

АНОТАЦІЯ
магістерської дисертації студента 6 курсу, групи БТ-61м
спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія
спеціалізації Промислова біотехнологія
Ядрихінського Владислав Сергійовича
на тему «Виділення гену бутанол-дегідрогенази *Clostridium* spp. та
моделювання на його основі продуцента бутанолу»

Магістерська дисертація: 79 с., 24 табл., 13 рис., 85 джерел

Синтез ацетон-бутанол-етанол (АБЕ) продуктів, що відбувається у процесі метаболізму *Clostridium* spp., протягом останнього десятиріччя знову повернувся до фокусу академічних та промислових досліджень. Це пов'язано з обмеженням ресурсів викопного палива та впливу на навколишнє середовище паливних технологій. Тому, створення нових штамів-продуцентів бутанолу та оптимізація умов культивування з використанням більш дешевої сировини як субстрату є актуальним напрямком біотехнологічних досліджень, а попередня метаболічна інженерія *in silico* допомагає виявити найкращі способи досягнення цієї мети.

Магістерська дисертація була виконана як логічне продовження роботи з отримання штаму-продуценту роду *Clostridium* spp. з підвищеним рівнем синтезу бутанолу у ході якої також було визначено нуклеотидну послідовність гену 16S рРНК штаму *C. acetobutylicum* ІМВ В-7407 та побудовано філогенетичне дерево. Тому метою роботи було отримання гену синтезу бутанол дегідрогенази та моделювання штаму-продуценту бутанолу на його основі.

Завданнями дослідження було:

- дослідити умови культивування мікроорганізму *Clostridium acetobutylicum* ІМВ В-7407, що відповідають за підвищене накопичення бутанол-дегідрогенази А
- виділити та очистити ДНК зі *C. acetobutylicum* ІМВ В-7407, що містить досліджуваний ген, провести електрофоретичний та рестрикційний аналіз на наявність гену синтезу бутанол-дегідрогенази
- біоінформаційними методами визначити плазмідні вектори для створення штаму-продуценту з підвищеним накопиченням бутанолу;
- створити модель конструкції вектору для перенесення генетичної інформації в клітину хазяїна, що містить гени стійкості та гени, що відповідають за синтез бутанол-дегідрогенази;
- отримати модель метаболізму нового штаму з надекспресією генів бутанол-дегідрогенази;
- розробити стартап проект з надання послуг, технологія яких представлена у магістерській дисертації

Об'єкт дослідження: технологія виділення та перенесення гену синтезу бутанол дегідрогенази А (*bdhA*) на основі штамів *Clostridium* spp. Предмет дослідження: закономірності виділення та прояву властивостей гену *bdhA*

при горизонтальному перенесенні та створенні штаму-продуценту з підвищеним накопиченням цільового продукту.

В роботі застосовані фізико-хімічні, молекулярно-генетичні, мікробіологічні, біохімічні, статистичні та біоінформатичні методи дослідження, зокрема: електрофорезу, спектрометрії, ампліфікації, трансформації, аналізу балансу потоків метаболізму, математичного моделювання.

Наукова новизна одержаних результатів: У результаті проведеної роботи було отримано препарат ДНК штаму *Clostridium* spp. за модифікованою методикою. Проведений аналіз показав, що було виділено високоочищену (ступінь чистота виділеної тотальної ДНК складає 1,939 за максимальної 2,000) послідовність в 1 кб, що свідчило про отримання гену бутанол-дегідрогенази *bdhA*. Отримано модель штаму-продуценту *Clostridium acetobutylicum* IMB В-7407 з надекспресією гену *bdhA*, надекспресія якого раніше ніколи не розглядалась.

Практичне значення одержаних результатів: отримана модель дозволяє відстежувати експресію гену *bdhA* у відповідний фермент у віртуальному середовищі та може бути використана для побудови найбільш перспективних штамів-продуцентів в лабораторії на базі оцінки результатів впливу генів та їх виключення в комплексі на метаболізм *Clostridium* spp.

