

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

Факультет біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології та мікробіології

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

_____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2021 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія»

на тему: «Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* як джерело отримання
рекомбінантних сполук»

Виконала: здобувач 2 курсу, групи ПБ-2-01-М

Потапенко Валерія Віталіївна

(підпис)

Керівник: доц., к.б.н. Скроцька Оксана Ігорівна

(підпис)

Рецензент:

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній
роботі немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь магістр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач

кафедри біотехнології і
мікробіології

Пирог Т.П.

“ 28 ” жовтня 2020 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Потапенко Валерії Віталіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* як джерело отримання
рекомбінантних сполук

керівник роботи Скроцька Оксана Ігорівна, к.б.н., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “26”жовтня2020 року №868-кв

2. Строк подання здобувачем роботи _____
3. Вихідні дані до роботи *S. cerevisiae* 36aS1.10.4, біоетанол, пакування –
сталеві бочки об'ємом 50 л, ферментер об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом
заповнення 0,6.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Використання генетично-модифікованих дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*
для отримання біопалива; отримання інших практично цінних сполук;
техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної
схеми ; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль
виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема (2 аркуши А1), апаратурна схема (2 аркуши
А1).

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 28 жовтня 2020 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
Літературний огляд			
1	Використання генетично-модифікованих дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> для отримання біопалива	17.01.2020- 18.03.2020	
2	Отримання інших практично цінних сполук	19.03.2020- 24.04.2020	
Технологічна частина			
3	Техніко-економічне обґрунтування	03.02.2020- 15.02.2020	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	17.02.2020- 23.03.2020	
5	Специфікація обладнання	24.03.2020- 10.04.2020	
6	Опис технологічної схеми	13.04.2020- 11.09.2020	
7	Контроль виробництва	12.09.2020- 25.10.2020	
	Оформлення технологічної схеми	26.10.2020- 12.11.2020	
	Оформлення апаратурної схеми	14.11.2020- 23.12.2020	

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Потапенко В.В.

_____ (прізвище та ініціали)

Скроцька О.І.

_____ (прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	5
ВСТУП	7
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	
РОЗДІЛ 1. Використання генетично-модифікованих дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> для отримання біопалива	10
1.1. Етанол.....	10
1.2. Бутанол.....	17
1.3. Ізобутанол.....	18
РОЗДІЛ 2. Отримання інших практично цінних сполук	21
2.1. Органічні кислоти.....	21
2.2. Ферменти.....	24
2.3. Фармацевтичні білки.....	27
2.4. Каротиноїди.....	29
2.5. Інші сполуки.....	30
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	20
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	34
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	34
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	39
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	42
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	43
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	46
4.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування	46
4.1.1. Етапи конструювання рекомбінантного продуцента.....	52
4.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера ..	53
4.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	54
4.3.1. Обґрунтування стадії відділення біомаси	55

4.3.2. Обґрунтування стадії відділення низькомолекулярних та високомолекулярних домішок.....	58
4.3.3. Обґрунтування стадії зневоднювання та очищення.....	61
4.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску біоетанолу.....	64
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	65
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	70
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	81
7.1. Карта постадійного контролю біосинтезу біоетанолу.....	81
7.2. Мікробіологічний контроль	87
7.2.1. Мікроскопіювання культуральної рідини	87
7.2.2. Методика розсіву на чашки Петрі	88
7.3. Визначення концентрації біомаси <i>S. cerevisiae</i> 36aS1.10.4.....	90
7.4. Визначення концентрації цільового продукту (біоетанол).....	91
7.5. Визначення концентрації джерела вуглецю (гідролізат соломи пшениці).....	92
7.6. Визначення концентрації джерела азоту (пептон).....	93
7.7. Визначення об'ємної частки біоетанолу.....	93
7.8. Сучасний метод контролю виробництва – вимірювання об'ємної частки біоетанолу.....	95
ВИСНОВКИ.....	97
ЛІТЕРАТУРА.....	99
ДОДАТКИ	

РЕФЕРАТ

Дипломна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу біоетанолу дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* 36aS1.10.4 та післяферментаційних процесів виділення продукту. А також аналіз сучасної наукової літератури останніх років щодо отримання етанолу, бутанолу та ізобутанолу з використанням генетично модифікованих клітин *S. cerevisiae*.

Ферментація проходить на середовищі з гідролізатом соломи пшениці, що дозволяє отримати концентрацію біоетанолу 54,1 г/л за 46 год культивування. В даній роботі біоетанол використовують у якості добавки до бензина для автомобільного транспорту. Особливості процесу культивування: $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, рН 5,5 (регулюється хлороводнем та гідроксидом натрію), перемішування – 100 об/хв, тривалість 46 год. Перші 12 год культивування йде подача стерильного повітря для нарощування біомаси, інші 34 год – продування CO_2 для процесу спиртового бродіння.

S. cerevisiae 36aS1.10.4 є генно-модифікованим продуцентом, основними етапами конструювання якого є: виділення генів ксилосоізомерази з *Lactobacillus plantarum*; введення в вектор-плазмиду отриманих генів; трансформація; отримання штаму 36aS1, який краще споживав пентози; адаптивна еволюція штаму 36aS1 на середовищі з оцтовою кислотою; отримання бібліотеки штамів 36aS1.10; скринінг та виділення штаму 36aS1.10, який має вищу концентрацію біоетанолу та біомаси.

Потужність виробництва біоетанолу – 31482 л за рік, який отримують за 86 циклів. Підготовка посівного матеріалу проходить у три стадії (32 колби на качалці, інокулятор об'ємом 100 л та 1 м³), а виробничий біосинтез – у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Післяферментаційний процес отримання біоетанолу складається з таких етапів, як: відділення біомаси від культуральної рідини сепаруванням, відділення високомолекулярних та низькомолекулярних домішок дистиляцією та ректифікацією, зневоднювання та очищення біоетанолу на

молекулярних ситах. Пакування продукту проходить у сталеві бочки об'ємом 50 л.

Дипломна робота складається з літературного огляду (який включає два розділи) та технологічного процесу (який включає п'ять розділів), 6 графічних матеріалів, списку використаної літератури (161 найменувань), технологічної схеми (креслення формату А1) та апаратурної схеми (креслення формату А1). Загальний обсяг роботи – 114 сторінок, 24 таблиць.

Ключові слова: біоетанол, *S. cerevisiae* 36aSI.10.4, біопаливо, гідролізат соломи пшениці, біосинтез, відділення, зневоднювання.

ВСТУП

Традиційні сфери використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* — це хлібопечення, виноробство, пивоваріння, виробництво спирту, виготовлення квасу, отримання кормового білка та використання як добавки до кормів сільськогосподарських тварин [1—3]. З розвитком методів генної інженерії їх стали використовувати як експресійну платформу для отримання практично цінних сполук, зокрема спиртів, які можна використати як біопаливо [4—8].

Мікробіологічний синтез біопалива з використанням поновлювальних джерел енергії є альтернативою нафтопереробним заводам. Хоч нафта і є одним із найбільш важливих джерел енергії, але її запаси не є невичерпними [9], тому розробка технологій поновлюваного й економічно вигідного біопалива є актуальним завданням сьогодення.

При розробці економічних процесів мікробної конверсії в промислових масштабах необхідно враховувати, що субстрати для мікробного синтезу повинні бути дешевими, екологічними і не конкурувати з продуктами харчування. Саме тому лігноцелюлозна сировина є найбільш перспективним поновлювальним джерелом, що відповідає вказаним вимогам [10]. Глюкоза і ксилоза — найбільш поширені моносахариди у лігноцелюлозній біомасі. Незважаючи на те, що існує велика кількість бактерій і дріжджів, які здатні природним шляхом утилізувати ксилозу [11—13], клітини *S. cerevisiae* мають ряд переваг — стійкість до високого осмотичного тиску, низьких значень рН, високих концентрацій спиртів та до дії інгібіторів лігноцелюлозних гідролізатів [14].

На сьогодні *S. cerevisiae* — це широко вивчена на клітинному та молекулярному рівні модельна еукаріотична система, при роботі з якою можна використовувати велику кількість доступних генетичних інструментів [15]. Дріжджі тисячоліттями використовуються для отримання продуктів харчування, але з розвитком методів генної інженерії промислове значення даних мікроорганізмів вийшло за рамки їх традиційного застосування.

Хлібопекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є одними з найбільш повно охарактеризованих одноклітинних організмів. Саме їх найчастіше і використовують як еукаріотичну платформу для отримання рекомбінантних сполук. Адже, на відміну від традиційної прокаріотичної системи експресії гетерологічних білків на основі *Escherichia coli*, клітини *S. cerevisiae* не синтезують пірогенів чи ендотоксинів, вони стійкі до низьких значень рН та високого осмотичного тиску, а також мають систему посттрансляційної модифікації білків [16].

Актуальність. Традиційні сфери використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* – це хлібопечення, виноробство та пивоваріння, виробництво спирту, виготовлення квасу та отримання кормового білку. Проте, нині, з розвитком методів генної інженерії, їх стали використовувати як експресійну платформу для отримання практично цінних рекомбінантних сполук.

На відміну від бактерій, модифіковані клітини дріжджів синтезують рекомбінантні сполуки вищих еукаріот, які за структурою повністю відповідають природнім аналогам. Тому, за допомогою генетично модифікованих сахароміцетів отримують фармацевтичні білки, ферменти, каротиноїди, різні види палива та інші практично цінні речовини.

Так, нещодавно Zhang зі співавт. генетично модифікували *S. cerevisiae* та отримали рекомбінантний штам 2805/M δ HIR, що продукує 62,1 мг/л гірудину [17]. А Kobayashi зі співавт. модифікували *S. cerevisiae* та отримали штам GCI (XR / XDH / XK), що синтезує глутатіон у концентрації 160 мг/л [18]. Враховуючи, що на сьогодні каротиноїди в більшості випадків отримують за допомогою хімічного синтезу, вчені Lopez зі співавт. сконструювали два штами *S. cerevisiae* SM14 та *S. cerevisiae* β car1,2, за допомогою яких було отримано 210 та 750 мг/л відповідно β -каротину мікробіологічним шляхом [19]. Blazic зі співавт. проводили досліди щодо створення рекомбінантних *S. cerevisiae* – продуцентів целобіозодегідрогенази [20]. В свою чергу, Liu J. зі співавт. сконструювали *S. cerevisiae* CEN. PK2-1B, який є продуцентом декстринази [21].

Активно ведуться роботи по конструюванню сахароміцетів, що здатні зброджувати лігноцелюлозну сировину, з метою утилізації органічних відходів сільського та лісового господарств, целюлозно-паперової, деревообробної та харчової промисловості, а також побутових відходів. Наступні продуценти синтезують етанол на лігноцелюлозних субстратах – *S. cerevisiae* BSGIBX [22], *S. cerevisiae* YUG37-ERG1 [23], *S. cerevisiae* TJ14 [24], *S. cerevisiae* H1 та *S. cerevisiae* H2 [25], *S. cerevisiae* ADE17_mZRE [26], *S. cerevisiae* CW9 [27].

Враховуючи те, що рекомбінантні сполуки, що продукує *S. cerevisiae* за допомогою методів генної інженерії є цінними в різних галузях виробництва, пошук нових, активних надпродуцентів таких необхідних генерованих сполук, а також технологій їх виділення та очищення є перспективним та актуальним.

Новизна. Використання сільськогосподарських культур в якості джерела для отримання біоетанолу на сьогодні не є актуальним, оскільки є потреба у використанні великої кількості цих культур для годівлі тварин, а також сам процес вирощування потребує великих площ та багато часу. Тому в даній роботі як джерело для отримання біоетанолу використовується лігноцелюлозна сировина, яка є відходом сільського господарства, а саме – солома пшениці. Також з метою здійснення катаболізму ксилози клітини сахароміцета були модифіковані, використовуючи ксилозоізомеразний шлях. Так, ген ксилоізомерази (*XI*) був виділений з *L. plantarum* та створений рекомбінантний штам *S. cerevisiae* 36aS1.10.4 [28].

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИЧНО-МОДИФІКОВАНИХ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОПАЛИВА

Біоетанол є екологічно чистим автомобільним паливом, який можна використовувати окремо або в суміші з бензином. Він має ряд переваг: високе октанове число, широкий температурний діапазон займання, підвищена теплота випаровування, нетоксичний, може легко розкладатись мікроорганізмами [29]. Використання сільськогосподарських культур як джерела для отримання біоетанолу на сьогодні не є актуальним, оскільки на даний процес витрачається велика кількість сировини, яку потрібно вирощувати на великих площах тривалий час. Тому лігноцелюозна сировина, яка є відходами сільського господарства та деревопереробної промисловості є перспективним поновлювальним джерелом для отримання біоетанолу [30].

Лігноцелюлоза складається із таких полісахаридів як целюлоза і геміцелюлоза, а також ароматичного полімеру лігніну. Для ефективного використання лігноцелюлози необхідне швидке та повне споживання її цукрів, тобто має відбуватись біоконверсія ксилану, ксилоолігоцукрів та целюлози. Зазвичай ксилан геміцелюлози розщеплюється на ксилоолігоцукри ендо- β -ксиланазою, після чого β -ксилозидаза розкладає ксилоолігоцукри до ксилози [31]. Для того, щоб в процесі біосинтезу отримати високі концентрації етанолу, дріжджі *S. cerevisiae* повинні використовувати усі цукри, що містяться у середовищі. Проте, проблема полягає у тому, що сахароміцети не здатні споживати ксилозу [32].

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИЧНО- МОДИФІКОВАНИХ ДРІЖДЖІВ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОПАЛИВА	Літ.	Арк.	Акрівшів
Розроб.		<i>Потапенко В.В.</i>					11	11
Перевір.		<i>Скороцька О.І.</i>						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>			Кафедра БТМ¹⁰			

Для здійснення катаболізму ксилози клітини *S. cerevisiae* модифікують, використовуючи такі гетерологічні шляхи як ксилоредуктазно-ксилітолдегідрогеназний (КР-КДР) або ксилозоізомеразний (КІ) [33]. При використанні шляху КР-КДР спостерігається окисно-відновний дисбаланс, оскільки відновлення ксилози до ксилітолу каталізується за допомогою ксилоредуктази з використанням NADPH, а окислення ксилітолу в ксилулозу каталізується ксилітолдегідрогеназою з використанням NAD⁺, що призводить до накопичення ксилітолу та зменшення концентрації етанолу. З іншого боку проміжний продукт не утворюється при використанні шляху КІ, оскільки ксилоза безпосередньо метаболізується в ксилулозу, але швидкість споживання ксилози у рекомбінантних штамів, що мають шлях КІ значно нижча, ніж у штамів зі шляхом КР-КДР [34].

Використовуючи гетерологічний шлях КР-КДР, було модифіковано ряд сахароміцетів. Лі зі співавт. виділили з *Orpinomyces* sp. та *Prevotella ruminicola* ген β -ксілозидази та експресували у *S. cerevisiae* Alpha25, що дало змогу одержати на середовищі з ксилозою 13 г/л етанолу [35]. Із *Penicillium oxalicum* був виділений ген β -ксілозидази (*xyl3A*). Цей фермент перетворює ксилоолігосахариди в ксилозу з подальшим утворенням етанолу на лігноцелюлозних відходах. Здійснивши генетичну модифікацію *xyl3A* *S. cerevisiae*, були отримані рекомбінантні штами BSPX042, BSGO, BSGBX, BSGMBX, BSGIBX, BSGPBX, BSGSBX. Найвища концентрація етанолу спостерігалась при культивуванні *S. cerevisiae* BSGIBX [22].

Триває пошук нових джерел генів ксилозоізомерази, які можна було б інтегрувати у геном дріжджів. Використовуючи гени КІ *Reticulitermes speratus*, які було виділено з термітів, створено рекомбінантні дріжджі *S. cerevisiae* WR311. Штам характеризується підвищеною здатністю до утилізації ксилози [36].

