

ЗАПИТ
на виконання науково-технічного проєкту

1. Назва науково-технічного проєкту

Розробка лабораторного та напівпромислового регламентів отримання білково-вітамінних концентратів та етанолу з гліцеринової фракції відходів виробництва біодизелю з використанням сконструйованих штамів дріжджів

2. Вид тематики

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

3. Назва цільової програми або цільового проєкту

Науково-технічні проєкти установ НАН України 2021 року

4. Назва розділу програми або напрямку цільового проєкту

8. Новітні біотехнології для охорони здоров'я, фармакології та агропромислового комплексу

5. Строки виконання науково-технічного проєкту 2021 р.

6. Код програмної класифікації видатків

6541030 (прикладні дослідження)

7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

8. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Молекулярні біотехнології створення нових організмів та продуктів для сільського господарства, фармацевтичної та харчової промисловості

9. Код та назва наукового напрямку (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук

н е м а є

10. Науковий керівник науково-технічного проєкту

Сибірний Андрій Андрійович, академік НАН України, д.б.н., проф., директор, Інститут біології клітини НАН України

телефон: +38 032 261 2163; факс: +38 032 261 2148; e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Дмитрук Костянтин Васильович	д.б.н., с.н.с., заступник директора з наукової роботи, ІБК НАН України, тел.: (032)-261-21-63, e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua	
Семків Марта Віталіївна	к.б.н., науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)-261-21-63, e-mail: smarta0309@gmail.com	

12. Установи - співвиконавці

н е м а є

13. Ключові слова

гліцерінова фракція відходів виробництва біодизелю, паливний етанол, кормові дріжджі, білково-вітамінні концентрати

14. Резюме

Виробництво біодизелю є швидко зростаючою галуззю промисловості. Біодизель отримують шляхом переетерифікації різних видів олій метанолом. Цей процес призводить до утворення значної кількості (до 10% від загальної маси) побічного продукту, що містить головним чином гліцерин, а також деякі токсичні домішки (відпрацьований каталізатор, солі, залишковий метанол, метилові ефіри, і вільні жирні кислоти), і тому називається неочищеним або сирим гліцерином. Ефективне використання цієї гліцерінової фракції є важливим для підвищення рентабельності біодизельної промисловості. Неочищений гліцерин може використовуватися як джерело вуглецевого живлення для дріжджів, що продукують органічні кислоти, поліоли, етанол, мікробну олію, каротиноїди, γ -декалактон, поверхнево активні речовини, гетерологічні білки та ін.

У нашій попередній роботі було сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів *Ogataea polymorpha*, що здатні продукувати підвищену кількість етанолу на середовищі з гліцерином ([Kata et al. 2016](#)). Також з колекції штамів мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН України відібрано штами дріжджів *Pachysolen tannophilus*, *Komagataella phaffii* та *Yarrowia lipolytica*, що здатні активно рости на середовищі, яке містить гліцерінову фракцію відходів виробництва біодизелю.

У запропонованому проекті передбачено провести оптимізацію умов культивування штамів дріжджів *O. polymorpha*, *P. tannophilus*, *K. phaffii* та *Y. lipolytica* на середовищі з гліцеріновою фракцією відходів виробництва біодизелю як джерелом вуглецю, масштабувати цей процес та розробити лабораторний і напівпромисловий регламент отримання етанолу та біомаси дріжджів (як джерела білково-вітамінного концентрату) на основі цієї сировини.

Очікувана собівартість отриманих з неочищеного гліцерину паливного етанолу та кормових дріжджів буде нижчою від вартості наявних на ринку аналогів за рахунок дешевизни використаної вихідної сировини. Отримані результати слугуватимуть платформою для впровадження отриманих штамів дріжджів з підвищеним рівнем конверсії сирого гліцерину до етанолу або біомаси у біотехнологічне виробництво на базі нашого партнера ПАТ «Ензим».

15. Обґрунтування доцільності виконання науково-технічного проєкту

15.1. Цілі та завдання роботи, її актуальність, соціальна та економічна значимість.

Біодизель – це рідке біопаливо, що отримується шляхом переетерифікації рослинних олій або тваринних жирів зі спиртом (метанолом або етанолом) ([Fukuda et al. 2001](#)). Біодизель може використовуватися в дизельних двигунах окремо або в суміші з дизельним паливом.

Під час переетерифікації як побічний продукт утворюється фракція, що містить до 80 % гліцерину, а також метанол, солі вищих жирних кислот, іони металів та інші речовини ([Varanda et al. 2011](#)). Ці відходи називають гліцеріновою фракцією або неочищеним (сирим) гліцерином. Вихід гліцерінової фракції становить до 10% від загальної маси продукту, тому на 12,6 л біодизелю отримують 1 кг неочищеного гліцерину ([Dobroth et al. 2011](#)). Через стрімке зростання виробництва

біодизельного палива, до 2020 року очікується, що світове виробництво сирого гліцерину сягатиме 4200 млн. тон ([Okoye and Hameed 2016](#)). Фактично, світовий ринок пересичений пропозиціями продажу неочищеного гліцерину, що призвело до різкого зниження його ціни з \$ 400 за тонну в 2001 році до менш ніж \$ 100 за тонну у 2011 році ([Quispe et al. 2013](#)). Великі виробники біодизелю очищують отриманий сирий гліцерин до хімічно чистої речовини і продають її для використання у харчовій, фармацевтичній або косметичній промисловості. Однак процес очищення сирого гліцерину є досить дорогим і недоступним для малих і середніх виробників біодизелю ([Thompson and He 2006](#)). Оскільки біодизельна промисловість генерує все більше і більше неочищеного гліцерину, постає гостре питання його утилізації. Нерідко гліцеринова фракція зливається у стічні води, що ставить під сумнів «екологічність» виробництва біодизелю. Науковці зі всього світу шукають альтернативні варіанти застосування неочищеного гліцерину. Наприклад, неочищений гліцерин можна спалювати або використовувати як сировину для виробництва більш цінних речовин ([Quispe et al. 2013](#)).