Результати дисертації були апробовані й опубліковані на XII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» присвячена 100-річчю з дня народження Артура Корнберга, що була проведена у Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» 20.04.2018, а також у Міжнародній науково-практичній конференції "Актуальні питання сучасної науки" (29-30 квітня 2018 року)

БУТАНОЛ, ДЕГІДРОГЕНАЗА, ВДНА, ПЛАЗМІДА, НАДЕКСПРЕСІЯ, АБЕ, МОДЕЛЬ, FBA

ВИСНОВКИ

Фізико-хімічними та молекулярно-генетичними методами досліджено особливості функціонування гену BDH, який є одним з визначальних факторів продукування бутанолу у складі геному бактерії *Clostridium acetobutylicum* IMB B-7407. Проведення виділення та очищення зазначеного гену для подальшого наукового та практичного використання.

- 1) Встановлено, що підвищення накопичення біомаси на 8% спостерігалась при відборі на 21 годину при культивуванні на поживному середовищі із вмістом гліцерину 100,0 г/л.
- 2) Показано, що ефективним методом виділення ДНК штаму *C. acetobutylicum* IMB B-7407.у максимальній кількості є заморожування (5хв, -80°C)-відтаювання (5хв за 80°C) бактеріальної суспензії у рідкому середовищі.
- 3) За умови виконання встановлених раціональних умов отримується високоочищена тотальна ДНК штаму *Clostridium acetobutylicum* IMB B-7407 (ступінь чистоти 1,939 за максимального 2,000).
- 4) Рестрикційним та електрофоретичним методами підтверджено, що виділена високоочищена ДНК містить послідовність розміром у (1100+-70 пн), яка представляє собою ген бутанол-дегідрогенази *bdhA*, який в подальшому було ампліфіковано в ПЛР за допомогою специфічних праймерів.
- 5) Методи комп'ютерного моделювання Snap Gene дозволяють провести конструювання плазмиди для внесення гену бутанол-дегідрогенази в *Clostridium acetobutylicum* IMB B-7407 на основі модифікованої плазмиди pUC19 *E.coli*.
- 6) Проведене моделювання штаму-продуценту *Clostridium acetobutylicum* з надекспресією гену *bdhA*, виконане методом FBratio, дозволяє відстежувати експресію цього гену у відповідний фермент у віртуальному середовищі.

7) Проведені наукові дослідження можуть слугувати обґрунтуванням розробленого стартап проекту для впровадження послуг з конструювання плазмід для перенесення генів та моделювання впливу цих генів на метаболізм мікроорганізму до якого вони були внесені.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. DeJaco R. F. Absorptive separation of 1-butanol from aqueous solutions using MFI- and FER- type zeolite frameworks: a Monte Carlo study / DeJaco R. F., Bai P., Tsapatsis M., Siepmann J. I. // *Langmuir*. – 2016. – V. 32, № 8. – P. 2093-2101.
2. Solecki M. Advanced biofuel market report 2013. Capacity through 2016. / Solecki M., Scodel A., Epstein B. // California, SF, Environmental Entrepreneur, 2013. Online sources: <https://www.e2.org/ext/doc/E2AdvancedBiofuelMarketReport2013.pdf>
3. Тігунова О. О. Нові штами-продуценти біобутанолу. I. Виділення та ідентифікація [Електронний ресурс] / О. О. Тігунова, С. М Шульга. // *Biotechnologia Acta*. - 2013. - Т. 6, № 1. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2013_6_1_11
4. Актуальні питання сучасної науки (частина III): матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції м. Київ, 29-30 квітня 2018 року. – Київ.: МЦНД, 2018.-5с.
5. DeJaco R. F. Absorptive separation of 1-butanol from aqueous solutions using MFI- and FER- type zeolite frameworks: a Monte Carlo study / DeJaco R. F., Bai P., Tsapatsis M., Siepmann J. I. // *Langmuir*. – 2016. – V. 32, № 8. – P. 2093-2101.
6. Solecki M. Advanced biofuel market report 2013. Capacity through 2016. / Solecki M., Scodel A., Epstein B. // California, SF, Environmental Entrepreneur, 2013. Online sources: <https://www.e2.org/ext/doc/E2AdvancedBiofuelMarketReport2013.pdf>
7. Shang-Tian Y. Final Report: A novel fermentation process for butyric acid and butanol production from plant biomass. / Shang-Tian Y. // 2005. Online sources: http://cfpub1.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/7558/report/F