Конструювання дріжджів, які здатні одночасно зброджувати змішані цукри лігноцелюлозних матеріалів є основним завданням при оптимізації виробництва біоетанолу. Wang зі співавтор. створили штам *S. cerevisiae*

BSW4XA3, що здатен до одночасного споживання D-глюкози, D-ксилози і L-арабінози. Сконструйований штам характеризувався підвищеним споживанням змішаних цукрів та виходом етанолу під час культивування [37].

При культивуванні дріжджів на середовищі з ксилозою і глюкозою, споживання ксилози розпочинається лише після повного катаболізму глюкози. Тому при конструюванні рекомбінантних дріжджів, у яких функціонує гетерологічний шлях КІ, необхідно вдосконалити систему поглинання і катаболізму ксилози за одночасної присутності глюкози у середовищі культивування. Нещодавно створено штам *S. cerevisiae* CW9, в клітини якого інтегровано гени ксилозоізомерази разом із білками гексозних транспортерів. В результаті вихід етанолу становив 90 % від теоретично розрахованого [27].

При ферментативному гідролізі целюлози утворюється целобіоза – дисахарид глюкози. Дія на целобіозу β -глюкозидази призводить до вивільнення глюкози, яка призводить до катаболітної репресії ксилози в процесі культивування [38]. Природні штами *S. cerevisiae* не зброджують целобіозу. Існують також два підходи щодо конструювання дріжджів, які будуть здатні засвоювати целобіозу. Перший – експресія гетерологічних генів, що кодують транспортер целобіози і β -глюкозидази, яка каталізує гідроліз целобіози до двох молекул глюкози, що далі фосфорилуються до глюкозо-6-фосфату. Другий – скоординована експресія транспортера целобіози і целобіозофосфорилази, яка використовує неорганічний фосфат для гідролізу целобіози, при цьому утворюється глюкоза і глюкозо-1-фосфат [39]. Американськими вченими створено штам *S. cerevisiae* BF3645, в якому функціонують гени ксилозоізомерази, двох транспортерів целобіози і целобіозофосфорилази, за допомогою яких даний штам здатен до коферментації ксилози і целобіози з утворенням етанолу в анаеробних умовах [40].

Ведуться роботи по конструюванню сахароміцетів не лише з високим метаболічним потенціалом для ферментації ксилози, а і з високою стійкістю до дії інгібіторів (органічні кислоти, фурани, феноли та ін.), що присутні у

лігноцелюлозних гідролізатах. Так, сконструйовано штам *S. cerevisiae* NAPX37, який може швидко метаболізувати ксилозу у високих концентраціях (75 г/л) під час періодичного та безперервного культивування. Клітини даного штаму є стійкими до дії оцтової, мурашиної та левулінової кислот, що присутні у лігноцелюлозних гідролізатах [41].

У табл. 1.1. наведено узагальнену інформацію щодо рекомбінантних штамів *S. cerevisiae*, які здатні синтезувати етанол, використовуючи у якості джерел вуглецю різні цукри лігноцелюлозної сировини.

Синтез етанолу рекомбінантними штамами *Saccharomyces cerevisiae*

Штам	Експресовані гени	Джерело вуглецю	Тривалість культивування, год	Вихід етанолу, г/г цукрів	Концентрація етанолу, г/л	Джерело
BSW4XA3	D-ксилозоізомерази (<i>XI</i>), D-ксилозоредуктази (<i>XR</i>), ксилітолдегідрогенази (<i>XDH</i>), ксилулокінази (<i>XK</i>)	D-глюкоза, D-ксилоза, L-арабіноза	120	0,35	12	[42]
Alpha25	β -ксилозидази (<i>xylA</i>)	Ксилоза	48	0,31	13	[43]
NAPX37	Ксилозоредуктази (<i>XYLI</i>), ксилітдегідрогенази (<i>XYL2</i>), ксилулокінази (<i>XKSI</i>), β -глюкозидази (<i>BGLI</i>)	Ксилоза, глюкоза	36	0,39	13,5	[44]
YRH1114	D-ксилозоізомерази (<i>XI</i>), D-ксилулокінази (<i>XK</i>)	D-ксилоза	91	0,04	13,6	[45]
BP10001	Ксилозоредуктази (<i>XR</i>), ксилітдегідрогенази (<i>XDH</i>), ксилулокінази (<i>XK</i>)	Ксилоза	120	0,35	14	[46]
DLG-K1T7 (HXT7)	Ксилозоредуктази (<i>XYLI</i>), ксилітдегідрогенази (<i>XYL2</i>), ксилулокінази (<i>XKSI</i>)	Глюкоза, ксилоза	36	0,38	15	[47]
39a (Bvu)	Ксилозоізомерази (<i>XI</i>)	Ксилоза	24	0,36	16,7	[48]
SyBE003	Ксилозоізомерази (<i>XylA</i>), ксилулокінази (<i>XKSI</i>)	Ксилоза	36	0,43	18	[49]
BSGIBX	Ксилозоізомерази (<i>Ru-xylA</i>) та β -ксилозидази (<i>xyl3A</i>)	Глюкоза, ксилоза	48	0,47	19,4	[22]
WR311	Ксилозоізомерази (<i>XI</i>)	ксилоза	72	0,40	21	[50]
K7-XYL	Альдозоредуктази (<i>GRE3</i>), сорбітолдегідрогенази (<i>SOR1</i>), ксилулокінази (<i>XKSI</i>)	Ксилоза	72	0,37	37,6	[51]
BF3645	Ксилозоізомерази (<i>RfCO</i>), целобіозофолфорилази (<i>FD-I</i>), ксилулокінази (<i>XKSI</i>)	Глюкоза, ксилоза, целобіоза	96	0,44	48,6	[52]
CW9	Ксилозоізомерази (<i>XI</i>)	Глюкоза, ксилоза	72	0,45	54	[27]

При використанні лігноцелюлози як субстрату для виробництва бутанолу виникає необхідність її попередньої обробки з метою руйнування щільної структури та оцукрювання. Для цього використовують фізичні, хімічні та біологічні методи. У процесі попередньої обробки лігноцелюлозної сировини фізичними чи хімічними методами утворюється велика кількість токсичних сполук, які є інгібіторами мікробної ферментації [53]. При цьому дріжджі *S. cerevisiae* є стійкими до токсичної дії інгібіторів, що утворюються при попередній обробці лігноцелюлозної сировини паром [54].

Створено штам *S. cerevisiae* D5A^{HN}, в клітини якого введено ген ксилозоізомерази *Bacteroides thetaiotaomicron*. Дані сахароміцети здатні використовувати у якості субстратів для синтезу етанолу попередньо оброблену паром солому трітікале та макуху солодкого сорго. При вказаному способі обробки утворюються такі токсичні для клітин побічні продукти як оцтова кислота, фурфурол та 5-гідроксиметилфурфурол. Клітини штаму D5A^{HN} є стійкими до даних інгібіторів [55].

S. cerevisiae XUSEA синтезує рекомбінантну ксилозоізомеразу, що опосередковує одностадійну реакцію ізомеризації, в якій ксилоза перетворюється у ксилулозу. Також вказаний штам здатен до коферментації глюкози і ксилози. Показано, що при підвищенні температури культивування *S. cerevisiae* XUSEA на середовищі з гідролізатом міскантуса з 30 до 33°C швидкість споживання ксилози збільшується на 44 %, а синтез етанолу – на 23 %, що призводить до виходу етанолу 0,48 г/г цукрів [26].

Рекомбінантні клітини *S. cerevisiae* STXQ також здатні до коферментації глюкози і ксилози. При культивуванні даного штаму на середовищі з гідролізатом пустих залишків пальмових фруктів без процесу детоксикації для видалення інгібіторів, спостерігали споживання цукрів на рівні 94 %. При цьому вихід етанолу склав 0,42 г/г цукрів [56].

У рекомбінантних дріжджах при використанні шляху КР-КДР спостерігається окисно-відновний дисбаланс, що призводить до накопичення ксилітолу та зменшення концентрації етанолу. Тому в клітини *S. cerevisiae* JX123_поxE був введений ген NADH-оксидази *Lactococcus lactis*. В результаті синтез побічного продукту ксилітолу при культивуванні даного штаму на середовищі із гідролізатом міскантусу зменшився на 48 %, а вихід етанолу становив 0,43 г/г цукрів [57].

Гідролізати лігноцелюлозної сировини, крім ксилози, містять у великій кількості арабінозу. Тому, з метою синтезу етанолу на лігноцелюлозних субстратах, сконструйовано штам *S. cerevisiae* 36aS1.10.4. Дані дріжджові клітини містять гени *Lactobacillus plantarum*, що кодують ферменти утилізації арабінози, а також гени ксилозоізомерази. Показано здатність клітин штаму 36aS1.10.4 до одночасного споживання глюкози і ксилози та до продукції етанолу у високій концентрації на лігноцелюлозних гідролізатах [28].

Узагальнену інформацію щодо можливості культивування рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* на середовищі із різними гідролізатами лігноцелюлозної сировини з метою отримання етанолу наведено у таблиці 1.2.

Таблиця 1.2

Гідролізати лігноцелюлозної сировини як субстрати для синтезу етанолу модифікованими дріжджами *Saccharomyces cerevisiae*

Штам	Лігноцелюлозна сировина	Тривалість культивування, год	Концентрація етанолу, г/л	Джерело
D5A ^{+H}	Макуха солодкого сорго	150	19,2	[53]
BADE ₁	Солома кукурудзи	48	26,1	[26]
STXQ	Пусті залишки пальмових фруктів	72	28,4	[56]
XUSEA	Міскантус	48	30,1	[58]
36aS1.10.4	Пусті залишки пальмових фруктів	72	50,3	[28]
	Солома пшениці	46	54,1	
JX123 _{noxE}	Міскантус	48	55,5	[57]

1.1. Бутанол.

У порівнянні з етанолом, бутанол має ряд переваг: вища температура кипіння, менша гігроскопічність, менша корозійна активність, більш високе октанове число. Також, слід відзначити, що використання бензину, змішаного з бутанолом призводить до зменшення викидів вихлопних газів [59].

Природними продуцентами бутанолу є бактерії роду *Clostridium*. Недоліком їх використання є низька швидкість росту, утворення спор, низька стійкість до бутанолу, утворення побічних продуктів, а також дані бактерії є строгими анаеробами. Тому увагу дослідників привертають інші мікроорганізми, які широко використовуються у промислових масштабах, а саме дріжджі *S. cerevisiae* (табл. 1.3). При конструюванні здатних до продукції бутанолу рекомбінантних клітин *S. cerevisiae* найчастіше використовують дві стратегії: гетерологічна експресія генів *Clostridium* або поглинання амінокислот [60].

**Генетично модифіковані штами *Saccharomyces cerevisiae* –
продуценти бутанолу**

Штам	Шлях синтезу бутанолу	Тривалість культивування, год	Концентрація бутанолу, мг/л	Джерело
VSU10	Зворотнє β -окислення (шлях ацетил-КоА)	74	130	[61]
COM	Синергічний шлях (треоніновий і цитрамалатовий)	96	835	[62]
W303-1A	Два паралельні шляхи (гетерологічний шлях експресії генів <i>Clostridium</i> і ендегенний за рахунок делеції гену алкогольдегідрогенази (<i>ADH1</i>))	312	2400	[63]

Вихідним субстратом бутанольного шляху є ацетил-кофермент А (ацетил-КоА), а більшість проміжних продуктів пов'язані з коферментом А (КоА). Тому у штамі *S. cerevisiae* VSU10 збільшено синтез КоА за рахунок надекспресії гену пантотенаткінази (*coaA*) *Escherichia coli*. А шляхом делеції генів алкогольдегідрогенази (*ADH1-5*) і гліцерол-3-фосфатдегідрогенази (*GPD2*) вдалось збільшити доступність ацетальдегіду і NADH як рушійних факторів для шляху бутанолу [61].

Ключовий проміжний продукт ендегенного шляху синтезу бутанолу α -кетобутират може бути синтезований шляхом катаболізму треоніну. Іншим способом отримання α -кетобутирату є шлях від пірувату і ацетил-КоА через цитрамалатсинтазу. Використовуючи методи метаболічної інженерії, створено штам *S. cerevisiae* COM, у клітинах якого оптимізовано синергічний шлях синтезу бутанолу – шлях ендегенного треоніну і введений шлях цитрамалату. При цьому синтез бутанолу збільшився у 7 разів у порівнянні з вихідним немодифікованим штамом дріжджів [62].

При дослідженні шляхів синтезу бутанолу рекомбінантним штамом *S. cerevisiae* W303-1A була висунута гіпотеза про те, що гліцин перетворюється в гліоксилат, який далі конденсується з бутирил-КоА в 3-етилмалат. Після чого 3-етилмалат перетворюється в α -кетовалерат, а потім в бутанол. Використання α -кетовалерата як попередника у середовищі для культивування дріжджів призвело до збільшення концентрації бутанолу [63].

1.2. Ізобутанол.

Даний спирт вважають біопаливом наступного покоління, який може замінити дизельне паливо. Нині проводяться дослідження використання ізобутанолу у суміші із з дизельним паливом. При цьому спостерігають збільшення термічного ККД гальм на 3 % та зменшення викидів продуктів горіння (оксиди азоту, чадний газ) на 60 % [64].

Основні реакції для отримання ізобутанолу включають синтез 2-кетоізовалерату, що є проміжним продуктом біосинтезу валіну в мітохондріях і його подальше перетворення в ізобутанол через шлях Ерліха в цитоплазмі. Тобто ізобутанол є побічним продуктом синтезу валіну у *S. cerevisiae*. Для збільшення синтезу ізобутанолу конструюють рекомбінантні штами дріжджів (табл. 1.4), використовуючи при цьому такі шляхи: переміщення ферментів, що відповідають за продукцію ізобутанолу в один і той же внутрішньоклітинний компартмент; видалення конкурентного шляху для направлення потоку до побічних продуктів; усунення дисбалансу кофакторів [65].

Синтез ізобутанолу штамми *Saccharomyces cerevisiae*

Рекомбінантний штам	Тривалість культивування, год	Вихід ізобутанолу, мг/г глюкози	Концентрація ізобутанолу, мг/л	Джерело
YTD306	120	6,6	143	[66]
JHY433	120	15	377	[67]
Isoy8	90	15	630	[68]
BSW205	24	16	1620	[69]
JWY23	96	59,55	2090	[70]

Рекомбінантний штам *S. cerevisiae* Isoy8 модифікований таким чином, що у дріжджових клітинах ферменти біосинтезу валіну функціонують не у мітохондріях, а у цитоплазмі. При цьому збільшення синтезу ізобутанолу спостерігалось при відсутності валіну і у середовищі культивування [66].

У клітини *S. cerevisiae* YTD306 введено гени декарбоксилази 2-кетокислот і алкогольдегідрогенази для посилення ендогенної активності шляху Ерліха. Також введено ген *Ilv2*, що каталізує першу стадію синтезу валіну і видалено ген піруватдекарбоксилази. В результаті був збільшений синтез ізобутанолу модифікованими клітинами в 13 разів [64].

Блокуючи шляхи біосинтезу 2,3-бутандіолу, пантотенату, лейцину і ізолейцину, було оптимізовано і збільшено метаболічний потік у бік синтезу ізобутанолу в *S. cerevisiae* JWY04. В клітинах штаму JWY19 збільшено синтез ізобутанолу за рахунок пригнічення реакцій поглинання пірувату і регенерації NAD⁺ в шляхах біосинтезу етанолу і гліцерину. Синтез ізомасляної кислоти із ізобутиральдегіду також конкурує із продукцією ізобутанолу. Тому в *S. cerevisiae* JWY23 видалено ген *Ald6*, що кодує синтез альдегіддегідрогенази, при цьому спостерігається зменшення синтезу ізомасляної кислоти на 80 % та збільшення синтезу ізобутанолу на 40 % [70].

РОЗДІЛ 2. ОТРИМАННЯ ІНШИХ ПРАКТИЧНО ЦІННИХ СПОЛУК

1.1. Органічні кислоти. Їх широко використовують у різних галузях промисловості: в хімічній як сировину для органічного синтезу; у харчовій як консерванти, стабілізатори, антиоксиданти та ароматизатори; у фармацевтичній для синтезу лікарських препаратів; у косметичній для отримання ароматичних речовин. Нині органічні кислоти одержують за допомогою хімічного, ферментативного і мікробного синтезу. Продуцентами органічних кислот, одержаних методами біотехнології, є міцеліальні гриби, бактерії і дріжджі. Серед останніх досить перспективними є сахароміцети (табл. 2.1), оскільки вони є стійкими до дії інгібіторів і витримують низькі значення рН.