У літературі описано застосування неочищеного гліцерину як додатку до раціону молочних корів ([Chung et al. 2007](#); [DeFrain et al. 2004](#)), свиней ([Kijora et al. 1995](#)), курчат-бройлерів ([Cerrate et al. 2006](#)) і курей-несучок ([Lammers et al. 2008](#)). Thompson і He показали, що неочищений гліцерин, отриманий при переробці рослинної олії в біодизель, може бути використаний як джерело вуглеводів, тоді як неочищений гліцерин, отриманий з відпрацьованої харчової олії, може використовуватися як жирова добавка в кормах для тварин ([Thompson and He 2006](#)). У той же час вчені висловлюють занепокоєння з приводу використання гліцеринової фракції як харчової добавки для тварин, оскільки немає інформації про довгостроковий вплив домішок, що наявні в неочищеному гліцерині, зокрема, метанолу. Натомість неочищений гліцерин може бути використаний для отримання біомаси дріжджів, які без застереження використовуються як кормові добавки для тварин ([Juszczak et al. 2013](#)). Використання при цьому метилотрофних дріжджів дозволить утилізувати залишки метанолу, що містяться в неочищеному гліцерині, зменшуючи небезпеку потрапляння цієї сполуки в корм тварин.

Паливний етанол, отриманий з поновлюваної сировини, може бути використаний як додаток до бензину для зниження викидів автомобілем сірковмісних вихлопних газів. Так званий біоетанол першого покоління виробляється з цукрової тростини, кукурудзи або цукрових буряків. Значні зусилля були спрямовані на розробку рентабельної технології виробництва етанолу другого покоління з лігноцелюлозної сировини ([Kurylenko et al. 2016](#)). Проте застосування такої сировини вимагає складної і дорогої попередньої обробки і ферментативного гідролізу вихідних субстратів ([Li et al. 2018](#)). Саме тому гліцеринова фракція розглядається як недорога сировина, оскільки не потребує попередньої обробки перед початком спиртового бродіння. Оцінюється, що витрати на виробництво етанолу з гліцерину будуть майже на 40% нижчими у порівнянні з, наприклад, виробництвом етанолу з гідролізатів кукурудзи ([Yazdani and Gonzalez 2007](#)).

15.2. Стан розроблення проблеми.

В більшості мікроорганізмів утилізація гліцерину відбувається шляхом дихального метаболізму, тому лише кілька природніх штамів мікроорганізмів здатні перетворювати гліцерин до етанолу ([Yazdani and Gonzalez 2007](#)). Зокрема, повідомлялося, що *Paenibacillus macerans* ([Gupta et al. 2009](#)) і *Enterobacter aerogenes* ([Ito et al. 2005](#)) продукують етанол в анаеробних умовах з очищеного або сирого гліцерину. Також було ізольовано непатогенну бактерію *Kluuyvera cryocrescens*, що була здатна продукувати до 27 г/л етанолу з неочищеного гліцерину при періодичній ферментації в мікроаеробних умовах ([Choi et al. 2011](#)). У деяких бактерій підвищення продукції етанолу з гліцерину було досягнуто шляхом метаболічної інженерії. Рекомбінантний штам *Escherichia coli* з надекспресією генів, що кодують ферменти, задіяні в утилізації гліцерину, продукував 21 г/л етанолу з 60 г/л очищеного гліцерину в мікроаеробних умовах ([Durmin et al. 2009](#)). Рекомбінантний штам *Klebsiella pneumoniae* продукував 25 г/л етанолу з неочищеного гліцерину ([Oh et al. 2011](#)).

Однак бактерії, як продуценти етанолу, мають недоліки: їх ріст може інгібуватися при високій концентрації етанолу та під впливом домішок, що містяться в неочищеному гліцерині, вони можуть піддаватися фаголізу або бути патогенними. Дріжджі є більш надійними продуцентами з точки зору виробництва етанолу в промислових умовах.

Було ізольовано новий вид дріжджів *Pachysolen tannophilus*, здатний ефективно ферментувати ксилозу до етанолу ([Maleszka and Schneider 1982](#)). Згодом виявлено, що *P. tannophilus* може накопичувати 4 г/л етанолу під час аеробного росту на середовищі з гліцерином ([Maleszka et al. 1982](#)). Штам *P. tannophilus* CBS4044 продукував 17,5 г/л етанолу з 5% неочищеного гліцерину в біореакторі при 450 об/хв і продувці повітрям зі швидкістю 0,05 л/хв. Під час періодичної ферментації продукція етанолу сягала 28,1 г/л ([Liu et al. 2012](#)).

Домішки, що містяться в гліцериновій фракції відходів виробництва біодизелю (зола, метанол, солі тощо) не мали негативного впливу на життєздатність і продукцію етанолу в *P. tannophilus* (Liu et al. 2012). Однак було показано, що ріст *P. tannophilus* інгібується етанолом в концентрації 40 г/л (Zhao et al. 2010). Толерантність *P. tannophilus* до етанолу можна підвищити, наприклад через адаптивну еволюцію або УФ-мутагенез з наступним відбором стійких до етанолу штамів (Watanabe et al. 2011).

Також було отримано рекомбінантний штам *Saccharomyces cerevisiae* з надекспресією генів *GCY1*, *DAK1*, *GUP1*, *ADH1* і *PDC1* та делецією генів *GPD2* та *FPS1*, однак такий штам продукував лише 5,4 г/л етанолу з гліцерину (Yu et al. 2012).

Сама дріжджова біомаса є цінним продуктом, оскільки вона може використовуватися як багата поживними речовинами добавка для годівлі тварин. Важливими параметрами, що впливають на харчову цінність кормових дріжджів, є: вміст білка (з рекомендованим рівнем 40-52%), вміст незамінних амінокислот, відносна частка поліненасичених жирних кислот в ліпідах, вміст кальцію, магнію, міді, заліза, цинку і т.д. (Boze et al. 2008).

Було показано, що неочищена гліцеринова фракція може бути використана для виробництва кормових дріжджів *Yarrowia lipolytica* з хорошим виходом і продуктивністю (Juszczuk and Rymowicz 2009). Європейська федерація виробників кормів дозволила продаж кормових дріжджів *Y. lipolytica*, отриманих з неочищеного гліцерину.