8. Bruant G. Genomic analysis of carbone monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* Stain p7^T / Bruant G., Levesque M.-J., Peter C., Guiot S. R., Masson L. // Plose ONE. – 2010. – Vol. 5, Iss. 9. – P. 1-12.
9. Lee S. Y. Fermentative butanol production by *Clostridia*. [Review] / Lee S. Y., Park J. H., Jang S. H., Nielsen L. K., Kim J., Jung K. S. // Biotechnology and Bioengineering. – 2008. – V.101, № 2. – P.209-228.
10. Donaldson G.K. Fermentative production of four carbon alcohols / Eliot A. C., Flint D., Maggio-Hall L.-A., Nagarajan V. // 2007. – International Patent WO2007/041269.
11. Kirscher M. n-Butanol. Chemical marker reporter / Kirscher M. // ABI/INFORM Global – 2006. – P. 42
12. Durre P. Biobutanol: An attractive biofuel. / Durre P. // Biotechnol J. – 2007. – V. 2 – P. 1525-1534.
13. Тігунова О.О. Нові штами-продуценти біобутанолу. II. Ферментація лігноцелюлозної сировини / Тігунова О. О., Шульга С. М. // Biotechnol. Acta. – 2014. – Т.7, №4. – С. 54-60.
14. Atsumi S. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels / Atsumi S., Hanai T., Liao J. C. // – Nature. – 2008 – V. 451 – P. 86-90
15. Tsenq K.-N. T. Upgrading ethanol to 1-butanol with a homogeneous air-stable ruthenium catalys / Tsenq K.-N. T., Lin S., Kampf J. W., Szymczak N. // Chem. Commun. – 2016. – V. 52. – P. 2901-2904.
16. Ольховская У. Биотоплива второго поколения: за и против / Ольховская У. // The Chemical Journal. – Декабрь 2008. – С. 38-42.
17. Степаненко П. Из истории биобутанола / Степаненко П. // The Chemical Journal. – Сентябрь 2008 – С. 30-43.
18. Пащенко А. Техничко-економическая оценка двухцелевой переработки картофеля и свеклы с получением биобутанола / А. Пащенко, В. Бирюков, В. Тарасов. // 2009. – Онлайн ресурс: <http://www.vniiesh.ru/publications/Stat/4964.html>

19. Kwon J. H. Feasibility of a facile butanol bioproduction using planetary mill pretreatment / Kwon J. H., Kang H., Sang B.-I., Kim Y., Min J., Mitchell R. J., Lee J. H. // *Bioresource Technology*. – 2016. – V. 199. – P. 283-287.
20. Тігунова О.О. Нові штами-продуценти біобутанолу. I. Виділення та ідентифікація / Тігунова О.О Шульга С. М. // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – V 6., No 1. – P. 97-104
21. George HA, Johnson JL, Moore WEC, Holdeman LV, Chen JS. Acetone, isopropanol, and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Appl Environ Microbiol*. 1983;45(3):1160–1163
22. Ravagnani A, Jennert KCB, Steiner E, Grünberg R, Jefferies JR, Wilkinson SR, Young DI, Tidswell EC, Brown DP, Youngman P, Morris JG, Young M. Spo0A directly controls the switch from acid to solvent production in solvent-forming clostridia. *Mol Microbiol*. 2000;37(5):1172–1185. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02071.x.
23. Gottschal JC, Morris JG. Non-production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* during glucose- and ammonium-limitation in continuous culture. *Biotechnol Lett*. 1981;3(9):525–530. doi: 10.1007/BF00147566.
24. Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET. Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol*. 2002;184(13):3586–3597. doi: 10.1128/JB.184.13.3586-3597.2002.
25. Alsaker KV, Papoutsakis ET. Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*. 2005;187(20):7103–7118. doi: 10.1128/JB.187.20.7103-7118.2005.
26. Woolley RC, Morris JG. Stability of solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture: strain differences. *J Appl Microbiol*. 1990;69(5):718–728.

27. Holt RA, Cairns AJ, Morris JG. Production of butanol by *Clostridium puniceum* in batch and continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1988;27(4):319–324. doi: 10.1007/BF00251761.
28. Junelles AM, Janati-Idrissi R, Petitedemange H, Gay R. Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Curr Microbiol.* 1988;17(5):299–303. doi: 10.1007/BF01571332.
29. Thomas Millat, Klaus Winzer Mathematical modelling of clostridial acetone-butanol-ethanol fermentation [Appl Microbiol Biotechnol.](#) 2017; 101(6): 2251–2271. Published online 2017 Feb 16. doi: [10.1007/s00253-017-8137-4](#)
30. Tashiro Y. High production of acetone-butanol-ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding / Tashiro Y. Takeda K., Kobayashi G., Sonomoto K. // *J. Biotechnol.* – 2005 – V.120, No 2. – P. 192-206.
31. Tashiro Y. High production of acetone-butanol-ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding / Tashiro Y. Takeda K., Kobayashi G., Sonomoto K. // *J. Biotechnol.* – 2005 – V.120, No 2. – P. 192-206.
32. Zigova J. Advances in biotechnological production of butyric acid. / Zigova J., Sturdik E. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – V. 24. – P. 153-160.
33. Bahl H, Andersch W, Braun K, Gottschalk G. Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1982;14:17–20. doi: 10.1007/BF00507998
34. Bahl H, Andersch W, Gottschalk G. Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1982;15:201–205. doi: 10.1007/BF00499955
35. Grupe H, Gottschalk G. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:3896–3902.