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Потапенко В.В.</i>			РОЗДІЛ 2. ОТРИМАННЯ ІНШИХ ПРАКТИЧНО ЦІННИХ СПОЛУК	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		<i>Скροцька О.І.</i>					22	21 13
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						

Таблиця 2.1

**Біосинтез органічних кислот генетично модифікованими
дріжджами *Saccharomyces cerevisiae***

Штам	Умови біосинтезу	Концентрація кислоти, г/л	Джерело
Бурштинова кислота			
АН22ura3Dsdh2Dsdh1 Didh1Didp1	t = 30 °C, 168 год, 150 об/хв, pH=4	3,62	[71]
PMCFfg	t = 30 °C, 120 год, 200 об/хв, pH=3,8	13	[72]
Фумарова кислота			
FMME-002Δ FUM1 + ↑ RoPYC	t = 30 °C, 96 год, 200 об/хв, pH=5	1,67	[73]
FMME-001 ↑ PYC2 + ↑ RoMDH	t = 30 °C, 24 год, 200 об/хв, pH=5,5	3,18	[74]
FMME004-6	t = 30 °C, 96 год, 200 об/хв, pH=5,5	5,64	[75]
3-Гідроксипропіонова кислота			
HPY11	t = 30 °C, 72 год, 180 об/хв	0,463	[76]
ST687	t = 30 °C, 100 год, 250 об/хв, pH=5	9,8	[77]
SCE-R2-200	t = 30 °C, 80 год, 250 об/хв, pH=5	13,7	[78]
D-молочна кислота			
YPH499 / dPdA3-34 / DLDH / 1-18	t = 30 °C, 22 год, 150 об/хв, pH=7	60,3	[79]
JHY5730	t = 30 °C, 55 год, 170 об/хв, pH=3,5	82,6	[80]
JHY5330	t = 30 °C, 51 год, 170 об/хв	112	[81]
L-молочна кислота			
SP7	t = 30 °C, 30 год, 80 об/хв, pH=3,5	117	[82]
n-Кумарова кислота			
ARO1-ARO2 ST4067	t = 30 °C, 72 год, 250 об/хв	2	[83]
Ітаконова кислота			
Δade3 Δbna2 Δtes1	t = 30 °C, 72 год	0,168	[84]
Муконова кислота			
MuA12	t = 30 °C, 48 год, 225 об/хв	0,141	[85]

Бурштинова кислота використовується в харчовій промисловості, а також як прекурсор для синтезу полієфірів, смол, барвників та фармацевтичних препаратів. Завданням метаболічної інженерії *S. cerevisiae* для ефективного синтезу бурштинової кислоти є блокування шляху утворення

спирту, а також розробка швидких і ефективних метаболічних шляхів, які зв'язують гліколіз із циклом трикарбонових кислот [86].

Фумарову кислоту використовують у реакціях полімеризації та етерифікації; у медицині – при лікуванні псоріазу; у тваринництві – як добавку до корму великої рогатої худоби, що призводить до зменшення викидів метану. При конструюванні *S. cerevisiae*, здатних до продукції фумарової кислоти, використовують дві метаболічні стратегії: прямий та зворотній цикл трикарбонових кислот. Китайськими вченими сконструйовано штам дріжджів, в клітині якого було введено гени, що кодують сукцинат-фумаратний транспортер та піруваткарбоксілазу. Це призвело до збільшення синтезу фумарової кислоти на 46 % [73].

За допомогою 3-гідроксипропіонової кислоти отримують акрилову та малонову кислоти, 1,3-пропандіол, біодеградабельні полієфіри та інші практично цінні сполуки. Біосинтез 3-гідроксипропіонової кислоти може відбуватись через такі проміжні продукти як гліцерин, лактат, малоніл-КоА або β -аланін. Так, створено штам *S. cerevisiae* SCE-R2-200, в клітині якого введено ген β -аланін-піруват-амінотрансферази *Bacillus cereus*. Показано, що клітини штаму SCE-R2-200 здатні до синтезу 3-гідроксипропіонової кислоти при низьких значеннях рН (3,5), що знижує ймовірність бактеріального інфікування в процесі біосинтезу, а також зменшує загальні витрати на процес культивування, оскільки відпадає необхідність у стадії нейтралізації [78].

Ітаконова кислота використовується для виробництва полімерів, зокрема поліітаконової кислоти, а також таких хімічних сполук як стирен, 2-метил-1,4-бутандіол та 3-метитетрагідрофуран. Blazeck зі співавтор. для конструювання дріжджового продуцента ітаконової кислоти застосували наступні підходи: видалення генів цитоплазматичної С1-тетрагідрофолат синтази, триптофан 2,3-диоксигенази, пероксисомальної ацил-КоА

тіоестерази; введення гену декарбоксилази цис-аконітової кислоти *Aspergillus terreus*; культивування за високої густини клітин [84].

L-молочна кислота є мономером полімолочної кислоти, яку використовують для отримання біопластику. Немодифіковані *S. cerevisiae* не здатні до продукції L-молочної кислоти, але, через їх стійкість до дії кислот, проводяться спроби генетичної модифікації даних клітин з метою отримання ефективних продуцентів [14]. D-молочну кислоту також використовують для отримання полімолочної кислоти. При цьому обидва вказані оптичні ізомери необхідні для отримання біодеградабельної полімолочної кислоти з покращеними характеристиками [81].

1.2. Ферменти. Клітини *S. cerevisiae* модифікують з метою отримання практично цінних ферментів (табл. 2.2). Так, целобіозодегідрогенази (Е.С. 1.1.99.18) володіють специфічністю до β -1,4-зв'язаних дисахаридів, що дозволяє їх використовувати у біосенсорах, біоремедіації або у біокаталізі. Для створення рекомбінантних сахароміцетів Blazic зі співавт. виділили ген целобіозодегідрогенази (*cdh*) із *Phanerochaete chrysosporium* та вперше показали можливість його успішної гетерологічної експресії у клітинах *S. cerevisiae* InvSC1. Автори сконструювали та описали різні рекомбінантні штами сахароміцетів. При цьому найактивнішими виявились три штами – M65S, S137 N и M685V [87].

Ферменти, що синтезуються рекомбінантними сахароміцетами

Фермент	Штам <i>S. cerevisiae</i>	Активність*, Од/мл	Молекулярна маса, кДа	Джерело
Целобіозодегідрогеназа	S137 N	0,04	120-150	[87]
Ліпаза	FDS101	14	38	[88]
Декстраназа	XD03	58,45	63	[89]
Лаказа III	TYEGLAC3-1	1,17	д.н.н.	[90]
	BY2777	0,045	70-120	[91]
Лаказа Gr2	4A9	0,6	д.н.н.	[92]
Віск-синтаза	H1246	д.н.н.	57	[93]
Кутиназа	ScTEF1	29,7	29	[94]

Примітки: * – активність у супернатанті; д.н.н. – дані не наведені.

Ліпази (Е.С. 3.1.1.3) знайшли застосування у харчовій, легкій та косметичній промисловості, медицині, сільському господарстві. Їх використовують у процесі виробництва біодизелю, для гідролізу натуральних олій і жирів. Ліпази залишаються активним при низьких температурах (4 °С) і рН 3-4. Дріжджі *S. cerevisiae* не продукують позаклітинні ліпази і не здатні споживати ліпідні субстрати. Тому ген ліпази (*Lip2*) *Yarrowia lipolytica* був введений у клітини сахароміцетів. При цьому отримано рекомбінантний штам *S. cerevisiae* FDS101, клітини якого можна культивувати на таких субстратах як оливкова олія та інших ліпідовмісних джерелах вуглецю [88].

Декстраназу (Е.С. 3.2.1.11) широко використовують у харчовій промисловості під час виробництва цукру. Цей процес зазвичай вимагає високих температур, тому існує потреба у термостабільних ферментах. Тому створено штам *S. cerevisiae* XD03, в клітини якого введено ген α -декстранази *Chaetomium gracile*. Показано, що рекомбінантна декстраназа є стабільною у діапазоні рН від 4 до 6 та температурі до 60 °С [89].

Лакази (Е.С. 1.10.3.2) використовують кисень як кінцевий акцептор електронів і каталізують відновлення кисню до води, що супроводжується

окисненням ряду ароматичних сполук, таких як дифеноли, монофеноли і ароматичні аміни. Ці ферменти використовують у процесах делігніфікації, для очищення стічних вод, у харчовій біотехнології, для біоремедіації забрудненими токсичними речовинами об'єктів довкілля, а також у ферментних біосенсорах. Мікроорганізми можуть продукувати кілька типів лаказ, серед яких лаказа III типу синтезується у великих кількостях [95].

Рекомбінантні клітини *S. cerevisiae* TUEGLAC3-1 містять ген лакази *lac3*, що був виділений із міцеліальних грибів *Cryphonectria parasitica*. При цьому гетерологічна експресія даного ферменту негативно впливала на синтез біомаси дріжджів, відповідно і його активність була низькою. Здійснивши оптимізацію параметрів культивування ($t=25$ °C, перемішування – 100 об/хв, $pH=3,5$), вдалося збільшити активність лакази у культуральній рідині у 56 разів [90].

У клітини штаму *S. cerevisiae* BY2777 був введений ген лакази *cvl3* *Trametes versicolor*. При цьому спостерігався синтез високоглікозильованої рекомбінантної лакази з нижчою спорідненістю до субстрату, ніж у нативної. Такі властивості рекомбінантного ферменту, як термостабільність і оптимум дії pH, залишились без змін. Щодо молекулярної маси, то для рекомбінантної лакази вона варіювала від 70 до 120 кДа, в той час, як для нативної – 66 кДа [91].

Нещодавно був сконструйований штам *S. cerevisiae* 4A9, який продукує лаказу Gr2 *Fusarium oxysporum*. Для збільшення експресії та активності рекомбінантного ферменту автори застосували методи білкової інженерії та молекулярного моделювання. В результаті був відібраний штам генномодифікованих сахароміцетів, що характеризувався збільшеною у 10 разів каталітичною активністю лакази [92].

Віск-синтази (Е.С. 2.3.1.75) є ферментами для біосинтезу воскових ефірів, які використовують для отримання для мастильних матеріалів. Також дані ферменти застосовують для виготовлення харчових покриттів і при виробництві косметики та у фармацевтиці. Shalini зі співавтор. сконструювали рекомбінантний штам *S. cerevisiae* H1246, що містить ген віск-синтази соняшника (*Helianthus annuus*). Це перше повідомлення, автори якого здійснили ідентифікацію та виділили ген віск-синтази соняшника (*HaWS*), а також показали його успішну гетерологічну експресію у клітинах дріжджів [93].

Кутинази (Е.С. 3.1.1.74) здатні здійснювати гідроліз різних ефірів. Їх використовують у харчовій, хімічній та фармацевтичній промисловості. Нині ведуться дослідження щодо створення рекомбінантних продуцентів, що містять ген кутинази *tfu* термофільних актинобактерій *Thermobifida fusca*. Зокрема, сконструйований штам *S. cerevisiae* ScTEF1, клітини якого синтезують термостабільну кутиназу, що має оптимум дії при температурі 60 °C і рН=8,0 [94].

1.3. Фармацевтичні білки. Вони складають одну з найбільших груп біосполук, що відіграють важливу роль в лікуванні багатьох захворювань. Для отримання рекомбінантних фармацевтичних білків використовують різні системи експресії: бактерії, дріжджі та перещеплювані клітини еукаріотів. При цьому саме дріжджі задовольняють наступним вимогам: швидкий ріст на простих поживних середовищах, детально вивчений геном і доступність генетичних маніпуляцій, наявність післятрансляційних модифікацій білкових молекул [96].

Гірудин є активним антикоагулянтном і запобігає згортанню крові шляхом пригнічення дії ферменту тромбіну, а також впливає і на інші фактори згортання крові. Обмежена доступність природного гірудину, який отримують

з екстракту п'явок, призвела до розвитку технологій рекомбінантного гірудину [97], який можна отримати з використанням дріжджів *S. cerevisiae* (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Синтез рекомбінантних білків *Saccharomyces cerevisiae*

Штам	Концентрація, мг/л	Умови біосинтезу	Джерело
Гірудин			
2805/MdHIR	19	t = 30 °C, 28 год, 200 об/хв, рН=5,5	[98]
2805/MdHIRd	36	t = 30 °C, 22 год, 600 об/хв, рН=5,5	[99]
2805/MδHIR gal1	62	t = 30 °C, 50 год, рН=5,5	[100]
K _{La}	390	t = 30 °C, 65 год, рН=5,4	[101]
Δgal1	400	t = 30 °C, 50 год, рН=5,4	[102]
Глутатіон			
MET16	44	t = 30 °C, 24 год, 150 об/хв	[103]
GCIΔ GLR ₁ /ERV ₁ ^{S32A}	106	t = 30 °C, 72 год, 150 об/хв	[104]
MG	122	t = 30 °C, 48 год, 200 об/хв	[105]
GCI (XR/XDH/XK)	200	t = 30 °C, 120 год, 150 об/хв, рН=4,4	[106]
W303-1b/FGP	273	t = 30 °C, 24 год, 250 об/хв	[107]
Антитромбін III			
BY4741	312	t = 30 °C, 84 год, 250 об/хв, рН=7	[108]
Ексенатид			
Y2805	18	t = 30 °C, 48 год	[109]

Глутатіон виконує такі функції як імунна регуляція, детоксикація, антиоксидантний захист. Цей білок використовується у харчовій, фармацевтичній та косметичній галузях промисловості. При конструюванні рекомбінантних *S. cerevisiae*, що здатні до продукції глутатіону, використовують наступні три шляхи внутрішньоклітинного синтезу: дві послідовні реакції з γ -глутамілцистеїнсинтетазою та глутатіонсинтетазою; реакції з біфункціональним ферментом GshF (γ -глутамілцистеїнсинтетаза / глутатіонсинтетаза); конденсацію γ -глутамілфосфату та цистеїну з утворенням γ -глутамілцистеїну. Слід наголосити, що на сьогодні конструйовано штам *S. cerevisiae* W303-1b/FGP, у якому функціонують усі три

шляхи біосинтезу глутатіону, що призвело до підвищеної продукції даної сполуки [107].

Антитромбін III використовують для лікування тромботичних ускладнень, профілактики утворення тромбів під час проведення хірургічних операцій, а також призначають вагітним, які мають дефіцит даного білку. Антитромбін отримують з донорської крові. При його використанні існує ризик зараження патогенами, що можуть бути у крові донорів. Тому ведуться роботи щодо можливого отримання рекомбінантного антитромбіну [108].

Ексенатид є засобом для лікування діабету II типу. Його вводять підшкірно два рази на добу. Тому завданням генної інженерії є зменшення частоти ін'єкцій хворим за рахунок створення рекомбінантного ексенатиду більш тривалої дії зі збільшеним періодом напіввиведення. Jung зі співавтор. створили рекомбінантний штам *S. cerevisiae*, який продукує ексенатид з покращеними властивостями. Так, період напіврозпаду рекомбінантного білка збільшився майже у 4 рази при збереженні 72 % активності секреції інсуліну [109].

1.4. Каротиноїди. Дані пігменти – це ліпофільні сполуки терпеноїдів, яких на сьогодні ідентифіковано понад 750 видів. Каротиноїди проявляють протипухлинну, антимікробну та антиоксидантну активність. Вони позитивно впливають на імунну систему, репродуктивну функцію, метаболізм ліпідів; також досліджують можливість їх використання для профілактики та лікування таких захворювань як ожиріння, діабет, гіпертензія, атеросклероз, рак, а також серцево-судинних захворювань. Каротиноїди використовують у фармацевтичній, косметичній, харчовій галузях промисловості та кормовиробництві [110]. В останні роки ведуться роботи з конструювання рекомбінантних дріжджів *S. cerevisiae*, що продукують такі каротиноїди як астаксантин, лікопін і β -каротин (табл. 2.4).