Juszczuk зі співавторами серед 21 штамів *Y. lipolytica*, отриманих з різних джерел, відібрали штам S6 з найвищим рівнем накопичення біомаси на середовищі з гліцерином (Juszczuk et al. 2013). Цей штам був використаний для виробництва дріжджової біомаси в біореакторі (при рН 3,5) з чистим гліцерином або сирим гліцерином (у концентрації 25 г/л) як джерелом вуглецю. В результаті було отримано 11,7 г/л біомаси дріжджів із чистого гліцерину і 12,3 г/л із сирого гліцерину. Дріжджова біомаса, отримана на сирому гліцерині, характеризувалася більш високим вмістом білків (42-45%), незамінних амінокислот (45,4 г/100 г білка) і золи (тобто К, Na, Mg, Ca, Cu, Zn) у порівнянні з біомасою, отриманою на чистому гліцерині. Всі зразки біомаси характеризувалися високим вмістом ненасичених жирних кислот. Зразок із неочищеного гліцерину містив більшу кількість лізину, треоніну і фенілаланіну/тирозину, ніж необхідно за стандартами Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН. Однак кількість сірковмісних амінокислот (метіоніну і цистеїну) в біомасі штаму S6 була набагато нижчою, ніж у цілому яйці (стандарт ПСО ООН), що знижувало її харчову цінність. Таким чином, біомаса дріжджів *Y. lipolytica* може бути придатною для виробництва кормів з додаванням зернових культур, які, як відомо, містять високі рівні сірковмісних амінокислот, але незначну кількість лізину, ізолейцину та треоніну. Загалом, можна зробити висновок, що неочищений гліцерин є кращим джерелом вуглецю для продукції біомаси дріжджів *Y. lipolytica*, ніж чистий гліцерин (Juszczuk et al. 2013).

15.3. Досвід і доробок авторів.

Інститут біології клітини має значний досвід в галузі метаболічної інженерії дріжджів для конструювання дріжджових штамів із заданими властивостями, зокрема продуцентів етанолу, рибофлавіну (вітаміну B₂), флавінових нуклеотидів (ФМН та ФАД), глутатіону, гліцерину, ферментів для створення лікарських препаратів (поверхневий антиген вірусу гепатиту В, агрініндеїміназа), створено серію біоселективних елементів які були використані для створення прототипів сенсорів та тест-систем для визначення таких важливих аналітів як глюкоза, етанол, метанол, формальдегід, гліцерин, лактат, сечова кислота.

В нашій лабораторії проводиться активна робота спрямована на дослідження механізмів алкогольної ферментації альтернативних джерел вуглецю (наприклад, ксилози, гліцерину) у *O. polymorpha*. З метою підвищення синтезу етанолу при ферментації ксилози у дріжджів *O. polymorpha* на основі мутантного штаму *O. polymorpha* із пошкодженою здатністю утилізувати етанол було сконструйовано рекомбінантний штам з посиленням експресії генів *XYL1m*, *XYL2*, *XYL3*, *DAS1* та *TAL2* і делецією гена *CAT8*. Під час конструювання цього штаму була також застосована селекція із додаванням у середовище 3-бромпірувату. Сконструйований штам характеризувалися у 40 раз підвищеним виходом етанолу з ксилози порівняно зі штамом дикого типу (Ruchala et al. 2017). З метою підвищення синтезу етанолу при ферментації гліцерину у дріжджів *O. polymorpha* було сконструйовано рекомбінантні штами з посиленням експресії генів *PDC1*, *ADH1*, *FPS1Kp*, *GCY1* та *DAK1* або *PDC1*, *ADH1*, *FPS1Kp*, *GPD1* та *GUT1* що продукували до 15 разів більше етанолу з гліцерину в порівнянні з вихідним штамом (Semkiv et al. 2019). Також співробітники лабораторії мають досвід роботи з дріжджами *P. tannophilus*, *K. phaffii* та *Y. lipolytica*.

Про належний рівень кваліфікації науковців свідчать їх публікації в міжнародних виданнях:

- Nazarko T, Nicaud J-M, Sibirny AA. Observation of the *Yarrowia lipolytica* peroxisome-vacuole dynamics by fluorescent microscopy with a single filter set. *Cell Biol Int*. 2005; 29:65-70.
- Nazarko TY, Huang J, Nicaud J-M, Klionsky DJ, Sibirny AA. Trs85 is required for macroautophagy, pexophagy and cytoplasm to vacuole targeting in *Yarrowia lipolytica* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 2005; 1:37-45.
- Ishchuk OP, Voronovsky AY, Stasyk OV, Gayda GZ, Gonchar MV, Abbas CA, Sibirny AA. Overexpression of pyruvate decarboxylase in the yeast *Hansenula polymorpha* results in increased ethanol yield in high-temperature fermentation of xylose. *FEMS Yeast Res*. 2008;8(7):1164-74.
- Dmytruk OV, Dmytruk KV, Abbas CA, Voronovsky AY, Sibirny AA. Engineering of xylose reductase and overexpression of xylitol dehydrogenase and xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Microb Cell Fact*. 2008 23;7:21.
- Ishchuk OP, Abbas CA, Sibirny AA. Heterologous expression of *Saccharomyces cerevisiae* *MPR1* gene confers tolerance to ethanol and L: -azetidine-2-carboxylic acid in *Hansenula polymorpha*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010;37(2):213-8.
- Grabek-Lejko D, Kurylenko OO, Sibirny VA, Ubiyvovk VM, Penninckx M, Sibirny AA. Alcoholic fermentation by wild-type *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* versus recombinant strains with an elevated level of intracellular glutathione. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38(11):1853-9.
- Kurylenko OO, Ruchala J, Hryniv OB, Abbas CA, Dmytruk KV, Sibirny AA. Metabolic engineering and classical selection of the methylotrophic thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation. *Microb Cell Fact*. 2014;13:122.
- Kurylenko O, Semkiv M, Ruchala J, Hryniv O, Kshanovska B, Abbas C, Dmytruk K, Sibirny A. New Approaches for Yeast Strain Development Involved in Production of the 1st and 2nd Generation Ethanol. *Acta Biochim. Pol*. 2016; 63(1): 31-38.
- Semkiv M, Dmytruk K, Abbas C, Sibirny A. Activation of futile cycles as an approach to increase ethanol yield during glucose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioengineered* 2016; 7 (2): 106-111.
- Abbas CA, Sibirny AA, Voronovsky AY, Ishchuk OP. Alcoholic xylose fermentation at high temperatures by the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. United States Patent 20090155872, Publication Date: 06/18/2009.
- Ruchala J, Kurylenko O, Soontorngun N, Dmytruk K, Sibirny A. Transcriptional activator Cat8 is involved in regulation of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Microb. Cell Fact*. 2017; 16: 36.
- Kata I, Semkiv MV, Ruchala J, Dmytruk KV, Sibirny AA. Overexpression of the genes *PDC1* and *ADH1* activates glycerol conversion to ethanol in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Yeast* 2016; 33: 471-478.
- Semkiv M, Kata I, Ternavska O, Sibirny V, Dmytruk K, Sibirny A. Overexpression of the genes of glycerol catabolism and glycerol facilitator improves glycerol conversion to ethanol in the methylotrophic thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. *Yeast* 2019; 36(5): 329-339.
- Dmytruk O, Bulbotka N, Zazulya A, Semkiv M, Dmytruk K, Sibirny A. Fructose-1,6-bisphosphatase degradation in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* occurs in autophagy pathway. *Cell Biol Int* 2020, online ahead of print.
- Dmytruk O, Bulbotka N, Sibirny A. Degradation of Methanol Catabolism Enzymes of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase in Methylotrophic Yeast *Komagataella phaffii*. *Cytology and Genetics* 2020; 54(5): 393-397.

