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* – 2010. – Vol. 85, N 6. – P. 1697–1712.
7. Investigation of factors determining stress resistance of solventogenic bacteria strain *Clostridium acetobutylicum* derived by adaptive selection method / A. V. Balotnik [et al.] // 6th Congress of European Microbiologists (FEMS Congress), Maastricht, 2015. – P. 2302.
8. Mandell, J. D. Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Neurospora crassa* / J. D. Mandell, J. A. Greenberg // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1960. – Vol. 3. – P. 575–577.
9. Bowring, S. N. Mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum* / S. N. Bowring, J. G. Morris // *J. Appl. Bacteriol.* – 1985. – Vol. 58. – P. 577–584.
10. Adelberg, E. A. Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12 / E. A. Adelberg, M. Mandel, G. C. C. Chen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1965. – Vol. 18. – P. 788–795.
11. Salt selection of microbial mutants to increase bioproduct tolerance, titer, or osmotic shock tolerance: pat. US8372598, USA: IPC C12P1/04, C12Q1/02, C12N1/20, C12P21/06 / Jeanette M. Mucha; publ. date: 12.02.2013.
12. Vollherbst-Schneck, K. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 / K. Vollherbst-Schneck, J. A. Sands, B. S. Montencourt // *Appl. Environmental and Microbiol.* – 1984. – Vol. 47, N 1. – P. 193–194.
13. Grogan, D. W. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria / D. W. Grogan, J. E. Jr. Cronan // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997. – Vol. 61, N 4. – P. 429–441.

References

1. Szulczyk, K. R. (2010), “Which is a better transportation fuel – butanol or ethanol”, *International Journal of Energy Environment*, vol. 1, no. 1, pp. 501–512.
2. Bowles, L. K. and Ellefson, W. L. (1985), “Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 50, no. 5, pp. 1165–1170.
3. Nicolaou, S. A., Gaida, S. M. and Papoutsakis, E. T. (2010), “A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation”, *Metabolic Engineering*, vol. 12, pp. 307–331.
4. Moreira, A. R., Ulmer D. C. and Linden, J. C. (1981), “Butanol toxicity in the butylic fermentation”, *Biotechnology Bioengineering Symposium*, vol. 11, pp. 567–579.
5. Maddy, A. (1979), “Biochemical analysis of membranes”, Mir, Moscow, RU.
6. Ezeji, T., Milne, C., Price, N. D. and Blaschek, H. P. (2010), “Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, no. 6, pp. 1697–1712.
7. Balotnik, A., Litvinovich N. E., Kirpicheva T. E., Kolomiets E. I. and Titok, M. A. (2015), “Investigation of factors determining stress resistance of solventogenic bacteria strain *Clostridium acetobutylicum* derived by adaptive selection method”, *6th Congress of European Microbiologists (FEMS Congress)*, Maastricht, AN, 7–11 June 2015, p. 2302.
8. Mandell, J. D. and Greenberg, J. A. (1960), “Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Neurospora*”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 3, pp. 575–577.
9. Bowring, S. N. and Morris, J. G. (1985), “Mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum*”, *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 58, pp. 577–584.
10. Adelberg, E. A., Mandel, M. and Chen, G. C. C. (1965), “Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12”, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, vol. 18, pp. 788–795.
11. Mucha, Jeanette M. (2013), *Salt selection of microbial mutants to increase bioproduct tolerance, titer, or osmotic shock tolerance*, USA: IPC C12P1/04, C12Q1/02, C12N1/20, C12P21/06, Pat. US8372598 B2.
12. Vollherbst-Schneck, K., Sands, J. A. and Montencourt, B. S. (1984), “Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824”, *Applied Environmental and Microbiology*, vol. 47, no. 1, pp. 193–194.
13. Grogan, D. W. and Cronan, J. E. Jr. (1997), “Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 61, no. 4, pp. 429–441.

Информация об авторах

Болотник Елена Валерьевна – канд. биол. наук, заместитель директора. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: bolotnik_allena@mbio.bas-net.by

Черешнев Алексей Александрович – магистрант. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: chereshnev.biochem@gmail.com

Титок Марина Алексеевна – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: litvinovich@mbio.bas-net.by

Коломиец Эмилия Ивановна – чл.-кор., д-р биол. наук, генеральный директор Государственного научно-производственного объединения «Химический синтез и биотехнологии» – директор Института микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

Для цитирования

Получение мутантов *Clostridium acetobutylicum* S1, устойчивых к бутанолу / Е. В. Болотник [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 30–38.

Information about the authors

Bolotnik Elena Valer'evna – Ph. D. (Biol.), Deputy Director. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bolotnik_allena@mbio.bas-net.by

Chereshnev Alexei Alexandrovich – Graduate student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chereshnev.biochem@gmail.com

Titok Marina Alexeevna – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: litvinovich@mbio.bas-net.by

Kolomiets Emiliya Ivanovna – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), General Director of State Scientific-Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology” – Director of Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

For citation

Bolotnik, E. V., Chereshnev, A. A., Titok, M. A. and Kolomiets, E. I. (2017), “Selection of butanol-resistant mutants of *Clostridium acetobutylicum* S1”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 30–38.