Таблиця 2.4

Каротиноїди генетично модифікованих сахароміцетів

Каротиноїди	Штам <i>S. cerevisiae</i>	Тривалість культивування, год	Концентрація, мг/л	Вихід, мг/г сухої маси клітин	Джерело
Астаксантин	YastD-03	80	47,18	8,1	[111]
	SyBE_Sc118 060	168	81,0	4,5	[112]
β -каротин	β car1.2	80	750	6,9	[113]
	SR8B	90	772,8	20	[114]
Лікопін	BL03-Z-3	120	1480	33,1	[115]
Віолаксантин	+YB/2 tr59- HIZEP	32	50,0	7,6	[116]

1.5. Інші сполуки. Модифіковані дріжджі *S. cerevisiae* (табл. 2.5) використовуються для виробництва різних біохімічних і біопаливних продуктів, промислових ароматизаторів, оскільки вони є стійкими до дії різних інгібіторів. На сьогодні 1,2,4-бутантріол, 2,3-бутандіол, β -іонон та ін. отримують за допомогою хімічного синтезу. З огляду на те, що такий спосіб забруднює навколишнє середовище, альтернативою йому є мікробний синтез.

Таблиця 2.5

***Saccharomyces cerevisiae*, як продуценти рекомбінантних сполук**

Штам	Джерело вуглецю	Сполука	Концентрація, г/л	Тривалість культивування, год	Джерело
BD8D-2tkdcA-ΔBOL2-tTYW1	Гідролізат рисової соломи	1,2,4-бутантріол	1,1	96	[117]
BD5X-TXmNP	Ксилоза, глюкоза	2,3-бутандіол	96,8	168	[118]
YG01_SDBN	Гідролізат маніюки		132	69	[119]
Y2805GS	Бульби топінамбура	Ангідрид дифруктози III	77,5	36	[120]
2805Δgal80Δsuc2	Сахароза	Леван	76	24	[121]
β-iono5.3	Глюкоза	β-іонон	0,033	72	[122]

З використанням 1,2,4-бутантріолу отримують пропеленти та вибухові речовини, а також фармацевтичні субстанції та інші сполуки. Вперше рекомбінантний штам *S. cerevisiae*, що здатний до продукції 1,2,4-бутантріолу, був сконструйований Vamba зі співавтор. у 2019 р. При цьому як джерело вуглецю під час культивування використовували гідролізат лігноцелюлозної сировини [117].

У виробництві пом'якшувальних агентів, пластифікаторів, поліефірів, лікарських засобів та косметики використовують 2,3-бутандіол. Також дана сполука є вихідною сировиною для хімічного синтезу 2-бутанону (ефективної присадки до рідкого палива) і 1,3-бутадієну, що використовується для виробництва синтетичного каучуку. Нещодавно сконструйовано рекомбінантний штам *S. cerevisiae* YG01_SDBN, що містить гени α-ацетолактатсинтази (*alsS*) та α-ацетолактатдекарбоксилази (*alsD*) *Bacillus subtilis*, а також ген бутандіолдегідрогенази *BDH1*, що здійснює перетворення

ацетону у 2,3-бутандіол. Слід відзначити, що вказаний штам дріжджів здатний використовувати лігноцелюлозну сировину як єдине джерело вуглецю [119].

Ангідриди дифруктози III (DFA III) – циклічні димери фруктози, які використовуються як низькокалорійні підсолоджувачі. В організмі людини DFA III сприяють засвоєнню мінералів, виявляють пребіотичні властивості та імуномодулюючу дію. Оскільки інулін-фруктоотрансфераза каталізує перетворення інуліну на DFA III, то ген *AalFT*, що кодує синтез даного ферменту, з *Arthrobacter aureescens* був введений у клітини *S. cerevisiae*. При цьому при культивуванні рекомбінантних дріжджів на середовищі, що містило 200 г екстракту топінамбуру (120 г інуліну) вдалось отримати DFA III з виходом 64,6 %, а активність інулін-фруктоотрансферази у культуральній рідині склала 161 Од/мл [120].

Леван є природним гомополімером фруктози. Його використовують у харчовій та косметичній промисловості, а також медицині. Він проявляє ранозагоювальні, протизапальні, протипухлинні та антиоксидантні властивості, а також стимулює проліферацію імуноцитів. Крім того, леван можна використовувати як засіб для цільової доставки ліків. Під час біотехнологічного отримання левану використовують бактерії, які синтезують позаклітинну левансахаразу, що здійснює біоконверсію сахарози у леван. На сьогодні є лише кілька повідомлень про можливість синтезу левансахарази у рекомбінантних дріжджах. Так, корейськими науковцями було створено штам *S. cerevisiae*, в який інтегровано ген левансахарази *RaLsrA* із *Rahnella aquatilis*. Слід зазначити, що при культивуванні рекомбінантних сахароміцетів вихід левану в результаті конверсії сахарози склав 80 % [121].

Маючи приємний фіалковий аромат, β -іонон використовується як ароматизатор у парфумерній, косметичній та харчовій галузях промисловості. Його промислове виробництво реалізують за допомогою хімічного синтезу,

проте на сьогодні уже є розробки саме технологій мікробного синтезу β -іонону. Так, використовуючи популярну на сьогодні технологію редагування геномів CRISPR/Cas9, був створений штам сахароміцетів, у процесі культивування якого вдалось отримати 33 мг/л β -іонону. Це є найбільшим показником біосинтезу даної сполуки у рекомбінантних клітинах *S. cerevisiae* [122].

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Біоетанол використовується у різних галузях, зокрема медицина, хімічна промисловість, харчова промисловість, отримання палива (табл. 3.1) [123].

Таблиця 3.1

Сфери застосування біоетанолу

Сфера застосування	Використання
Медицина	Як розчинник, екстрагент і антисептик.
Хімічна промисловість	Для отримання ацетальдегіду, діетилового ефіру, тетраетилсвинцю, оцтової кислоти, хлороформу, етилацетату, етилену. Як розчинник (в лакофарбовій промисловості, у виробництві товарів побутової хімії). Є компонентом антифризів і склоомивачів, чистячих і миючих засобів. Є розчинником для репелентів.
Харчова промисловість	Компонент спиртних напоїв (горілка, вино, джин, пиво та ін.).
Паливо	Добавка до бензину, автомобільне паливо.

У данній роботі будемо розглядати застосування біоетанолу у якості добавки до бензина для автомобільного транспорту.

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Потапенко В.В.</i>			РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		<i>Скороцька О.І.</i>					35	34 12
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						

По статистиці тільки з 2000 року по 2014 рік показник виробництва біоетанолу в світі зріс у 5 разів – до 8,6 млрд дол. При додаванні 10% біоетанолу до бензина викиди аерозольних частинок зменшуються на 50%, а викиди оксиду вуглецю – на 30%. Так, в Євросоюзі діє директива 2009/28/ЕС, яка вимагала до 2020 року наростити частку біоетанолу в автомобільному пальному до 10% [124].

Так, до основних переваг біоетанолу належить:

– Екологічність. При використанні біоетанолу відбувається зменшення викидів парникових газів в атмосферу. Так, при використанні бензину Е10 (із вмістом біоетанолу 10%) викиди парникових газів зменшуються на 3,9%.

– Дешева сировина. Біоетанол виробляють з відновлюваної сировини, тому є можливість використання різних видів біомаси, зокрема, відходів сільського господарства.

– Технічні можливості. Двигуни, розраховані виключно на таке джерело енергії, повинні бути аж ніяк не гірше нинішніх бензинових або дизельних – в плані економічності, і в плані потужних характеристик.

– Безпека використання. Біопаливо для автомобілів зовсім нетоксичне, не має різкого запаху, не може викликати отруєння. При його використанні істотно знижується небезпека забруднення ґрунту, адже розлите паливо, потрапивши в землю, швидко розкладається під впливом мікроорганізмів [125].

Суттєвому зростанню ринку палива сприяло розроблення в 1990-х палива Е85 – суміші 85 % етанолу з 15 % нафтового бензину. Запропоноване «General Motors» паливо, октанове число змішування якого перевищувало 100 одиниць, мало великий «компресорний» ефект, сприяючи підвищенню потужності й крутного моменту. Невипадково гоночні автомобілі здавна працювали на спиртових сумішах. З іншого боку, Е85 виявилось набагато

екологічнішим, аніж бензин, завдяки меншій токсичності викидів і зниженню парникового ефекту. Як результат реалізації проекту було створено ринок E85 і парк автомашин, здатних працювати як на бензині, так і на «вісімдесят п'ятому» (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Приклади автомобілів, двигуни яких адаптовано до застосування палива E85

Виробник	Марка автомобіля
Chevrolet	Astra, Avalanche, Corsa, Impala, Meriva, Montana, Monte Carlo, Silverado, Suburban, Tahoe, Zafira
Chrysler	Sebring Sedan
Citroen	C3
Dodge	Caravan, Cargo Minivans, Durango, Grand Caravan, Ram Pickup, Stratus Sedan
Fiat	Mille, Palio, Siena
Ford	Crown Victoria, Explorer, F-150, Fiesta, Focus, Focus C-MAX, Grand Marquis, Ranger, Sport Track XLT, Taurus
GMC	Sierra, Yukon, Yukon XL
Mazda	B3000
Nissan	Titan
Peugeot	206
Renault	Clio, Scénic
Saab	9-5
Volkswagen	Golf City, Fox, Kombi
Volvo	S40, V50

Нині всі провідні виробники гарантують нормальну роботу карбюраторних двигунів при додаванні до 10 % етанолу – без модифікації паливної системи, а в разі застосування E85 – за незначних змін, які не впливають на загальну вартість автомобіля [126].

На сьогодні у всьому світі зростає інтерес до альтернативних видів автомобільного палива: більш економічних, екологічних і ефективних. Вони виробляються з невичерпних запасів і створюють менше викидів в атмосферу. Близько 30 % загальної потреби в паливі може бути заміщено біопаливом без впливу на зменшення виробництва продуктів харчування.

Однак, в Україні більша частка людей все ще використовують паливо на основі нафти (бензин, дизельне паливо). Види автомобільного палива, які представлені на ринку України наведено в табл. 3.3 [127].

Таблиця 3.3

Види автомобільного палива, які представлені на ринку України

Вид палива		Характеристика
Газ	зріджений вуглеводородний (нафтовий)	Доступний практично повсюди, виділяє менше токсичних речовин, ніж бензин або дизель, повністю згорає при використанні.
	стиснений вуглеводородний (нафтовий)	
	стиснений природний	
Електроенергія	від розетки (акумуляторна батарея)	Електрокари на акумуляторах удосконалюються з кожним роком. Для зарядки вони підключаються до джерела живлення. Електрохімічна реакція в двигуні не забруднює навколишнє середовище.
	від сонця	
	від паливних елементів	
Пропан		Зріджений нафтовий газ – побічний продукт нафтопромисловості.
Водень		Використовується в системах з природним газом і електричних паливних елементах.
Етанол		Змішується з бензином для підвищення октанового числа палива та мінімізації токсичних викидів.
Біодизель		Виготовлений на основі рослинних або тваринних жирів, включаючи відходи харчової промисловості. Піддається біохімічному розкладу.
Бензин	E85	Легкокиплячі рідкі вуглеводні, які виділяються при переробці твердого палива, перегонці нафти, осушування природного газу.
	E92	
	E95	
	E98	
	E100	

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Згідно офіційних даних станом на 2018 рік у місті Києві зареєстровано 1,06 млн автомобілів [128].

Приймаємо, що в середньому в Києві автомобіль в день проїжджає 30 км та витрачає при цьому 11 л бензину (з розрахунку 11 л на 100 км).

Витрати бензину в місяць на пересування одним автомобілем:

$3,3 \text{ л} \times 30 \text{ днів} = 99 \text{ л/місяць бензина.}$

Витрати бензину в рік на пересування одним автомобілем:

$99 \text{ л} \times 12 = 1188 \text{ л/рік бензина.}$

Тому, враховуючи, що офіційно [128] в Києві зареєстровано 1,06 млн автомобілів, загальна кількість бензину в рік на пересування для автомобілів міста Києва буде становити:

$1188 \times 1060000 = 1259280000 \text{ л/рік} = 1259280 \text{ м}^3/\text{рік бензина.}$

Згідно з ДСТУ 7687:2015 «Бензини автомобільні Євро. Технічні умови», який розроблений на заміну ДСТУ 4839:2007 «Бензини автомобільні підвищеної якості. Технічні умови», і поширюється на автомобільні бензини Євро, залежно від октанового числа за дослідним методом встановлені такі марки бензинів: А-80, А-92, А-95 і А-98.

Також за рівнем екологічної безпеки встановлено класи бензинів: Євро3, Євро4 і Євро5, які відрізняються здебільшого вмістом сірки, мг/кг, не більше 150, 50 і 10 відповідно. Бензини екологічного класу Євро5 відповідають загальним технічним вимогам, встановленим у європейському стандарті EN 228:2012.

За вмістом біоетанолу (% об.) встановлено певні види бензинів: Е5 – не більше ніж 5%; Е7 – понад 5% та не більше 7%; Е10 – понад 7% та не більше 10%.

Переваги бензинів Євро. Суміш бензину і спирту містить меншу кількість сірки, бензолу та інших шкідливих для двигуна речовин. Відповідно, зменшується й кількість продуктів згоряння, які призводять до прискореного спрацювання деталей двигуна й окислення моторної оливи. Відтак моторна олива і двигун мають триваліший термін експлуатації. З тієї ж причини слугують довше і свічки запалювання, а токсичність відпрацьованих газів знижується майже вдвічі.

За введення від 5 до 10% етанолу в бензин із октановим числом 80 – 95 одиниць за дослідним методом підвищується його детонаційна стійкість на 2 – 6 одиниць. Крім того, етанол ефективніше згорає, в результаті чого двигун працює стабільніше, знижується ризик його перегрівання і прогорання випускних клапанів, немає детонації [129].

Отже, враховуючи, що біоетанол додається в кількості від 5 до 10% (приймаємо – 5%), а річна потреба у бензині для автомобілів міста Києва складає 1259280000 літрів (1259280 м³), то його потреба для додавання до бензина буде складати:

$$1259280000 – 100\%$$

$$X – 5\%$$

$$X = 62964000 \text{ л/рік} = 62964 \text{ м}^3/\text{рік} \text{ біоетанолу.}$$

Отже, річна потреба у біоетанолі для автомобілів Києва при додаванні у бензин (5%) сягає 62964000 л (62964 м³).

Враховуючи конкуренцію на ринку автомобільного палива (табл. 3), а також конкуренцію між виробниками біоетанолу, то приймаємо 0,05% від загальної потреби біоетанолу:

$$62964000 – 100\%$$

$$X – 0,05\%$$

$$X = 31482 \text{ л/рік} \text{ біоетанолу.}$$

Отже, річна потреба у біоетанолі з урахуванням конкуренції на ринку для автомобілів міста Києва складає 31482 л.

Перерахунок на масу:

$$V=31482 \text{ л}=31,482 \text{ м}^3$$

$$m=\rho \times V=789,3 \text{ кг/м}^3 \times 31,482 \text{ м}^3=24849 \text{ кг}=24849000 \text{ г.}$$

Вміст біоетанолу на 1 л культуральної рідини *S. cerevisiae* 36aS1.10.4 становить 54,1 г/л. Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 24849000 г (24849 кг) біоетанолу становить:

$$54,1 \text{ г} - 1 \text{ л;}$$

$$24849000 \text{ г} - X$$

$$X = 24849000 / 54,1 = 459316 \text{ л культуральної рідини.}$$

Приймаємо, що в процесі біосинтезу буде 40% втрат, тоді кількість необхідної культуральної рідини буде становити:

$$459316 \text{ л} - 100\%$$

$$x - 140\%$$

$$x = 459316 \times 140 \div 100 = 643043 \text{ л} \approx 643 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини.}$$

На рис. 3.1 представлено покрокову узагальнюючу схему розрахунку необхідної культуральної рідини для отримання біоетанолу дріжджами *S. cerevisiae* 36aS1.10.4.



Рис. 3.1. Узагальнююча схема розрахунку необхідної культуральної рідини для одержання біоетанолу сахароміцетами *S. cerevisiae* 36aS1.10.4.