15.4. Структура досліджень.

В Інституті біології клітини НАН України наявні експериментальна база та досвід працівників, необхідні для успішного виконання запланованих досліджень. Для одержання штамів дріжджів, що здатні рости на середовищі з неочищеним гліцерином та розробки технології отримання етанолу та біомаси дріжджів на основі гліцеринової фракції відходів виробництва біодизелю необхідно провести дослідження у декількох напрямках:

1. Адаптація попередньо отриманого рекомбінантного штаму *O. polymorpha* до росту на середовищі з неочищеним гліцерином (1-2 квартал).

2. Аналіз здатності штамів дріжджів *P. tannophilus*, *K. phaffii* та *Y. lipolytica* до ефективного накопичення біомаси та продукції етанолу на середовищі, що містить гліцеринову фракцію відходів виробництва біодизелю (2-3 квартал).

3. Оптимізація складу середовища та умов культивування для більш ефективного накопичення біомаси та продукції етанолу отриманими штамами дріжджів на середовищі з неочищеним гліцерином (4 квартал).

15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

Наша лабораторія добре оснащена для виконання запропонованих експериментів. В лабораторії наявні центрифуги Sorvall, Eppendorf; спектрофотометр Helios; флуориметр Turner Quantech, системи для електрофорезу ДНК та білків, флуоресцентний мікроскоп Carl Zeiss Axio Imager A1, система HPLC PerkinElmer, Series 2000, електронний та конфокальний мікроскопи, ПЛР ампліфікатор Applied Biosystem 9700, лабораторний ферментер Applicon, роторні качалки New Brunswick, електропоратор ВТХ, електронні ваги, рН метри, хімічні реактиви та матеріали, а також ламінарні шафи, стерильні бокси, автоклав та термостати.

ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

Boze H, Moulin G, Galzy P (2008) Production of Microbial Biomass. In: Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*, vol 9. 2nd edn. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. doi:doi:10.1002/9783527620920.ch5

Cerrate S, Yan F, Wang Z, Coto C, Sacakli P, Waldroupand PW (2006) Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers *International Journal of Poultry Science* 5:1001-1007

Choi WJ, Hartono MR, Chan WH, Yeo SS (2011) Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens* *Applied microbiology and biotechnology* 89:1255-1264 doi:10.1007/s00253-010-3076-3

Chung YH, Rico DE, Martinez CM, Cassidy TW, Noirot V, Ames A, Varga GA (2007) Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles *Journal of dairy science* 90:5682-5691 doi:10.3168/jds.2007-0426

DeFrain JM, Hippen AR, Kalscheur KF, Jardon PW (2004) Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance *Journal of dairy science* 87:4195-4206 doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73564-X

Dobroth ZT, Hu S, Coats ER, McDonald AG (2011) Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia *Bioresource technology* 102:3352-3359 doi:10.1016/j.biortech.2010.11.053

Durnin G, Clomburg J, Yeates Z, Alvarez PJ, Zygourakis K, Campbell P, Gonzalez R (2009) Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli* *Biotechnology and bioengineering* 103:148-161 doi:10.1002/bit.22246

Ferreira C et al. (2005) A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae* *Molecular biology of the cell* 16:2068-2076 doi:10.1091/mbc.E04-10-0884

Fukuda H, Kondo A, Noda H (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils *Journal of bioscience and bioengineering* 92:405-416

Gupta A, Murarka A, Campbell P, Gonzalez R (2009) Anaerobic fermentation of glycerol in *Paenibacillus macerans*: metabolic pathways and environmental determinants *Applied and environmental microbiology* 75:5871-5883 doi:10.1128/AEM.01246-09

Hong WK, Kim CH, Heo SY, Luo LH, Oh BR, Seo JW (2010) Enhanced production of ethanol from glycerol by engineered *Hansenula polymorpha* expressing pyruvate decarboxylase and aldehyde dehydrogenase genes from *Zymomonas mobilis* *Biotechnology letters* 32:1077-1082 doi:10.1007/s10529-010-0259-z

Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N (2005) Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process *Journal of bioscience and bioengineering* 100:260-265 doi:10.1263/jbb.100.260

Juszczuk P, Rymowicz W (2009) Characterization of microbial biomass production from glycerin waste by various yeast strains. In: Aggelis G (ed) *Microbial Conversions of Raw Glycerol*. Nova Science Publishers, New York, pp 125-135

Juszczuk P, Tomaszewska L, Kita A, Rymowicz W (2013) Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production *Bioresource technology* 137:124-131 doi:10.1016/j.biortech.2013.03.010

Kata I, Semkiv MV, Ruchala J, Dmytruk KV, Sibirny AA (2016) Overexpression of the genes PDC1 and ADH1 activates glycerol conversion to ethanol in the thermotolerant yeast *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha* *Yeast* 33:471-478 doi:10.1002/yea.3175