36. Meyer C, Papoutsakis E. Increased levels of ATP and NADH are associated with increased solvent production in continuous culture of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1989;30:450–459. doi:10.1007/BF00263849.
37. Jones D, van der Westhuizen A, Long S, Allcock E, Reid S, Woods D. Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microb*. 1982;43:1434–1439.
38. Lee S, Park J, Jang S, Nielsen L, Kim J, Jung K. Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnol Bioeng*. 2008;101:209–228. doi:10.1002/bit.22003.
39. Voget C. E. Butanol production from apple pomace / Voget C. E., Mignone C. F., Ertola R. J // *Biotechnol. Lett.* – 1985. – V. 7. – P. 43 – 46.
40. Sullivan L, Bennett GN. 2006. Proteome analysis and comparison of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Spo0A strain variants. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:298–308. doi:10.1007/s10295-005-0050-7.
41. Sivagnanam K, Raghavan VG, Shah M, Hettich RL, Verberkmoes NC, Lefsrud MG. 2011. Comparative shotgun proteomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* from butanol fermentation using glucose and xylose. *Proteome Sci* 9:66. doi:10.1186/1477-5956-9-66.
42. Hou S, Jones SW, Choe LH, Papoutsakis ET, Lee KH. 2013. Workflow for quantitative proteomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using iTRAQ tags. *Methods* 61:269–276. doi:10.1016/j.ymeth.2013.03.013.
43. Girbal L, Vasconcelos I, Saint-Amans S, Soucaille P. 1995. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol Rev* 16:151–162. doi:10.1111/j.1574-6976.1995.tb00163.
44. Fontaine L, Meynial-Salles I, Girbal L, Yang X, Croux C, Soucaille P. 2002. Molecular characterization and transcriptional analysis of *adhE2*, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for

butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* 184:821–830. doi:10.1128/JB.184.3.821-830.2002.

45. Janssen H, Grimm C, Ehrenreich A, Bahl H, Fischer R. 2012. A transcriptional study of acidogenic chemostat cells of *Clostridium acetobutylicum*—solvent stress caused by a transient n-butanol pulse. *J Biotechnol* 161:354–365. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.03.027.

46. Sivagnanam K, Raghavan VG, Shah M, Hettich RL, Verberkmoes NC, Lefsrud MG. 2011. Comparative shotgun proteomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* from butanol fermentation using glucose and xylose. *Proteome Sci* 9:66. doi:10.1186/1477-5956-9-66.

47. Feist AM, Palsson BO. The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*. *Nat Biotech*. 2008;26:659–667.

48. Reed JL, Vo TD, Schilling CH, Palsson BO. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (*iJR904* GSM/GPR) *Genome biology*. 2003;4:R54.51–R54.12.

49. Oberhardt MA, Palsson BO, Papin JA. Applications of genome-scale metabolic reconstructions. *Molecular systems biology*. 2009;5:320.

50. Thiele I, Palsson BO. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc*. 2010;5:93–121.

51. Feist AM, Herrgard MJ, Thiele I, Reed JL, Palsson BO. Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:129–143.

52. Covert MW, et al. Metabolic modeling of microbial strains *in silico*. *Trends Biochem. Sci*. 2001;26:179–186.

53. Edwards JS, Covert M, Palsson B. Metabolic modeling of microbes: the flux-balance approach. *Environmental Microbiology*. 2002;4:133–140.

54. Price ND, Reed JL, Palsson BO. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:886–897.

55. Becker SA, et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: The COBRA Toolbox. *Nat. Protocols*. 2007;2:727–738.

56. Edwards JS, Ibarra RU, Palsson BO. *In silico* predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat Biotechnol.* 2001;19:125–130.