Для розрахунку кількості посівного матеріалу доцільно встановити кількість культуральної рідини за цикл ферментації.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Приймаємо кількість робочих трудоднів 200. В інші дні року буде проходити виробництво біобутанолу. Кількість культуральної рідини на добу:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{рд}} = 643043 / 200 = 3215 \text{ л.}$$

Кількість культуральної рідини за один цикл:

$$V_{\text{кр.}} = K_1 \times V_d \times T_{\text{цф}} / 24 = 1,2 \times 2297 \times 40 / 24 = 4594 \text{ л.}$$

4594 л культуральної рідини одержують у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{кр.}} / K_{\text{зап}} = 4594 / 0,6 = 7657 \text{ л.}$$

За отриманим значенням було вибрано ферментер об'ємом 10 м³. Робимо уточнення для перевірки розрахунків:

$$K_{\text{зап}} = V_{\text{кр}}/V_{\Gamma} = 4594/10000 = 0,46.$$

Так, в результаті – значення, яке не перевищує заданого.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом буде становити:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}/(1 - E_{\phi}) = 4594/0,90 = 5104,4 \text{ л.}$$

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 5104,4$ л.

Геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\phi} = V_{\text{роб.1}}/K_{\text{зап}} = 5104,4/0,6 = 8507,3 \text{ л.}$$

Найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10 \text{ м}^3$.

Уточнюємо прийнятий коефіцієнт:

$$K_{\text{зап}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 5104,4/10000 = 0,51.$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Кількість поживного середовища в ферментері:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}}/(1 + X_{\phi}) = 5104,4 / 1,1 = 4640,4 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу буде становити:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 5104,4 - 4640,4 = 464 \text{ л.}$$

Для одержання 464 л інокуляту можна використати інокулятор.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{0,9} = \frac{464}{0,9} = 515,6 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}}/(1 + X_{\text{па}}) = \frac{515,6}{1,1} = 468,7 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 515,6 - 468,7 = 46,9 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту 515,6 л можна одержати під час культивування сахароміцетів в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін}} = V_{\text{роб.2}}/K_{\text{зап}} = 515,6/0,6 = 859,3 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сф}} = 1 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий коефіцієнт: $K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.2}}/V_{\text{сф}} = 515,6/1000 = 0,52$.

Для одержання 46,9 л посівного матеріалу дріжджів можна використовувати інокулятор.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{0,9} = \frac{46,9}{0,9} = 52,1 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}}/(1 + X_{\text{па}}) = \frac{52,1}{1,1} = 47,4 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 52,1 - 47,4 = 4,7 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту 52,1 л можна одержати під час культивування сахароміцетів в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін}} = V_{\text{роб.3}}/K_{\text{зап}} = 52,1/0,6 = 86,9 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сф}} = 100 \text{ л}$, уточнюємо прийнятий коефіцієнт: $K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.3}}/V_{\text{сф}} = 52,1/100 = 0,52$.

4,7 л інокуляту для засіву інокулятора можна одержати культивуванням сахароміцетів у колбах на качалці. Тому використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення 0,2.

Кількість колб для отримання посівного матеріалу буде становити:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмз}} / V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}} = 4700 / 750 \times 0,2 \approx 32.$$

Отже, з метою одержання посівного матеріалу потрібно 32 качалочних колб. Тому, процес одержання біоетанолу сахароміцетами буде проходити у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6, буде проходити у три етапи (підготовка посівного матеріалу в 32 колбах на качалці, вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л та 1 м³).

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування

Геополітичні та екологічні проблеми, викликані використанням викопного палива, на додаток до недавніх побоювань громадськості з приводу нестачі продовольства з-за виробництва етанолу з харчової сировини спровокували перехід до більш стійких джерел енергії, а саме – виробництво біоетанолу з лігноцелюлозної сировини.

Лігноцелюлозні відходи є поновлюваним джерелом для виробництва біоетанолу, задля того, щоб уникнути продовольчої кризи, викликаній виробництвом етанолу із зернової сировини. *S. cerevisiae* широко використовується для виробництва біоетанолу, завдяки стійкості та високій продуктивності ферментації етанолу.

Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей одержання біоетанолу на різних середовищах з використанням різних рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* для подальшого вибору біологічного агента наведено у табл. 3. Для всіх штамів сахароміцетів використовують двостадійний спосіб культивування – тобто такий, за період якого на одному поживному середовищі йде накопичення біомаси, а на іншому – накопичення цільового продукту. Дані, наведені у таблиці свідчать про те, що найвища концентрація етанолу спостерігається у штама *S. cerevisiae* JX123_похЕ та дорівнює 55,5 г/л, а найнижча – у *S. cerevisiae* SXA-R2P-E (21 г/л).

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		<i>Потапенко В.В</i>			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ					
Перевір.		<i>Скряцька О.І.</i>						Літ.	Арк.	Акрюшів
Реценз.									47	49
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>								

Середнє значення даного показника, порівняно з наведеними, виявляється у *S. cerevisiae* 36aS1.10.4 (54,1 г/л). Нижчий показник часу культивування, порівняно з іншими, належить *S. cerevisiae* SXA-R2P-E (24 год), а найвищий – у *S. cerevisiae* 36aS1.10.4 (46 год). В свою чергу середнє значення часу культивування спостерігається у *S. cerevisiae* JX123_похЕ (38 год).

Однак, така характеристика технологічного процесу (див. табл. 4.1) є недостатньою для вибору біологічного агента. Тому, є доцільним подальше порівняння вартості поживних середовищ, які використовуються для процесу культивування наведеними трьома штамми сахароміцетів (табл. 4.2). Аналізуючи дані, наведені в табл. 4.2, можна засвідчити, що середовище для культивування *S. cerevisiae* 36aS1.10.4 (60,2 грн) є у вісім разів дешевше, ніж середовище для *S. cerevisiae* SXA-R2P-E (497,4 грн) та у десять разів дешевше, ніж середовище для *S. cerevisiae* JX123_похЕ (605,3 грн).

Таблиця 4.1

Порівняння сахароміцетів – продуцентів біоетанолу

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Умови культивування (тривалість, температура)	Особливості підготовки лігноцелюлозної сировини	Концентрація етанолу, г/л	Література
<i>S. cerevisiae</i> 36aS1.10.4	гідролізат соломи пшениці; дріжджовий екстракт – 10; пептон – 20	46 год, 30 °С, рН – 5,5	ферментативний гідроліз подрібненої соломи (6-10 см) целюлазою Celluclast Novozym (5 г/л) при 50 °С, рН 5,0, 96 год	54,1	Huang S., Liu T., Peng B., Geng, A. Enhanced ethanol production from industrial lignocellulose hydrolysates by a hydrolysate - cofermenting <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain. <i>Bioprocess Biosyst. Eng.</i> 2019, 42(5), 883-896. doi: 10.1007/s00449-019-02090-0.

Продовження таблиці 4.1

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Умови культивування (тривалість, температура)	Особливості підготовки лігноцелюлозної сировини	Концентрація етанолу, г/л	Література
<i>S. cerevisiae</i> SXA-R2P-E	гідролізат рисової соломи; дріжджова азотна основа – 6,7; суміш амінокислот (аденін, L-аргінін, L-аспарагінова кислота, L-гістидин, L-ізолейцин, L-лейцин, L-лізін, L-метіонін, L-фенілаланін, L-треонін, L-триптофан, урацил, L-тирозин, L-валін) – 0,79 г/л	24 год, 30°C, pH 5,5	ферментативний гідроліз рисової соломи (0,5 мм) целюлазою Cellic CTec2 (5,5 г/л) при 50 °C, pH 5,0, 72 год	21	Ko J. K., Um Y., Woo H. M., Kim K. H., Lee S. M. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered <i>Saccharomyces cerevisiae</i> harboring xylose isomerase-based pathway. <i>Bioresour. Technol.</i> 2016, 209, 290-296. doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.124.
<i>S. cerevisiae</i> JX123_noxE	гідролізат міскантуса; дріжджовий екстракт – 10; пептон – 20	38 год, 30°C, pH 5,5	ферментативний гідроліз міскантуса (3 мм) сумішню целюлаз Cellic CTec2 та Cellic HTec2 (9 г/л) при 50 °C, pH 5,0, 96 год	55,5	Lee, Y.G., Jin, Y.S., Cha, Y.L., Seo, J.H. Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Bioresour. Technol.</i> 2017, 228, 355-361. doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.042.

**Вартість компонентів поживного середовища для
культивування сахароміцетів**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>S. cerevisiae</i> 36aS1.10.4	Препарати для гідролізу			
	целюлаза Celluclast Novozym – 5	5900	29,5	1
	Компоненти поживного середовища			
	дріжджовий екстракт – 10,0	1632	16,3	2
	пептон – 20,0	720	14,4	3
	Вартість 1 л середовища – 60,2 грн			
<i>S. cerevisiae</i> SXA-R2P-E	Препарати для гідролізу			
	суміш целюлаз Cellic CTec2 – 5,5	63840	351,1	4
	Компоненти поживного середовища			
	дріжджова азотна основа – 6,7	10000	67	5
	суміш амінокислот – 0,79	100440	79,3	6
	Вартість 1 л середовища – 497,4 грн			
<i>S. cerevisiae</i> JX123_poxE	Препарати для гідролізу			
	суміш целюлаз Cellic CTec2 та Cellic HTec2 – 9	63840	574,6	7
	Компоненти поживного середовища			
	дріжджовий екстракт – 10,0	1632	16,3	2
	пептон – 20,0	720	14,4	3
	Вартість 1 л середовища – 605,3 грн			

Примітка. * - Ціни наведено станом на січень 2019 р. 1. <http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/celluclast.html>, 2. <http://agar.com.ua>, 3. <https://www.systopt.com.ua>, 4. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sae0020?lang=en®ion=UA>, 5. <https://www.rpicorp.com>, 6. <https://www.divbio.nl>, 7. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sae0020?lang=en®ion=UA>.

Задля того, щоб зробити остаточний вибір біологічного агента для отримання біостанолу на лігноцелюлозних відходах, розрахували умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 4.3). Умовна вартість 1 г етанолу *S.*

S. cerevisiae 36aS1.10.4 (1,1 грн/г) у десять разів дешевше, ніж 1 г етанолу *S. cerevisiae* JX123_похЕ (10,9 грн/г) та у майже двадцять два рази дешевше, ніж 1 г етанолу *S. cerevisiae* SXA-R2P-E (23,7 грн/г).

Таблиця 4.3

Умовна вартість 1 г цільового продукту з використанням різних штамів сахароміцетів

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація етанолу, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год
<i>S. cerevisiae</i> 36aS1.10.4	60,2	54,1	1,1	46
<i>S. cerevisiae</i> SXA-R2P-E	497,4	21	23,7	24
<i>S. cerevisiae</i> JX123 похЕ	605,3	55,5	10,9	38

Узагальнивши всі дані, наведені в табл. 4.1, табл. 4.2, табл. 4.3, вирішено, що в подальшій роботі доцільно використовувати штам 36aS1.10.4. Якщо розглядати тривалість культивування, то бачимо, що у штама SXA-R2P-E вона найнижча, що майже у 1,6 раза нижче, ніж у штама JX123_похЕ, та у майже 2 рази нижче, ніж у 36aS1.10.4. Штами JX123_похЕ і 36aS1.10.4 мають практично однакову концентрацію етанолу, у порівнянні зі штамом SXA-R2P-E, даний показник якого у 2,6 раза нижче. Не дивлячись на це, умовна вартість 1 г етанолу штама 36aS1.10.4 майже у 10 раз нижче, ніж штама JX123_похЕ, та у 21,5 раза нижче, ніж SXA-R2P-E. Середовище для культивування штама 36aS1.10.4 у вісім раз нижче, ніж штама SXA-R2P-E, та у десять разів нижче, ніж JX123_похЕ. Отже, порівнявши всі показники, виявлено, що більше переваг у штама 36aS1.10.4, який і буде використовуватись у майбутніх роботах.

4.1.1. Етапи конструювання рекомбінантного продуцента

У цій роботі дріжджовий штам конструювали шляхом однастадійної збірки ДНК *in vivo* з подальшою послідовною еволюційної інженерією на поживних середовищах, що містять оцтову кислоту. Касети, що містять різні гени ксілозоізомерази (XI) і гени шляху метаболізму арабінози, збирали *in vivo* і інтегрували в генотип ауксотрофного по урацилу штаму *S. cerevisiae* JUK36a з використанням інтегративної та реплікативної плазміди. Отриманий штам дріжджів 36aS1 згодом був поліпшений з метою утилізації пентози, шляхом культивування на середовищах, що містять ксиліозу, арабінозу, оцтову кислоту до тих пір, поки не спостерігалось ніякого подальшого поліпшення росту клітин. Так була отримана бібліотека штамів 36aS1.10 з оптимальною і стабільною інтеграцією генома генів метаболізму пентози. На рис. 4.1 представлено схему отримання рекомбінантного продуцента біоетанолу [28].

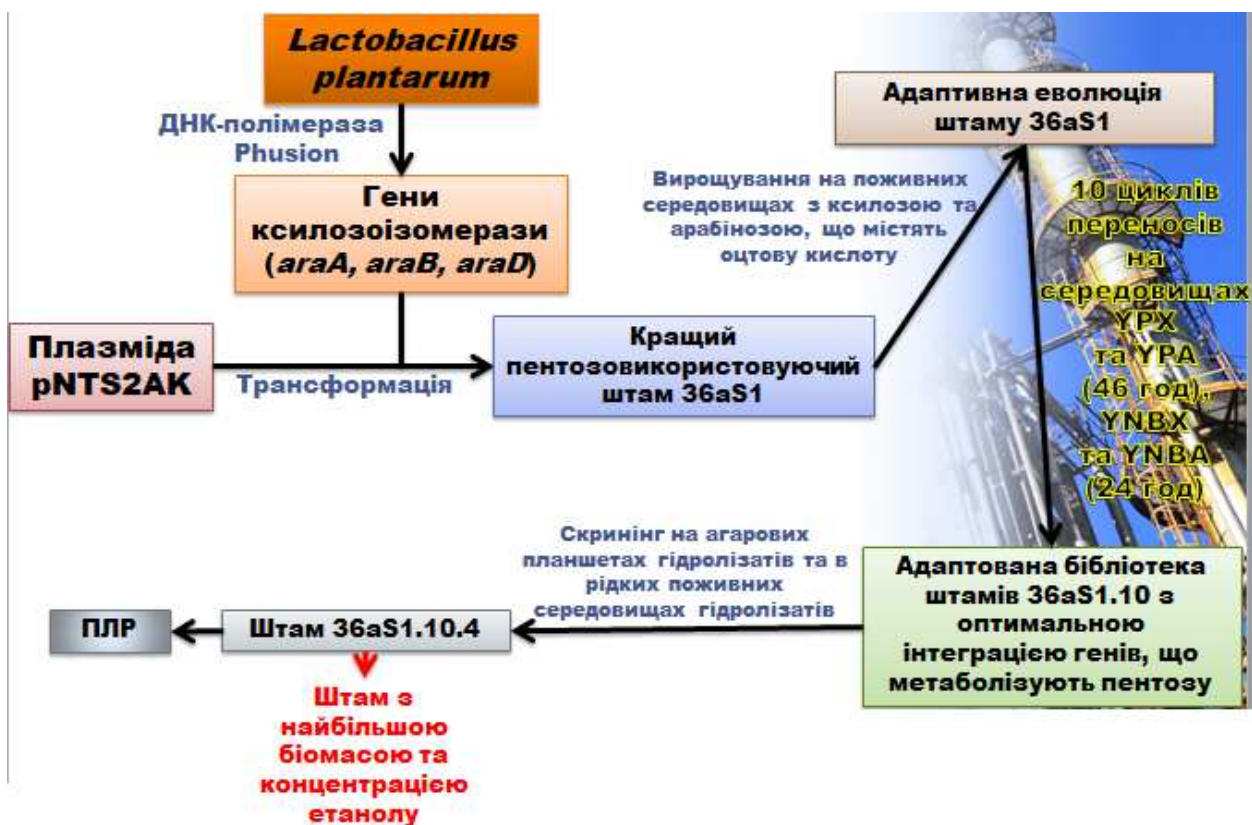


Рис. 4.1. Узагальнююча схема основних етапів конструювання рекомбінантного штаму *S. cerevisiae* 36aS1.10.4.