- Kijora C, Bergner H, Kupsch RD, Hagemann L (1995) [Glycerol as a feed component in fattening pigs] *Archiv für Tierernährung* 47:345-360
- Klein M, Islam Z-u, Knudsen PB, Carrillo M, Swinnen S, Workman M, Nevoigt E (2016) The expression of glycerol facilitators from various yeast species improves growth on glycerol of *Saccharomyces cerevisiae* *Metabolic Engineering Communications* 3:252-257 doi:10.1016/j.meteno.2016.09.001
- Kurylenko O et al. (2016) New approaches for improving the production of the 1st and 2nd generation ethanol by yeast *Acta biochimica Polonica* 63:31-38 doi:10.18388/abp.2015_1156
- Lammers WJ, Mirghani H, Stephen B, Dhanasekaran S, Wahab A, Al Sultan MA, Abazer F (2008) Patterns of electrical propagation in the intact pregnant guinea pig uterus *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 294:R919-928 doi:10.1152/ajpregu.00704.2007
- Li J, Lu M, Guo X, Zhang H, Li Y, Han L (2018) Insights into the improvement of alkaline hydrogen peroxide (AHP) pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corn stover: Chemical and microstructural analyses *Bioresource technology* 265:1-7 doi:10.1016/j.biortech.2018.05.082
- Liu X, Jensen PR, Workman M (2012) Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus* *Bioresource technology* 104:579-586 doi:10.1016/j.biortech.2011.10.065
- Maleszka R, Schneider H (1982) Concurrent Production and Consumption of Ethanol by Cultures of *Pachysolen tannophilus* Growing on d-Xylose *Applied and environmental microbiology* 44:909-912
- Maleszka R, Wang P, Schneider H (1982) Ethanol production from D-galactose and glycerol by *Pachysolen tannophilus* *Enzyme and microbial technology* 4:349-352
- Matsuzawa T, Ohashi T, Hosomi A, Tanaka N, Tohda H, Takegawa K (2010) The *gld1+* gene encoding glycerol dehydrogenase is required for glycerol metabolism in *Schizosaccharomyces pombe* *Applied microbiology and biotechnology* 87:715-727 doi:10.1007/s00253-010-2586-3
- Nikel PI, Ramirez MC, Pettinari MJ, Mendez BS, Galvagno MA (2010) Ethanol synthesis from glycerol by *Escherichia coli* redox mutants expressing *adhE* from *Leuconostoc mesenteroides* *Journal of applied microbiology* 109:492-504 doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04668.x
- Ochoa-Estopier A, Lesage J, Gorret N, Guillouet SE (2011) Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol *Bioresource technology* 102:1521-1527 doi:10.1016/j.biortech.2010.08.003
- Oh BR et al. (2011) Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain *Bioresource technology* 102:3918-3922 doi:10.1016/j.biortech.2010.12.007
- Okoye PU, Hameed BH (2016) Review on recent progress in catalytic carboxylation and acetylation of glycerol as a byproduct of biodiesel production *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 53:558-574
- Quispe CAG, Coronado CJR, Carvalho Jr JA (2013) Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27:475-493 doi:10.1016/j.rser.2013.06.017
- Ruchala J, Kurylenko OO, Soontornngun N, Dmytruk KV, Sibirny AA (2017) Transcriptional activator *Cat8* is involved in regulation of xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha* *Microbial cell factories* 16:36 doi:10.1186/s12934-017-0652-6
- Semkiv M, Kata I, Ternavska O, Sibirny W, Dmytruk K, Sibirny A (2019) Overexpression of the genes of glycerol catabolism and glycerol facilitator improves glycerol conversion to ethanol in the methylotrophic thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha* *Yeast* 36:329-339 doi:10.1002/yea.3387
- Sprague GF, Cronan JE (1977) Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism *Journal of bacteriology* 129:1335-1342
- Swinnen S, Klein M, Carrillo M, McInnes J, Nguyen HT, Nevoigt E (2013) Re-evaluation of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an isolate that grows on glycerol without supporting supplements *Biotechnology for biofuels* 6:157 doi:10.1186/1754-6834-6-157
- Thompson JC, He BB (2006) Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks *Applied Engineering in Agriculture* 22:261-265
- Varanda MG, Pinto G, Martins F (2011) Life cycle analysis of biodiesel production *Fuel Process Technol* 92:1087-1094
- Watanabe T, Watanabe I, Yamamoto M, Ando A, Nakamura T (2011) A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant

with increased ethanol tolerance *Bioresource technology* 102:1844-1848
doi:10.1016/j.biortech.2010.09.087

Yazdani SS, Gonzalez R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry *Current opinion in biotechnology* 18:213-219
doi:10.1016/j.copbio.2007.05.002

Yu KO, Jung J, Ramzi AB, Kim SW, Park C, Han SO (2012) Improvement of ethanol yield from glycerol via conversion of pyruvate to ethanol in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* *Applied biochemistry and biotechnology* 166:856-865 doi:10.1007/s12010-011-9475-9

Zhao L, Yu J, Zhang X, Tan T (2010) The ethanol tolerance of *Pachysolen tannophilus* in fermentation on xylose *Applied biochemistry and biotechnology* 160:378-385 doi:10.1007/s12010-008-8308-y

16. Техніко-економічне обґрунтування

Запропонований науково-технічний проект є продовженням науково-дослідної роботи Інституту біології НАН України «Застосування метаболічної інженерії метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* для покращення алкогольної ферментації альтернативних джерел вуглецю (ксилози та гліцерину)» комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії» (№ держреєстрації 0116U003669), 2013-2017 рр.

На попередніх етапах дослідження на основі штаму дикого типу *O. polymorpha* NCYC495 нами було отримано рекомбінантний штам з надекспресією генів *PDC1*, що кодує піруватдекарбоксілазу та *ADH1*, що кодує алкогольдегідрогеназу. Отриманий штам продукував до 5 г/л етанолу під час алкогольної ферментації на середовищі, що містило 15 % очищений гліцерин як джерело вуглецевого живлення (Kata et al. 2016). В подальшому на основі цього штаму було здійснено надекспресію генів *GCY1* і *DAK1* (що кодують гліцеролдегідрогеназу та дигідроксиацетонкіназу) або генів *GUT1* і *GPD1* (що кодують гліцеролкіназу та гліцерол-3-фосфатдегідрогеназу), а також гетерологічного гена *FPS1* *K. phaffii*, що кодує транспортер гліцерину. Отримані рекомбінантні штами продукували до 10,7 г/л етанолу (вихід етанолу – 0.132 г/г споживаного гліцерину) з очищеного гліцерину і до 3,55 г/л етанолу (вихід – 0.0723 г/г споживаного гліцерину) з неочищеного гліцерину в якості джерела вуглецю, що приблизно в 15 разів більше в порівнянні до штаму *O. polymorpha* дикого типу NCYC495 (Semkiv et al. 2019). Продукція етанолу з неочищеного гліцерину значно нижча, ніж з очищеного гліцерину, що пов'язано, імовірно, з інгібуючим впливом токсичних домішок з гліцеринової фракції на процес алкогольної ферментації у отриманих штамів *O. polymorpha*. Проведення адаптації рекомбінантних штамів до росту на середовищі з неочищеним гліцерином забезпечить підвищення ефективності ферментації до рівня, який спостерігався на середовищі з очищеним гліцерином. Одержані адаптовані рекомбінантні штами *O. polymorpha* в подальшому використовуватимуться для виробництва біоетанолу з неочищеного гліцерину. Собівартість такого етанолу буде знижено, оскільки неочищений гліцерин є дешевшим в порівнянні з традиційною сировиною, що використовується для виробництва етанолу (гідролізати кукурудзи, пшениці, меляса, багасса і т.д.) і не потребує складної попередньої обробки, як лігноцелюлозна сировина.