57. Varma A, Palsson BO. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: I. Synthesis of biosynthetic precursors and cofactors. *Journal of Theoretical Biology.* 1993;165:477–502.

58. Mahadevan R, Schilling CH. The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metabolic engineering.* 2003;5:264–276.

59. Lee S, Phalakornkule C, Domach MM, Grossmann IE. Recursive MILP model for finding all the alternate optima in LP models for metabolic networks. *Comp Chem Eng.* 2000;24:711–716.

60. Edwards JS, Palsson BO. Robustness analysis of the *Escherichia coli* metabolic network. *Biotechnology Progress.* 2000;16:927–939.

61. Edwards JS, Ramakrishna R, Palsson BO. Characterizing the metabolic phenotype: a phenotype phase plane analysis. *Biotechnology and bioengineering.* 2002;77:27–36.

62. Reed JL, et al. Systems approach to refining genome annotation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103:17480–17484.

63. Kumar VS, Maranas CD. GrowMatch: an automated method for reconciling *in silico/in vivo* growth predictions. *PLoS computational biology.* 2009;5:e1000308.

64. Burgard AP, Pharkya P, Maranas CD. Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnology and bioengineering.* 2003;84:647–657.

65. Feist AM, et al. Model-driven evaluation of the production potential for growth-coupled products of *Escherichia coli*. *Metabolic engineering.* 2009

66. Park JM, Kim TY, Lee SY. Constraints-based genome-scale metabolic simulation for systems metabolic engineering. *Biotechnology advances*. 2009;27:979–988.
67. Palsson BO. *Systems biology: properties of reconstructed networks*. New York: Cambridge University Press; 2006.
68. Jung TS, Yeo HC, Reddy SG, Cho WS, Lee DY. WEbcoli: an interactive and asynchronous web application for in silico design and analysis of genome-scale E.coli model. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2009;25:2850–2852.
69. Klamt S, Saez-Rodriguez J, Gilles ED. Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. *BMC systems biology*. 2007;1:2.
70. Lee DY, Yun H, Park S, Lee SY. MetaFluxNet: the management of metabolic reaction information and quantitative metabolic flux analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2003;19:2144–2146.
71. Jones SW, Paredes CJ, Tracy B, Cheng N, Sillers R, Senger RS, Papoutsakis ET. The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biol*. 2008;9:R114. doi: 10.1186/gb-2008-9-7-r114.
72. Senger RS, Papoutsakis ET. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis. *Biotechnol Bioeng*. 2008;101:1036–1052. doi: 10.1002/bit.22010.
73. Senger RS, Papoutsakis ET. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part II. Development of specific proton flux states and numerically determined sub-systems. *Biotechnol Bioeng*. 2008;101:1053–1071. doi: 10.1002/bit.22009.
74. Price ND, Reed JL, Palsson BO. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:886–897. doi: 10.1038/nrmicro1023.
75. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27.

76. Jankowski MD, Henry CS, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V. Group contribution method for thermodynamic analysis of complex metabolic networks. *Biophys J*. 2008;95:1487–1499. doi: 10.1529/biophysj.107.124784.

77. Henry CS, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V. Thermodynamics-based metabolic flux analysis. *Biophys J*. 2007;92:1792–1805. doi: 10.1529/biophysj.106.093138.

78. Senger RS. Biofuel production improvement with genome-scale models: The role of cell composition. *Biotechnol J*. 2010;5:671–685. doi: 10.1002/biot.201000007.

79. Desai RP, Nielsen LK, Papoutsakis ET. Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *J Biotechnol*. 1999;71:191–205. doi: 10.1016/S0168-1656(99)00022-X.

80. Ranganathan S, Suthers PF, Maranas CD. OptForce: an optimization procedure for identifying all genetic manipulations leading to targeted overproductions. *PLoS Comput Biol*. 2010;6:e1000744. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000744.

81. Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. Издательство третье переработанное и дополненное / Слюсаренко Т.П. // М. «Легкая и пищевая промышленность» – 1984. – 208с.

82. NCBI. *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, complete genome. URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AE001437.1?from=3464035&to=3465204>

83. New England BioLabs. URL: <https://www.neb.com/>

84. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria / K. Wilson // Current protocol in Mol. Biol. – 2001. – P. 2.4.1-2.4.5.

85. Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Appl Environ Microbiol*. 1982;44:1318–1324.