4.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Дріжджі *S. cerevisiae* є мезофілами, оскільки температурний оптимум для їх розмноження знаходиться в межах 25-30 °С. Низькі температури сахароміцети переносять добре, проте розмноження їх призупиняється (мінімальною температурою розвитку дріжджів є 2-3 °С). Зокрема, при температурі 40 °С ріст і розвиток дріжджів припиняється, в результаті чого дріжджі відмирають.

Також *S. cerevisiae* є ацидофілами, тобто розвиваються в кислому середовищі, оптимальне значення рН для сахароміцетів 4,5-5,0. Вони є факультативними анаеробами. Так, в аеробних умовах вони активно ростуть і розмножуються, а в анаеробних – здійснюють спиртове бродіння (ефект Пастера) [130].

Поверхневий спосіб культивування використовується при культивуванні аеробних мікроорганізмів на поверхні рідких і твердих поживних середовищ. При цьому мікроорганізми отримують кисень безпосередньо із повітря. Зважаючи на те, що в даному випадку для отримання біоетанолу є необхідним процес спиртового бродіння, який здійснюється в анаеробних умовах, то біосинтез продукту дріжджами *S. cerevisiae* буде проходити глибинним способом. Також культивування глибинним способом володіє перевагами, порівняно з поверхневим, зокрема: потребує менші площі для біосинтезу, має меншу ймовірність забруднення патогенною мікрофлорою, що забезпечується за допомогою створення надлишкового тиску у ферментері, стерилізацією поживного середовища та обладнання. В свою чергу періодичний спосіб культивування має менші ризики контамінації та є більш простим, порівняно з безперервним. Тому культивування *S. cerevisiae* з метою отримання біоетанолу буде проходити періодичним глибинним способом [131].

Серед вимог, на які звертають увагу при виборі ферментеру, найголовніше – забезпечення асептики, інтенсивного масопереносу та

врахування в конструкції зрізових зусиль. Оскільки, ферментери з введенням енергії газовою фазою придатні для культивування бактерій та дріжджів, то вони є оптимальними для культивування дріжджів *S. cerevisiae*.

Процес перемішування забезпечує оптимальний контакт сахароміцетів із компонентами поживного середовища, а регулювання температури й вмісту поживних речовин підтримує необхідну швидкість зброджування. Пропелерні мішалки створюють осьові потоки рідини, що істотно підвищує інтенсивність перемішування. Число оборотів пропелерних мішалок значно вище, ніж у мішалок інших типів, і досягає в деяких випадках 40 оборотів в секунду. Оскільки під час біосинтезу сахароміцети осідають на дно ферментеру (через відносно велику вагу клітин), то доцільним є використання пропелерних мішалок, які створюють осьову циркуляцію культуральної рідини за рахунок насосного ефекту в ферментері, тому вони легко піднімають клітини дріжджів з його дна [132].

4.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Річне споживання світлих нафтопродуктів в Україні становить приблизно 9 млн т. З них на бензин припадає близько 4,5-5 млн т. Постійне зростання цін на нафту призводить до подорожчання всіх марок бензину, особливо високооктанових. Так, виробники стали застосовувати різні октанозбільшуючі добавки з метою отримання високооктанових марок бензину на основі дешевих стабільних газоконденсатних бензинів. Серед таких добавок є етанолвмісні, які виробляються з поновлюваної енергетичної сировини [133]. Під час змішування етанолу з бензином паливна суміш насичується киснем, тому краще горить та кількість викидів в атмосферу зменшується.

Тому, біоетанол є зневодненим етиловим спиртом, який використовується як замітник бензину для автотранспортних засобів. А також є високооктановим паливом, який замінив свинець як підсилювач октану в бензині [134]. В нашому випадку – біоетанол виробляється мікробіологічним шляхом за допомогою сахароміцетів.

Сухі речовини культуральної рідини представлені незбродженими цукрами, декстринами, клітковиною, амінокислотами та іншими азотистими речовинами, мінеральними солями. Сухі речовини в значній мірі знаходяться в розчиненому вигляді, а частково у вигляді суспендованих твердих частинок (дріжджові клітини, дробина, клітковина, гіпс, фосфорнокислий кальцій, карамелі, меланоїдіни і т.д.).

Задля того, щоб етанол можна було використовувався в якості палива, тверді частинки-компоненти культуральної рідини, дріжджі, летючі домішки і велика частина води повинні бути видалені [134, 135]. Тому, доцільно є отримання біоетанолу за допомогою дріжджів-сахароміцетів багатостадійним процесом. Основні етапи виділення та очищення біоетанолу представлені на рис. 4.1.

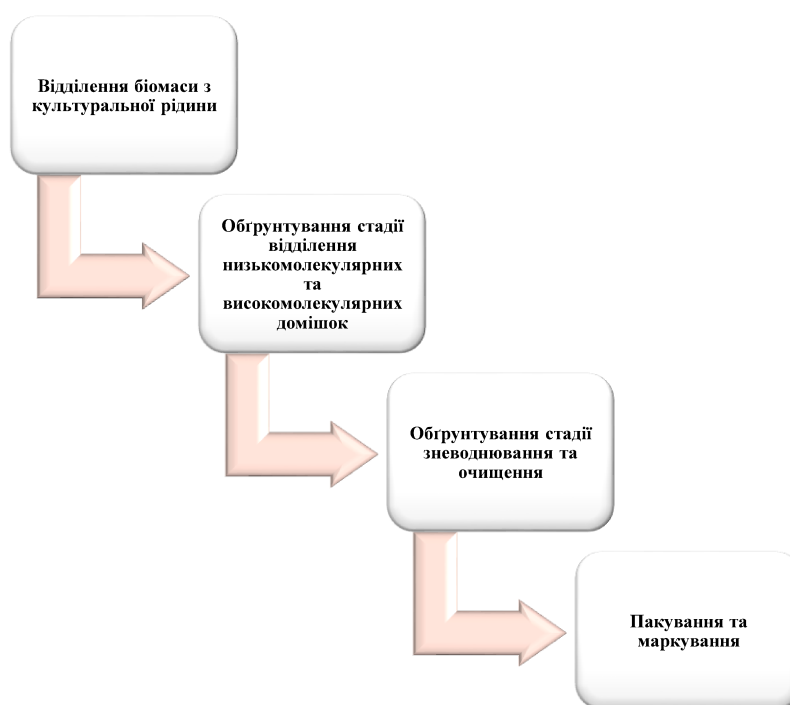


Рис. 4.1. Основні етапи виділення та очищення біоетанолу

4.3.1. Обґрунтування стадії відділення біомаси

Оскільки біоетанол виділяється дріжджами в культуральну рідину та є позаклітинним продуктом біосинтезу, то першим етапом його отримання є відділення клітин сахароміцета *S. cerevisiae* 36aS1.10.4. В результаті чого отримують супернатант без дріжджових клітин та біомасу. Враховуючи, що

цільовий продукт є позаклітинним – в подальшому для виділення та очищення біоетанолу доцільно використовувати супернатант, в якому і міститься цільовий продукт. Також в подальшому задля утилізації відходів та отримання прибутку доцільно використовувати отриману біомасу дріжджів та інші відходи виробництва для отримання біогазу [136].

Так, існують такі методи виділення біомаси від культуральної рідини, як: центрифугування, фільтрація, флотація та сепарація.

Флотацією називають процес відділення клітин мікроорганізмів з культуральної рідини за рахунок адгезії (прилипання) мікроорганізмів до пухирців повітря, що підіймаються в рідині і потім збирання піни і її конденсації (коалесценції). Звичайно, що чим менше пухирці, тим повільніше вони підіймаються і тим більшим є час перебування їх в рідині та імовірність захоплення клітин мікроорганізмів [137].

Фільтрація – пропускання суспензії через фільтруючий матеріал, під дією різниці тисків рідина проходить через пори і збирається у вигляді фільтрату, а тверді частинки – біомаса, на фільтруючій мембрані [138].

Під центрифугуванням розуміють процес поділу неоднорідних систем, суспензій і емульсій, в поле відцентрових сил з використанням суцільних або проникних для рідини перегородок [137].

Сепарація являє собою процес розділення твердої фази та рідкої, оснований на відділенні часточок з різними характеристиками за допомогою відцентрових сил [138].

З метою зменшення втрат та покращення процесу виділення та очищення біоетанолу є доцільним аналіз переваг та недоліків існуючих методів відділення біомаси. Тому, для подальшого аналізу у табл. 4.3.1 наведено порівняння наведених вище методів відділення біомаси.

Таблиця 4.3.1

Переваги та недоліки методів відділення біомаси

Метод	Переваги	Недоліки	Література
Сепарація	<ul style="list-style-type: none"> - можна виділяти частки від 0,01 мкм та стійкі суміші; - висока швидкість оброблення важкофільтруємих суспензій; - малі втрати в ході процесу; - проходження процесу без змін цільового продукту; - в основному використовують для концентрування дріжджів; - є діапазон швидкості проходження процесу 	<ul style="list-style-type: none"> - підвищена енергоємність процесу; - висока вартість 	[141, 142]
Фільтрація	<ul style="list-style-type: none"> - для частинок розміром від 10 мкм до 1 мм; - цільовий продукт не підлягає тепловим і хімічним впливам; - володіє простотою проходження процесу; - є можливість зміни матеріалу фільтру в залежності від характеристики суміші 	<ul style="list-style-type: none"> - втрата біомаси під час процесу; - потреба в регулярній заміні фільтруючого матеріалу; - ризик виникнення контамінації в ході заміни фільтру; - зниження швидкості процесу через постійне забивання пор фільтру; - неможливість механізації через вивантаження осаду руками 	[139-141]
Центрифугування	<ul style="list-style-type: none"> - високий ступінь розділення високодисперсних систем; - можливість автоматизації процесу; - низька вологість осаду після зневоднення; - економічність процесу; - прості в обслуговуванні 	<ul style="list-style-type: none"> - вимагає дорогого устаткування; - проблеми з герметизацією; - має складну конструкцію; - в процесі утворює шумове забруднення; - в ході процесу підвищується температура; - має високу вартість обладнання 	[139-142]
Флотація	<ul style="list-style-type: none"> - економічність процесу та висока продуктивність; - можливість організації безперервного процесу; - діапазон частинок, що флотуються від 1 до 200 мкм; - найчастіше використовують для концентрування дріжджів та грибів 	<ul style="list-style-type: none"> - великі втрати біомаси в ході процесу; - має малу ступінь очищення; - процес зменшується при наявності жирних кислот 	[139-141]

Враховуючи всі переваги та недоліки методів відділення біомаси перераховані в табл. 4.3.1, найдоцільнішим буде використати сепарацію. Оскільки, в ході порівняння з іншими методами було виявлено, що цей метод: швидкий, що дозволяє економити у часі; не впливає на цільовий продукт, що дозволяє зберегти властивості біоетанолу та саму біомасу; має невеликі втрати в ході процесу, що збільшує прибуток; не потребує додаткового повторення процесу через те, що утворює осад низької вологості; та в основному і використовується для концентрування дріжджів, враховуючи, що вони і є продуцентом.

4.3.2. Обґрунтування стадії відділення низькомолекулярних та високомолекулярних домішок

Отриманий на попередній стадії супернатант є багатокомпонентною системою, що складається з води (82-90%), сухих речовин (4-13%) та етилового спирту з супутніми летючими домішками (5-9%). Сухі речовини представлені незбродженими цукрами, декстринами, клітковиною, амінокислотами та іншими азотистими речовинами, мінеральними солями.

Сухі речовини в значній мірі знаходяться в розчиненому вигляді, а частково – у вигляді суспендованих твердих частинок. Такий супернатант містить більше 70 супутніх спирту різних летких речовин (домішок). Кількість таких домішок невелика, зазвичай не більше 1,0% від кількості етилового спирту, але іноді досягає 1,5%, в основному за рахунок метанолу. Всі летючі домішки по хімічній природі можна розділити на чотири групи: спирти (крім етилового), альдегіди, кислоти і складні ефіри. Крім того, виділяють групу азотистих речовин (аміак, аміни, амінокислоти), та сірковмісних речовин (сірководень, сірчистий ангідрид, сульфокислоти, меркаптани) та ін. Дані домішки в основному утворюються в процесі бродіння. Найбільше домішок (0,4-0,6% від кількості етилового спирту) припадає на частку спиртів, що складають основу сивушного масла. До змісту основних його компонентів входить ізоаміловий (60-90%), ізобутиловий (8-27%), пропіловий (3-20%) спирти [135].

Для розділення складних однорідних рідких сумішей на індивідуальні компоненти або окремі збагачені фракції широкого поширення набули процеси дистиляції і ректифікації.

Дистиляцією називають процес розділення рідкої однорідної суміші на окремі фракції шляхом часткового випаровування рідини і конденсації пари, що при цьому утворилася. У результаті проведення процесу випаровування і конденсації пари одержують збагачену легкокиплячим компонентом рідину – дистилят і збагачену висококиплячим компонентом частину рідкої суміші, що не випарувалася – кубовий залишок.

Ректифікацією називають процес розділення рідких сумішей на практично чисті компоненти шляхом застосування методу багаторазової (багатоступінчастої) протитечійної дистиляції, проведеної в ректифікаційній колоні [143].

Задля більш детального аналізу методів розділення рідких сумішей у табл. 4.3.2 наведено перелік переваг та недоліків дистиляції та ректифікації.

Таблиця 4.3.2

Переваги та недоліки методів розділення рідких сумішей

Метод	Переваги	Недоліки	Література
Дистиляція	<ul style="list-style-type: none"> • нагрівання системи та збирання дистиляту автоматичні; • простий процес 	<ul style="list-style-type: none"> • використовують для попереднього розділення; • відносно грубий метод розділення; • не дозволяє отримати чисті речовини • багаторазова дистиляція є енергетично не вигідною 	[143, 144]
Ректифікація	<ul style="list-style-type: none"> • є більш поширеним методом розділення; • дозволяє одержувати практично чисті речовини високого ступеня чистоти; • розділяє рідкі суміші ізотропного складу; • гарантує високу чистоту продукту 	<ul style="list-style-type: none"> • дороге обладнання; • тривалий час впливу високих температур на продукт 	[143, 144]

Враховуючи, дані наведені в табл. 4.3.2, в даному випадку доцільно буде не обирати один, а використати два вищенаведених метода, в такій послідовності, як: дистиляція, а потім ректифікація. Оскільки дистиляція використовується для попереднього грубого очищення бражки, а для більш кращого її очищення є потреба у багаторазовому повторенні процесу, яка є економічно не вигідною та потребує багато часу, то даний метод буде використовуватись для відгіну суміші біоетанолу і води з супернатанту. Тому, отриманий на попередній стадії розчин підлягає подальшому очищенню, де спирт максимально повинен звільнитись від води та інших домішок за допомогою ректифікації, де склад пари наближається до азеотропної точки.

4.3.3. Обґрунтування стадії зневоднювання та очищення

Одержання біоетанолу, який використовують як добавку до бензину вимагає додаткового зневоднення продукту, оскільки внаслідок присутності 4 % води в дистиляті відбуватиметься розшарування спирто-бензинової суміші. Також, згідно з вимогами, біоетанол, який можна використовувати в якості добавки до бензину повинен містити не більше 0,2 % води, оскільки з підвищенням вмісту води у суміші бензину та біоетанолу підвищується ризик псування автомобільного двигуна. Враховуючи, що вода з етанолом утворюють азеотроп (суміш рідин, склад яких не змінюється при кипінні), то це обмежує можливість повного зневоднення етанолу за допомогою дистиляції та ректифікації, процес яких проходить з підвищенням температури до температури кипіння. Тому, є доцільним використання установок дегідратації для отримання безводного етанолу. Так, воду можна видаляти за допомогою молекулярних сит, дифузійного випарювання через мембрану або азеотропну перегонку з розділяючими агентами.