Також на попередніх етапах досліджень нами було проведено скринінг колекції штамів дріжджів Інституту біології клітини НАН України з метою відбору дріжджів, що здатні до ефективного накопичення біомаси на середовищі, що містило гліцеринову фракцію, одержану від компанії-виробника біодизелю. Показано, що штами дріжджів, що належать до видів *P. tannophilus*, *K. phaffii* та *Y. lipolytica* здатні використовувати неочищений гліцерин як джерело вуглецевого живлення для росту. Після оптимізації складу середовища та умов культивування для максимізації накопичення біомаси, а також перевірки вмісту білка в отриманій біомасі, вона може бути використана як білкова кормова добавка для годівлі тварин. Собівартість такої біомаси кормових дріжджів буде невисокою, оскільки для її одержання буде використано дешеву поновлювану сировину (неочищений гліцерин). Також ефективна утилізація гліцеринової фракції дозволить зменшити викиди цих відходів у навколишнє середовище і забезпечить підвищення рентабельності виробництва біодизелю.

Отже, наявні штами рекомбінантні штами дріжджів *O. polymorpha*, в також штами *P. tannophilus*, *K. phaffii* та *Y. lipolytica* є перспективними для впровадження у виробництво на базі нашого партнера.

Приватне Акціонерне Товариство «Ензим» є найбільшим в Україні промисловим підприємством з виробництва біотехнологічної продукції з допомогою мікробного синтезу. Співробітники товариства мають великий досвід у галузі виробництва біопродуктів з допомогою дріжджів і зацікавлені в отриманні цінних продуктів з неочищеного гліцерину.

17. Власна оцінка науково-технічного рівня розробки, що пропонується, яка очікується за результатами науково-технічного проекту

- | | |
|-------------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги |
| <input type="checkbox"/> | немає аналогів в Україні |
| <input type="checkbox"/> | краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками |
| <input type="checkbox"/> | перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками |

18 Використання результатів науково-технічного проєкту

18.1 Очікувані наукові та науково-практичні результати, об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), які плануються до впровадження після завершення науково-технічного проєкту

Найменування результатів, ОІВ	Назва підприємства, організації, де передбачається використовувати результати, ОІВ	Заплановані обсяги впровадження
Штами дріжджів здатних до ефективного накопичення біомаси чи продукції етанолу на середовищі з неочищеним гліцерином, комплект технічної документації (лабораторний та напівпромисловий регламент отримання кормової біомаси дріжджів та етилового спирту)	ПАТ "Ензим"	25 т етилового спирту, 1 т біомаси

18.2 Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання науково-технічного проєкту

За участі нашого партнера Приватного акціонерного товариства "Ензим", планується налагодити промислове виробництво паливного етанолу та кормових дріжджів з дешевої сировини, що є відходами виробництва біодизелю. Передбачається, що у випадку успішного виконання проєкту, одержаний паливний етанол та кормові дріжджі будуть конкурентоспроможними на українському та світових ринках за рахунок низької собівартості. Більше того, використання неочищеного гліцерину, що є побічним продуктом виробництва біодизелю, забезпечить підвищення рентабельності та екологічності процесу отримання біодизелю.

18.3. Потенційні споживачі наукових та науково-технічних результатів, об'єктів права інтелектуальної власності (ОІВ)

Країна	Назва підприємства, організації	Найменування результатів, ОІВ	Можливі обсяги споживання
Україна	ПАТ "Ензим"	Штами дріжджів з підвищеною продукцією етанолу або біомаси з неочищеного гліцерину	Продукція 5 т етилового спирту і 0.2 т біомаси в рік

19. Об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), використання яких передбачається під час проведення досліджень (для прикладних досліджень та фундаментальних, де використовуються ОІВ)

Реєстраційний номер патенту, свідоцтва, країна (для ОІВ, набуття прав на які засвідчується охоронним документом)	Назва необхідного патенту, ноу-хау, об'єкта авторського права та інших ОІВ	Творець ОІВ	Вид наявних прав (виключні майнові права, виключна, невиключна, проста ліцензія) чи є потреба в одержанні прав на використання
Патент на корисну модель 134629 Україна, МПК C12N 15/01	Спосіб отримання штамів дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> здатних до надпродукції етанолу	М.В. Семків, К.В. Дмитрук, А.А. Сибірний	Правами на винахід володіє авторський колектив, Інститут біології клітини НАН України

20. Фінансові аспекти науково-технічного проєкту

20.1. Загальна вартість роботи 450,000 тис. грн.

словами: чотириста п'ятдесят тисяч грн.

20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2021 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	450,000

21. Наукові ради (комітети, комісії) НАН України, ради регіональних наукових центрів НАН і МОН України, яких доцільно залучити до експертної оцінки запиту

Наукова рада Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ)

Наукова рада Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (м. Київ)

Наукова рада біологічного факультету Львівського національного університету ім. Івана Франка (м. Львів)

Наукова рада біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (м. Одеса)

22. Кандидатури можливих експертів у галузі, до якої відноситься робота, що пропонується

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Підгорський Валентин Степанович	академік НАН України, д.б.н., проф., головний науковий співробітник	Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України
Блюм Ярослав Борисович	академік НАН України, д.б.н., проф., головний науковий співробітник	ДУ "Ін-т харчової біотехнології та геноміки НАН України "
Гнатуш Світлана Олексіївна	к.б.н., проф., завідувач кафедри	Біологічний факультет Львівського національного університету ім. Івана Франка
Іваниця Володимир Олексійович	член-кореспондент НАН України, д.б.н., проф., проректор з наукової роботи	Одеський національний університет імені Мечникова

23. Додатки, що є невід'ємною частиною запиту:

1. Технічне завдання на виконання роботи (Додаток А).
2. Планова калькуляція кошторисної вартості роботи (Додаток Б).

24. Організація(ї)-партнер(и) (найменування, місцезнаходження, номери телефонів)

№	Найменування	Місцезнаходження	Номери телефонів
1	ПАТ "Ензим"	02094, м.Київ, вул. Червоноткацька, 27а	+38(044)3590841

25. Форма участі партнера у проєкті (відмітити необхідні і конкретизувати по окремих пунктах)

№	Форма участі	Назва матеріальної участі, послуги та фінансовий еквівалент
1.	ПАТ "Ензим"	
<input type="checkbox"/>	Фінансова	Обсяг фінансування _____ тис. грн.
<input checked="" type="checkbox"/>	Матеріальна	1.Надає власні площі, електро- та теплоенергію для культивування та висушування отриманих рекомбінантних штамів, компоненти живильних середовищ для культивування дріжджів, реактиви для визначення вмісту етанолу. _____ Загальний фінансовий еквівалент 250.000 тис. грн.
<input checked="" type="checkbox"/>	Послуги	1.Забезпечує роботу мікробіологічної лабораторії, лінії відмивання, пресування та висушування дріжджів, консультації технологів та відділу маркетингу. _____ Загальний фінансовий еквівалент 200.000 тис. грн.
Загальний фінансовий еквівалент 450,000 тис. грн.		
Загальний фінансовий еквівалент 450,000 тис. грн.		

26. Час і місце впровадження розробки за проєктом

№	Назва організації, де буде впроваджено розробку	Адреса організації	Приблизний час впровадження (місяць, рік)	Прогнозований економічний ефект
1	ПАТ "Ензим"	02094, м.Київ, вул. Червоноткацька, 27а	05.2022	Економічний ефект полягатиме в підвищенні рентабельності та зниженні собівартості нарощування біомаси дріжджів або виробництва етилового спирту

_____ дата

Заступник директора з наукової роботи
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., проф.

_____ Ю.Я. Кіт
(підпис)

М.П.

Науковий керівник науково-технічного проєкту

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

_____ А.А. Сибірний
(підпис)

ПОГОДЖЕНО

Заступник директора з наукової роботи
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., проф.

_____ Ю.Я. Кіт
(підпис)
« _____ » _____ 20 ____ р.
М.П.

ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ
на виконання науково-технічного проєкту

**«Розробка лабораторного та напівпромислового регламентів отримання білково-вітамінних концентратів та етанолу з гліцеринової фракції відходів виробництва біодизелю з використанням сконструйованих штамів дріжджів»
Науково-технічні проєкти установ НАН України 2021 року**

Інститут біології клітини НАН України

1. Рішення про затвердження науково-технічного проєкту

2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

3. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Молекулярні біотехнології створення нових організмів та продуктів для сільського господарства, фармацевтичної та харчової промисловості

4. Код та назва наукового напрямку або проблеми з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук (для фундаментальних досліджень)

н е м а є

5. Основний напрям наукової діяльності установи, за яким проводяться роботи

Вивчення молекулярно-генетичних і біохімічних механізмів регуляції метаболізму у дріжджів та створення нових біотехнологічних процесів і продуктів на основі цих мікроорганізмів.

6. Мета науково-технічного проєкту

Метою роботи є оптимізація умов культивування штамів дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, *Pachysolen tannophilus*, *Komogataella phaffii* та *Yarrowia lipolytica* на середовищі з гліцериновою фракцією відходів виробництва біодизелю як джерелом вуглецю, масштабування цього процесу та розробка лабораторного і напівпромислового регламентів отримання етанолу та біомаси дріжджів (як джерела білків та вітамінів) на основі цієї сировини.

7. Термін проведення науково-технічного проєкту

початок — 01 січня 2021 р. ; закінчення — 31 грудня 2021 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **450,000** тис. грн.
та по роках
2021 р. — 450,000 тис. грн.

8. Календарний план науково-технічного проєкту

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Адаптація попередньо отриманого рекомбінантного штаму <i>O. polymorpha</i> до росту на середовищі з неочищеним гліцерином	01 січня 2021 р. - 31 березня 2021 р.	к.б.н., М.В. Семків.
2	Аналіз здатності штамів дріжджів <i>P. tannophilus</i> , <i>K. phaffii</i> та <i>Y. lipolytica</i> до ефективного накопичення біомаси та продукції етанолу на середовищі, що містить гліцеринову фракцію відходів виробництва біодизелю.	01 квітня 2021 р. - 30 вересня 2021 р.	д.б.н., с.н.с., К.В. Дмитрук; к.б.н., М.В. Семків.
3	Оптимізація складу середовища та умов культивування для більш ефективного накопичення біомаси та продукції етанолу отриманими штамми дріжджів на середовищі з неочищеним гліцерином.	01 жовтня 2021 р. - 31 грудня 2021 р.	д.б.н., с.н.с., К.В. Дмитрук.

9. Зміст, основні вимоги до виконання науково-технічного проєкту, рівня і способів її виконання

Катаболізм гліцерину в дріжджових клітинах може здійснюватися через гліцерол-3-фосфат або через дигідроксиацетон. Метаболізм через гліцерол-3-фосфат здійснюється за участю ферментів гліцеролкінази (Gut) та гліцерол-3-фосфатдегідрогенази (Gpd) ([Sprague and Cronan 1977](#)), тоді як метаболізм через дигідроксиацетон здійснюється за участю ферментів гліцеролдегідрогенази (Gcy) і дигідроксиацетонкінази (Dak) ([Matsuzawa et al. 2010](#)). Отриманий в результаті дигідроксиацетонфосфат в реакціях гліколізу трансформується до пірувату, який може використовуватися в циклі трикарбонних кислот (дихальний метаболізм) або перетворюватися до етанолу (ферментативний метаболізм).

Перетворення пірувату до етанолу каталізується ферментами піруватдекарбоксилазою (Pdc) і алкогольдегідрогеназою (Adh). Рівень експресії генів *PDC* і *ADH* безпосередньо впливає на вихід етанолу під час алкогольної ферментації ([Nikel et al. 2010](#)).

Транспорт гліцерину в клітини конвенційних дріжджів *S. cerevisiae* здійснюється через гліцерол/ H^+ симпортер Stl1 ([Ferreira et al. 2005](#)), тоді як у деяких інших дріжджів (наприклад, *P. tannophilus*, *K. phaffii* і т.д.) транспорт здійснюється через мембранний транспортер що є гомологом білка Fps1 *S. cerevisiae* (у *S. cerevisiae* цей білок здійснює функцію експорту гліцерину з клітини в навколишнє середовище при різкій зміні осмотичного тиску в середовищі або в анаеробних умовах) ([Klein et al. 2016](#)).