Суть технології молекулярних сит полягає у тому, що перегріта суміш пари етанолу і води проходить через шар цеоліту, тобто пористого матеріалу з дуже точно витриманим розміром пор. Цеоліт має пори діаметром близько 0,3 нм. У порах такого розміру затримується молекула води (0,28 нм), але не

вміщує молекулу етанолу (0,44 нм). Молекули води трохи менше розміру пор і в силу своєї високої полярності затримуються в порах електростатичними силами. У той же час більші молекули етанолу проходять крізь молекулярні сита, не затримуючись. Процес зневоднення на молекулярних ситах відбувається таким чином: парова фаза (що складається з води та етанолу) надходить в міжтрубний простір апарата зневоднення; водяна пара (молекули якої менше пір селективної мембрани) проходить крізь керамічну трубку з цеолітовим напленням і захоплюється вакуумним насосом, а пара етанолу (молекули якого більше, ніж пори сита) виходить з апарата і прямує до конденсатора зневодненого етанолу. Рушійною силою проникнення в цьому разі є різниця тисків у трубному (створюється вакуумним насосом) і міжтрубному просторі (створюється грійною парою випарного апарату і конденсатором зневодненого етанолу).

Дифузійне випарювання є альтернативним методом осушування, у якому застосовуються гідрофільні мембрани. З одного боку мембрани створюється вакуум. У силу розходження дифузійного опору й парціального тиску етанолу і води відбувається розділення цих речовин на мембрані. Вода проходить крізь неї, а зневоднений етанол залишається.

Азеотропна перегонка полягає у тому, що у суміш спирту й води додається розділяючий агент, що утворює азеотроп з етанолом або водою. Потім у регенераційній колоні цей азеотроп розділяється на розділяючий агент і компонент вихідної суміші [136, 145].

З метою удосконалення процесу отримання біоетанолу, який можна було б використовувати як добавку до бензину для автомобільного транспорту є доцільним аналіз існуючих методів зневоднення етанолу, переваги та недоліки яких наведено у табл. 4.3.3.

Переваги та недоліки методів зневоднення біоетанолу

Метод	Переваги	Недоліки	Література
Молекулярних сит	<ul style="list-style-type: none"> - найбільш розповсюджена та найсучасніша технологія; - низькоенергетичний метод; - володіє найменшими експлуатаційними витратами; - має високу термостабільність, що дозволяє вести процес в паровій фазі; - низька собівартість молекулярних сит; - простота обслуговування 	<ul style="list-style-type: none"> - необхідність періодичної високотемпературної регенерації; - обов'язкове вакуумування апаратів 	[136, 145, 146]
Дифузійне випарювання	- устаткування має високу селективність, надійність і довговічність	<ul style="list-style-type: none"> - вимагає більш ретельної підготовки вихідного спирту-сирцю; - мембрани потребують регенерації 	[136, 145]
Азеотропна перегонка	- відносно низька температура кипіння азеотропної суміші	<ul style="list-style-type: none"> - вважається застарілою технологією - результат досягається не за один цикл; - великі експлуатаційні витрати; - потреба у випаровуванні доданого розділюючого компонента; - складність у підборі розділюючого компонента; - велика втрата тепла - складне оформлення процесу 	[136, 145, 146]

Беручи до уваги усі переваги та недоліки методів зневоднення біоетанолу, які були наведені в табл. 4.3.3, доцільніше буде використовувати метод молекулярних сит, який є найсучаснішим, низькоенергетичним та має

найменші експлуатаційні витрати, порівняно з дифузійним випарюванням та азеотропною перегонкою.

4.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску біоетанолу

Для транспортування біоетанолу застосовують сталеві бочки, спеціалізовані контейнери-цистерни без нижнього зливу або імпорتنі контейнери-цистерни, сталеві авто- і залізничні цистерни, каністри та інші ємності, виготовлені з матеріалів, дозволених для контакту з продуктом даного виду, які повинні бути опечатані або опломбовані. Упаковка і закупорювання тари з біоетанолом повинні забезпечувати його збереження.

Рівень заповнення цистерн і бочок розраховують з урахуванням повного використання їх місткості (вантажопідйомності) і об'ємного розширення продукту при можливому перепаді температур на шляху прямування, але не більше 95%.

Цистерни та резервуари з біоетанолом повинні герметично закриватися кришками, мати воздушники, обладнані запобіжними клапанами. Для встановлення рівня спирту застосовують поплавкові або інші безпечні покажчики рівня [147].

Технологічне обладнання, резервуари, трубопроводи та зливо-наливні пристрої, пов'язані з прийомом, зберіганням і транспортуванням біоетанолу, повинні бути захищені від статичної електрики.

Враховуючи, що в подальшому отриманий біоетанол буде змішуватись з бензином, для зручності доцільніше використати для пакування сталеві бочки об'ємом 50 л.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання отримання біоетанолу за допомогою дріжджів *S. cerevisiae* 36aS1.10.4

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Д-1	Об'ємний дозатор	1	Діапазон регулювання дози: від 1 мл до 5 л. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304/ AISI 316. Виробник: ТОВ МНПК «Станко-Груп» [1].
Д-2	Ваговий дозатор	1	Модель: ДВ-1. Діапазон зважування: 0,02 - 2 кг. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: «ТехПромПак» [2].
Д-3, Д-4	Ваговий дозатор	2	Модель: БДС-2. Максимальна маса: 650 кг. Насипна щільність: 0,20-0,80 т/м. куб. Виробник: Старокостянтинівський завод ковальсько-пресового обладнання [3].
Д-5, Д-6	Ваговий дозатор	2	Модель: FlexW15S. Діапазон зважування: 0,1-30 кг. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304/ AISI 316. Виробник: ООО «ФЛЕКСМАШ» [4].
Д-7	Ваговий дозатор	1	Модель: СБ-30. Діапазон зважування: до 100 кг. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304/ AISI 316. Виробник: «Ваговимірювальні системи» [5].
Р-8	Реактор-змішувач для приготування розчину хлороводню	1	Модель: ЕМК Р-20. Об'єм 20 л. Розміри: довжина – 440 мм, ширина – 335 мм. Кількість обертів мішалки: 40 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304/ AISI 316. Виробник: «АВРОРА ПАК ИНЖИНИРИНГ» [6].

НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		<i>Потапенко В.В.</i>		
Перевір.		<i>Скроцька О.І.</i>		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>		
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літ.	Арк.
				66
			Кафедра БТМ	
				5

P-9	Реактор-змішувач для приготування розчину гідроксиду натрію	1	Модель: BIOSTAT® Cplus. Об'єм 20 л. Розміри: 1900 x 1020 x 750 мм. Кількість обертів мішалки: 20–1000 об/хв. Наявна сорочка обігріву. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304/ AISI 316. Виробник: «Фенікс-СД» [7].
P-10, P-11, P-12	Реактор-змішувач	3	Модель: АИМ132 S4. Об'єм 6,3 м ³ . Розміри: 4960 x 2330 x 1800 мм. Кількість обертів мішалки: 50 об/хв. Наявна сорочка обігріву. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304/ AISI 316. Виробник: Фастовкий завод Химического Машиностроения «Красный Октябрь» [8].
Ін-13	Інокулятор	1	Модель: тип-Р. Об'єм 100 л. Розміри: 1600 x 870 x 200 мм. Кількість обертів мішалки: максимальна 750 об/хв. Наявна сорочка обігріву. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304/ AISI 316. Виробник: «Био-Рус» [9].
Ін-14	Інокулятор	1	Об'єм 1 м ³ . Розміри: 4960 x 2330 x 1800 мм. Кількість обертів мішалки: 10-150 об/хв. Наявна сорочка обігріву. Матеріал: нержавіюча сталь 304L/ 316L. Виробник: «БИОТЕХНО» [10].
Фр-15	Ферментер	1	Об'єм 10 м ³ . Розміри: 2200 x 7297 x 2750 мм. Кількість обертів мішалки: 50-300 об/хв. Наявна сорочка обігріву. Матеріал: нержавіюча сталь 304L/ 316L. Виробник: «БИОТЕХНО» [11].
ЗП-16	Засівний пристрій	1	Об'єм 5 л. Матеріал: нержавіюча сталь.
Ф-17, Ф-18, Ф-19, Ф-20	Фільтр	4	Модель: Sartorius® GA. Глибинні картриджі для стерилізуючої фільтрації повітря і газів. Розмір пір: 0,2 мм. Матеріал: гідрофобне скловолокно. Виробник: «Фенікс-СД» [12].
Н-21, Н-22, Н-23	Насос відцентровий	3	Продуктивність: 15-40 л/хв. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Виробник: «Dongyin» [13].

Н-24, Н-25, Н-26, Н-27	Насос відцентровий	4	Модель: Pedrollo 2CPm 25/14A. Продуктивність: до 100 л/хв. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Виробник: «Pedrollo» [14].
ПЗ-28	Повітрозабірник	1	Повітрозабірна шахта SP. Матеріал: нержавіюча сталь. Висота: 3 м. Виробник: «Hidria» [15].
Ф-29	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр типу ФБК-66-300-6-G4. Тип фільтруючого матеріалу: поліеستر, знаходиться в сталій оцинкованій рамці. Виробник: «ЭлВент» [16].
К-30	Компресор	1	Компресор Remeza AirCast модель 500.LT100-11. Продуктивність: 1400 л/хв. Робочий тиск: 10 атм. Виробник: Remeza™ [17].
Т-31	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря ОМІ РА 10. Температура повітря на виході охолоджувача – Т приміщення + 9 °С. Виробник: «Tusk Pneumatic» [18].
Р-32	Ресивер	1	Ресивер повітряний ПЗВ 500-600-11-01. Об'єм: 500 л. Тиск: 11 бар. Габарити: 2125 × 600 мм. Виробник: «Zelko» [19].
Т-33	Теплообмінник-нагрівач	1	Модель: ПНП 211-201-01УХЛЗ (паровий). Виробник: Вентиляторный завод «Укрвентсистемы» [20].
Ф-34	Фільтр тонкої очистки	1	Кишеньковий фільтр F5-F9 тонкої очистки. Матеріал: синтетичні та скляні волокна. Виробник: "ТЕХНО-ГРАД" [21].
Р-35	Реактор	1	Робочий об'єм 6,3 м ³ . Модель: АСЕонв 6,3-2-02. Наявна теплообмінна рубашка. Оснащений якірною мішалкою. Габаритні розміри: 1800×4960×2330 мм. Нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: Фастівський завод хімічного машинобудування «Червоний Жовтень», Україна [22].
С-36	Сепаратор	1	Модель: BRSX-90. Габаритні розміри: 1770×1500×1850 мм. Нержавіюча сталь AISI 316L. Продуктивність: від 4500 до 10000 л/час. Виробник: «Командарм», Росія [23].

36-37	Збірник	1	Робочий об'єм 5 м ³ . Нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: «Промкурс», Росія [24].
ДК-38	Дистиляційна колона	1	Модель: JT600. Нержавіюча сталь AISI 316L. Продуктивність: 10000л/день. Виробник: «JInTA», Китай [25].
36-39	Збірник	1	Робочий об'єм 4 м ³ . Модель: СЕонв 4,0-31-12. Габаритні розміри: 2130×1766×3055 мм. Нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: Фастівський завод хімічного машинобудування «Червоний Жовтень», Україна [26].
РК-40	Ректифікаційна колона	1	Пропускна здатність: 0,8 м ³ /год. Діаметр: 530 мм, висота 12,5 м. Нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: ТОВ НВП «НОУПРОМ», Росія [27].
А-41, А-42	Адсорбер	2	Нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: «АГРОТЕХНОЛОДЖІ», Україна [28].
36-43	Збірник	1	Модель: ВЭЭ 2.3-0,63. Робочий об'єм 0,63 м ³ . Габаритні розміри: 800×1000×1040 мм. Нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: «АрмТехСтрой», Росія [29].
РА-44	Розливний апарат	1	Модель: КСА-40D. Машина призначена для очищення і наповнення кег об'ємом від 15 до 50 літрів. Продуктивність: 40 кег/год. Габарити: 1800×1200×1900 мм. Нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: «Czech brewery system sro», Чеська Республіка [30].
Н-45, Н-46, Н-47, Н-48, Н-49, Н-50	Насос відцентровий	6	Нержавіюча сталь AISI 316L. Продуктивність: 100 л/хв. Виробник: «LEO», Китай [31].
Н-51, Н-52	Насос вакуумний	2	Нержавіюча сталь AISI 316L. Продуктивність: 50 л/хв. Виробник: «TELSTAR», Іспанія [32].
Н-53	Насос відцентровий	1	Нержавіюча сталь AISI 316L. Продуктивність: 37 л/хв. Виробник: «Dongyin», Китай [33].

Зб-54	Збірник	1	Об'єм 1 м ³ . Габаритні розміри: 1000×2400×1200 мм. Нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: «Wise Master», Україна [34].
-------	---------	---	---

Примітка*: 1 – [https://stanco.com.ua/volumetric-piston/?gclid=CjwKCAjwhOD0BRAQEiwAK7JHmJVfsxjEodI5elBuk0uhPzWHQJJo5Y362O0dUgGpBOBDu-B5NmjvboCarQQA_vD_BwE](https://stanco.com.ua/volumetric-piston/?gclid=CjwKCAjwhOD0BRAQEiwAK7JHmJVfsxjEodI5elBuk0uhPzWHQJJo5Y362O0dUgGpBOBDu-B5NmjvboCarQQA_vD_BwE;);

2 – http://www.tehprompak.ru/odnoruchevoj_dozator; 3 – <https://ua.all.biz/bunker-dozator-solomy-bds-2-g15094142#.Xph0iMgzblU/>; 4 – https://flexmash.com/vesovye-dozatory-flexw/?gclid=CjwKCAjwhOD0BRAQEiwAK7JHmCetoWu71f9_w5xFGUMVHIHvmrs40B812Qauxj1y3Yq7zy5ZxU6v3BoCzrIQAvD_BwE;

5 – https://vis.ua/product/bunkernyi-dozator-sypuchikh/?gclid=CjwKCAjwhOD0BRAQEiwAK7JHmOFkmysHZoPH0yOTOAajG8VMADZsOm5b_7WVbIaoPCPYJkhLiJzyWRoCAIoQAvD_BwE; 6 – <https://aurora-pack.ru/catalog/sku/reaktor-s-meshalkoy-i-rubashkoy-podogreva-emb-r-20/>; 7 – <http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D1%83%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B5-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/biostat%2%AE-cplus.html>; 8 – <https://tdredoctober.com/catalog/vertikalnye-mehanicheckie-meshalki/jakornaja-meshalka-v25-63-m3.html>; 9 – [https://biorus.ru/oborudovanie/fermentery-i-bioreaktoryi-\(laboratornyie-i-promyshlennyye\)/promyshlennyye-fermentery-i-bioreaktoryi-\(shvejczariya,-bioengineering\)/promyshlennyye-fermentery-tip-r-ot-100-litrov-do-15-000-litrov.html](https://biorus.ru/oborudovanie/fermentery-i-bioreaktoryi-(laboratornyie-i-promyshlennyye)/promyshlennyye-fermentery-i-bioreaktoryi-(shvejczariya,-bioengineering)/promyshlennyye-fermentery-tip-r-ot-100-litrov-do-15-000-litrov.html); 10 – <https://biotechno.ru/catalog/promyshlennyye-bioreaktory/promyshlennyy-bioreaktor-500-1000-l/>; 11 – <http://diartech.ru/product/plant-bioreactor-1-35tonn/>; 12 – <http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%84%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F-%D0%B2%D0%BE%D0%B7%D0%B4%D1%83%D1%85%D0%B0-%D0%B8-%D0%B3%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D0%B2/sartopure%2%AE-ga.html>; 13 – <https://in-green.com.ua/dongyin/nasos-tsentrobezchnyy-aquatica-dongyin-0-37kvt-h-66-43-m-q-40-25-l-min-66mm-777072>;

14 – https://aquavin.com.ua/catalog/nasosi_dlya_polivu/nasos_vidtsentrovyy_pedrollo_2cpm_25_14a_1_5_kvt_do_100_1_khv/; 15 – <https://www.amp-nw.ru/files/pdf/regulation22.pdf>; 16 – <http://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/gruboy-ochistki/filtr-vozdushnyj-karmannyj-fvk-fyak-gruboy-ochistki-g3-g4-f5-material-poliestr/>;