Спиртові дріжджі *S. cerevisiae*, що є традиційним продуцентом етанолу, дуже слабо ростуть на середовищі з гліцерином, як єдиним джерелом вуглецевого живлення ([Swinnen et al. 2013](#)). Тому для конверсії гліцерину до етанолу було запропоновано використовувати метилотрофні термотолерантні дріжджі *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *O. polymorpha* менш чутливі до токсичного впливу метанолу і важких металів з неочищеного гліцерину ніж *S. cerevisiae*. Для поліпшення продукції етанолу з гліцерину на основі штаму DL1 *O. polymorpha* був сконструйований рекомбінантний штам з надекспресією генів, що кодують піруват декарбоксилазу (*pdv*) і алкогольдегідрогеназу II (*adhB*) з бактерії *Zymomonas mobilis* під контролем промотора гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (*GAPDH*). Отриманий штам продукував 2,74 г/л етанолу з гліцерину, що в 3,3 раза вище в порівнянні з батьківським штамом DL1. В подальшому в цьому штамі експресували гени, що кодують гліцеролдегідрогеназу (*dhaD*) і дегідроксиацетонкіназу (*dhaKLM*) з *Klebsiella pneumoniae*, що забезпечило одержання рекомбінантного штаму з продукцією етанолу 3,1 г/л ([Hong et al. 2010](#)).

В нашій лабораторії було здійснено одночасну надекспресію генів *PDC1* і *ADH1* *O. polymorpha* в штамі NCYC495, що також забезпечувало збільшення продукції етанолу з гліцерину. Отриманий рекомбінантний штам продукував до 5,0 г / л етанолу з 15 % очищеного гліцерину при ферментації за підвищеної до 45 °C температури ([Kata et al. 2016](#)). Подальше підвищення ефективності конверсії гліцерину до етанолу у цього штаму було досягнуто шляхом надекспресії генів, що беруть участь в катаболізмі гліцерину через гліцерол-3-фосфат або через дигідроксиацетон, а також гетерологічного гена, що кодує гліцеринний транспортер Fps1 у *K. phaffii*. Отримані рекомбінантні штами продукували до 10,7 г/л етанолу з очищеного гліцерину ([Semkiv et al. 2019](#)). Однак при ферментації неочищеного гліцерину продукція етанолу була значно нижчою – лише 3,55 г/л етанолу з 15 % неочищеного гліцерину. Ймовірно, це зумовлено інгібуючим впливом певних домішок в неочищеному гліцерині, а також відносно низькою швидкістю поглинання та перетворення гліцерину в *O. polymorpha*. На прикладі *S. cerevisiae* було показано, що можлива адаптація штамів дріжджів до росту на середовищі з гліцерином, що супроводжується суттєвим підвищенням швидкості утилізації гліцерину та накопичення біомаси в таких умовах ([Ochoa-Estopier et al. 2011](#)). Ми плануємо провести подібну адаптацію до росту на середовищі з неочищеним гліцерином для отриманих рекомбінантних штамів *O. polymorpha* з найвищим рівнем продукції етанолу.

Також нами було проведено пошук в колекції мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН України інших штамів дріжджів, що здатні до росту та продукції етанолу на середовищі з неочищеним гліцерином як джерелом вуглецевого живлення. Виявлено, що штами дріжджів *P. tannophilus*, *K. phaffii* та *Y. lipolytica* здатні до росту на неочищеному гліцерині. *K. phaffii*, окрім того, продукує в цих умовах до 2 г/л етанолу. В науковій літературі описано, що біомаса дріжджів *Y. lipolytica*, отримана після культивування в середовищі з гліцериновою фракцією, може використовуватися як багата білками і незамінними амінокислотами кормова добавка до раціону тварин ([Juszczak et al. 2013](#)). Ми плануємо проаналізувати склад та динаміку накопичення біомаси у відібраних штамів дріжджів, щоб з'ясувати можливість їх подібного застосування.

Також ми плануємо оптимізувати склад середовища та параметри культивування дріжджів, для того щоб максимізувати отримання етанолу або біомаси з гліцеринової фракції відходів виробництва біодизелю.

Для виконання запланованих у програмі проекту наукових досліджень необхідним є фінансування з бюджету НАН України в обсязі 450 тис. грн. Дослідження будуть проведені у співпраці з Приватним Акціонерним Товариством “Ензим” м. Київ з метою використання обладнання партнера, живильних середовищ та досвіду роботи з промислового виробництва дріжджів.

10. Наукові (науково-технічні) результати, що очікуються за основними етапами та науково-технічним проектом в цілому

Штами дріжджів з підвищеною продукцією етанолу або біомаси з неочищеного гліцерину, пробна білково-вітамінних концентратів дріжджів, технологія культивування дріжджів на середовищі з неочищеним гліцерином та масштабування цього процесу. За результатами даного проекту будуть створені передумови для промислового виробництва етанолу та біомаси кормових дріжджів з використанням дешевої поновлюваної сировини (гліцеринової фракції відходів виробництва біодизелю).

11. Перелік науково-технічної та іншої документації, що надається по завершенню науково-технічного проекту

- звіт про виконання наукового проекту, оформленого відповідно до ДСТУ 3008:2015 «Інформація та документація. Звіти у сфері науки і техніки. Структура та правила оформлювання» зі списком публікацій за результатами виконання роботи у звітному році;
- кошторис фактичних витрат із розрахунками за статтями;
- перелік статей накладних витрат;
- перелік додаткової науково-технічної документації (за необхідності).

Науковий керівник науково-технічного проекту

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

А.А. Сибірний

(підпис)

Планова калькуляція кошторисної вартості науково-технічного проєкту

**«Розробка лабораторного та напівпромислового регламентів отримання білково-вітамінних концентратів та етанолу з гліцеринової фракції відходів виробництва біодизелю з використанням сконструйованих штамів дріжджів»
на 2021 рік**

Термін виконання науково-технічного проєкту: початок — 01.01.2021 р., закінчення — 31.12.2021 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	225,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	49,500
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	37,500
4	Оплата послуг (крім комунальних)	2240	30,000
5	Видатки на відрядження	2250	18,000
6	Оплата водопостачання та водовідведення	2272	30,000
7	Оплата електроенергії	2273	45,000
8	Оплата природного газу	2274	15,000
Разом:			450,000
в т.ч. накладні витрати			22,500
% їх до основної заробітної плати			10,0%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Заступник директора з наукової роботи
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., проф.

Ю.Я. Кіт

(підпис)

М.П.

Науковий керівник науково-технічного проєкту
Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

А.А. Сибірний

(підпис)

Головний бухгалтер

М.С. Демкович

(підпис)