17 – <https://www.xn--e1ajghcehcha6i.com.ua/%D0%BF%D0%BE%D1%80%D1%88%D0%BD%D0%B5%D0%B2%D1%8B%D0%B5/remeza/>;

18 – <http://tusk.com.ua/index.php?route=common/home>;

19 – https://www.zelko.ua/vozduhopodgotovka/resivery?gclid=Cj0KCQjwwr32BRD4ARIsAAJNf_1dcVu4awGomyKdHnse_B8UZvwKU-IFHvv3r0vz-0zjQmOFbES4Dj0aAurLEALw_wcB;

20 – <https://ukrvent.com/vozduhonagrevatel-parovoj-vnp-211-01/>; 21 – http://tehnograd.kiev.ua/ru/filtri_dlja_sistem_ventiljacii/karmannie_filtri.html; 22 – <https://tdredoctober.com/catalog/vertikalnye-mehanicheckie-meshalki/jakornaja-meshalka-v25-63-m3.html>; 23 – <http://www.komandarm-nsk.ru/catalog/separator-dlya-piva-brsx/>; 24 – <https://promkurs.ru/reactors/>; 25 – <https://russian.alibaba.com/product-detail/fractional-distillation-column-industrial-distillation-column-60599494978.html?spm=a2700.8699010.29.27.3cfb7af15HQ1J1>; 26 – <https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-jemalirovannye/sborniki-celnosvarnyie-v40-63-m3.html>; 27 – <http://nouprom-npz.ru/katalog-produktsii/rektifikatsionnye-kolonny/>; 28 – <https://agrotechnology.com.ua/wp-content/uploads/2017/12/prezentatsiya-ADSORBTSIYA.pdf>; 29 – https://armtehsroy.ru/emkostnoe/emkostnoe_1_4; 30 – <https://in-green.com.ua/dongyin/nasos-tsentrobezchnyy-aquatica-dongyin-0-37kvt-h-66-43-m-q-40-25-l-min-66mm-777072>;

31 – <https://rt.co.ua/katalog/otoplenie-i-vodosnabzhenie/nasosnoe-oborudovanie/nasosy-poverhnostnye/centrobezchnyye-mnogostupenchatye/nasos-centrobezchnyy-mnogostupenchatyy-vertikalnyy-380-v-2-2-kvt-hmax-98-m-qmax-100-l-min-leo-3-0-7754573/>;

32 – <https://bytzapchast.com.ua/p91458037-vakuumnyj-nasos-telstar.html>; 33 – <https://in-green.com.ua/dongyin/nasos-tsentrobezchnyy-aquatica-dongyin-0-37kvt-h-66-43-m-q-40-25-l-min-66mm-777072>; 34 – <https://wise-master.com.ua/p1001183919-reaktor-aisi-304.html>.

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка розчинів титрувальних агентів

ДР 1.1 Приготування розчину HCl

Для приготування 6%-го розчину HCl через об'ємно-ваговий дозатор (Д-1) у збірник (Р-8) об'ємом 20 л вносять 37%-ний розчин хлороводню у кількості 1387 мл та питну воду у кількості 8613 мл. Отриманий розчин (10 л) перемішують в реакторі-змішувачі за допомогою мішалки. Кількість отриманого титрувального агенту в подальшому використовується з розрахунку 2 мл розчину на 1 л поживного середовища (до ТП 6.1; ТП 6.2). За допомогою насоса (Н-21) розчин подається у ферментер (Фр-15).

ДР 1.2 Приготування та стерилізація розчину NaOH

Для приготування 6%-го розчину NaOH через об'ємно-ваговий дозатор (Д-2) у збірник (Р-9) об'ємом 20 л вносять кристалічний порошок NaOH у кількості 600 г та питну воду у кількості 9,4 л. Кількість титрувального розчину в подальшому використовується з розрахунку 2 мл розчину на 1 л поживного середовища. Розчин (10 л) перемішують в реакторі-змішувачі (Р-9) за допомогою мішалки до повного розчинення, після чого стерилізують при температурі 131°C упродовж 40 хв та надлишковим тиском 1,5 атм (до ТП 6.1; ТП 6.2). За допомогою насоса (Н-22) розчин подається у ферментер (Фр-15).

ДР 2. Підготовка лігноцелюлозної сировини

ДР 2.1. Вимочування соломи у воді

Розрізані куски соломи (по 6-10 см) через об'ємно-вагові дозатори (Д-3, Д-4) у кількості по 450 кг висипіють у два реактора (Р-10, Р-11) об'ємами по 6,3 м³ та заливають водою. Вимочування соломи у воді проходить при 80 °С протягом 5-10 хвилин. Після чого воду зливають.

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Потапенко В.В.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Скряцька О.І.					71	11
Реценз.						Кафедра БТМ 70		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

ДР 2.2. Обробка парою

У реакторах (P-10, P-11) шляхом подачі пари солому обробляють при 195 °С протягом 12 хвилин. Попередня обробка проводиться при співвідношенні води і соломи 5: 1, попередньо оброблені волокна соломи спресовуються до високого кінцевого вмісту сухої речовини – в даному випадку 44%. Після чого, за необхідності, солому збирають в пластикові пакети, що містять 30-50 кг матеріалу, і зберігають при 4 °С до використання.

ДР 2.3. Гідроліз соломи

У реакторах (P-10, P-11) оброблену солому доводять до 30% сухої речовини (СР) шляхом додавання необхідної кількості води. За допомогою додавання Na₂CO₃ підтримують рН на рівні від 4,8 до 5,0. Розчин соломи нагрівають до 50 °С і додають ферментну суміш Celluclast 1,5 FG L і Novozym 188 у кількості 5 г/1 г СР (5:1). Розчин соломи гідролізують протягом 96 годин зі швидкістю перемішування 6,6 об/хв і температуру підтримують на рівні 50 °С. За необхідності, гідролізований розчин соломи можна зберігати при температурі -21 °С невеликими порціями до використання для ферментації (до ДР 4.4.1). Отримані розчини за допомогою насосів (H-24, H-25) подають до реактора змішувача (P-12).

ДР 3. Підготовка аераційного повітря

ДР 3.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою повітрязабірника (ПЗ-28), який знаходиться на висоті 3 м, тобто там, де концентрація мікроорганізмів та пилових часток є мінімальною.

ДР 3.2. Очищення повітря на фільтрі грубої очистки

Попередню очистку повітря здійснюють за допомогою фільтра (Ф-29), який очищує повітря від великих механічних часток (5–10 мкм), пилу. При цьому ступінь очищення сягає – 85%.

ДР 3.3. Стиснення (компреміювання) повітря

Стискання повітря проходить у компресорі до 0,35 МПа (К-30). В результаті чого підвищується температура повітря до 120-250 °С та збільшується його вологість.

ДР 3.4. Охолодження та видалення вологи з повітря

Охолодження повітря до температури 25 °С проходить в теплообміннику (Т-31) з метою відведення вологи, яка в надлишку. З метою відділення зайвої вологи ($W = 65 \%$) та згладжування пульсацій повітря далі подають на ресивер (Р-).

ДР 3.5. Нагрівання повітря

Теплообмінник (Т-33) використовують для підігріву (50 °С) охолодженого повітря та подальшого відведення надлишкової вологи ($W = 50 \%$). Процедуру проводять для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів.

ДР 3.6. Очищення повітря на фільтрі тонкого очищення

З метою видалення часток розмірами менше 5 мкм очищення повітря здійснюють на фільтри для тонкого очищення (Ф-34) ($E = 95\%$).

ДР 3.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Ферментер та інокулятор оснащують фільтрами (Ф-17; Ф-18; Ф-19; Ф-20), які здатні уловити частинки розміром 0,04-0,06 мкм ($E = 99,99\%$) (до ТП 5.5; ТП 5.6; ТП 6.1).

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 4,7 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 4700 мл середовища наведено в табл. 6.1.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу в колбах на качалках**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість компонента у 4,7 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл (г)
Пептон	20	94	А	376
Дріжджовий екстракт	10	47		
Ксилоза	50	235		
Вода		4324		4324
Разом		4700		4700

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

Перед початком роботи технічні ваги відтаровують, після чого зважують 94 г пептона, 47 г дріжджового екстракту, 235 г ксилози. Отримані наважки поміщають у колбу об'ємом 10 л, додають 4324 мл води. Після чого добре перемішують та розливають по 1,6 л у три колби об'ємом 5 л, закривають колби ватно-марлевими пробками. Стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв та тиску 0,05 МПа (до ТП 5.4).

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 47,4 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 47,4 л середовища наведено в табл. 6.2.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість компонента у 47,4 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, л (г)
Пептон	20	948	А	47,3
Дріжджовий екстракт	10	474		
Ксилоза	50	2370		
Вода		43500		
Конденсат		108		0,1
Разом		47400		47,4

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-5) наважки: 948 г пептона та 474 г дріжджового екстракту, 2370 г ксилози переносять у інокулятор (Ін-13) об'ємом 100 л, додають 43,5 л води, вмикають мішалку, перемішують. Після чого подають гостру пару в сорочку апарата для стерилізації поживного середовища при температурі 112°C упродовж 30 хв та тиску 0,05 МПа (до ТП 5.5).

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 468,7 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 468,7 л середовища наведено в табл. 6.3.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість компонента у 468,7 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Пептон	20	9374	А	467,5
Дріжджовий екстракт	10	4687		
Ксилоза	50	23435		
Вода		430000		
Конденсат		1204		1,2
Разом		468700		468,7

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-6) наважки: 9374 г пептона, 4687 г дріжджового екстракту, 23435 г ксилози переносять у інокулятор (Ін-14) об'ємом 1 м³, додають 430 л води, вмикають мішалку та перемішують. Потім подають гостру пару в сорочку апарата для стерилізації поживного середовища при температурі 112°C упродовж 30 хв та тиску 0,05 МПа (до ТП 5.6).

4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м³

Для біосинтезу сахароміцетів необхідно приготувати 4640,4 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 4640,4 л поживного середовища наведено в табл. 6.4.

Склад композицій для стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м³

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість компонента у 4640,4 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Пептон	20	92808	А	4639,2
Дріжджовий екстракт	10	46404		
Гідролізат соломи пшениці	100	4500000		
Конденсат		1188		1,2
Разом		4640400		4640,4

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-7) наважки: 92808 г пептона, 46404 г дріжджового екстракту, переносять у реактор-змішувач (Р-12) об'ємом 6,3 м³, також за допомогою насосів (Н-24, Н-25) додають готовий розчин гідролізату соломи пшениці об'ємом 4500 л з реакторів (Р-10, Р-11), вмикають мішалку та перемішують. Після чого за допомогою насоса (Н-27) подають суміш у ферментер (Фр-15) об'ємом 10 м³. Потім подають гостру пару в сорочку апарата для стерилізації поживного середовища при температурі 112°C упродовж 30 хв та тиску 0,05 МПа (до ТП 6.1).

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *S. cerevisiae* 36aS1.10.4 зберігають у пробірках зі скошеним агаризованим середовищем YPD при температурі 4–5°C. Пересіви доцільно здійснювати кожні 3 місяці.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Культуру *S. cerevisiae* 36aS1.10.4, що зберігається у пробірках зі скошеним YPD, розсівають до ізольованих колоній на чашки Петрі із середовищем YPD та вирощують при температурі 30°C упродовж 24 годин.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отриманні ізольовані колонії сахароміцетів пересівають петлею в пробірки зі скошеним YPD. В пробірки пересівають ізольовані колонії *S. cerevisiae* 36aS1.10.4, які знаходяться на відстані не менше 1 см. Після чого культуру інкубують впродовж 12 год при температурі 30°C.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалці

В строго асептичних умовах простерилізоване поживне середовище з трьох колб (*від ДР 4.1.1*) перемішують і розливають приблизно по 147 мл в тридцять дві стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл. З метою отримання посівного матеріалу у колби вносять «змив» культури сахароміцетів. Тому у пробірку з робочою культурою *S. cerevisiae* 36aS1.10.4, вирощену раніше на скошеному середовищі YPD, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини шляхом їх змиву піпеткою, відбираючи у процесі одержану суспензію і вносять у тридцять дві колби з вже попередньо розлитим поживним середовищем. Після чого інкубують культуру дріжджів на качалці 24 години. Далі в асептичних умовах отриманий посівний матеріал з колб переносять у стерильний балон (*ЗП-16*) об'ємом 5 л.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

В асептичних умовах з метою вирощування рідкого посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л з вже простерилізованим поживним середовищем подають посівний матеріал з засівного пристроя із посівним матеріалом об'ємом 5 л (*ЗП-16*) у інокулятор. Далі процес вирощування інокуляту проводять при температурі 30 °C упродовж 8 год. В ході процесу культивування дріжджів в інокуляторі проводять відбір проби з періодичністю в 4 год, тобто 2 рази за час культивування з метою проведення подальшого контролю.

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³

З метою вирощування рідкого посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³ (*Ін-14*) з простерилізованим поживним середовищем за допомогою насоса (*Н-23*) з інокулятора об'ємом 100 л (*Ін-13*) передають посівний матеріал. Далі

процес вирощування інокуляту проводять при температурі 30 °С упродовж 8 год. Під час культивування сахароміцетів в інокуляторі проводять відбір проби з періодичністю в 4 год, а саме – 2 рази за час культивування з метою проведення подальшого контролю (до ТП 6.1).

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 10 м³ (I стадія)

У виробничий ферментер (Фр-15), який містить вже простерилізоване поживне середовище за допомогою насоса (Н-26) подається посівний матеріал з інокулятора (Ін-14) об'ємом 1 м³. Після чого з метою перемішування включають мішалку на 5 хвилин. Потім встановлюють постійну температуру на 30°С. Оскільки для отримання цільового продукту (біоетанол), яке здійснюється в анаеробних умовах є доцільним нарощування біомаси сахароміцетів, яке, в свою чергу, проходить в аеробних умовах. Тому, перші 12 годин процесу культивування проходить нарощування біомаси дріжджів. Включають мішалку та барботер. Один раз під час культивування відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та визначення біомаси. Перед взяттям проби вмикають мішалку на 5 хвилин.

ТП 6.2. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 10 м³ (II стадія)

В результаті закінчення 12-ти годин I-ї стадії культивування, на якій накопичувалась біомаса сахароміцетів, створюють анаеробні умови шляхом вимкнення барботеру та подальшого продування ферментеру СО₂. Після чого починається II стадія біосинтезу – спиртове бродіння та виділення біоетанолу в культуральну рідину. Культивування проводять ще 34 години, тобто в загальному культивування проводять 46 годин. Кожні 15 год (ще 2 рази за процес біосинтезу) відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, визначення рівня біомаси сахароміцетів та концентрації біоетанолу. Отримана культуральна рідина за допомогою насоса (Н-45) подається у збірник культуральної рідини (Р-35). Після чого культуральна рідина йде на сепарування (до ТП 7.1).

ТП 7. Відділення біомаси

ТП 7.1. Сепарування культуральної рідини

Культуральну рідину об'ємом 4594 л, що отримана в процесі біосинтезу (від ТП 6.2) *S. cerevisiae* 36aS1.10.4, з реактора об'ємом 6,3 м³ (P-35) за допомогою насоса (H-46) подають у ємність сепаратора (C-36). Потім встановлюють кількість обертів – 3000 об/хв та сепарують для відокремлення біомаси. Після чого отриманий супернатант подають за допомогою насоса (H-47) у збірник об'ємом 5 м³ (Зб-37).

ТП 8. Відділення високомолекулярних домішок

ТП 8.1. Дистиляція

Супернатант (Зб-37), звільнений від біомаси сахароміцетів подається за допомогою насоса (H-48) у дистиляційну колону (ДК-38) далі для відокремлення грубих домішок. Для процесу дистиляції встановлюють температуру 90 °С та тиск 0,2 МПа. Після чого отриману суміш біоетанолу і води подають за допомогою насоса (H-49) у збірник об'ємом 4 м³ (Зб-39).

ТП 9. Відділення низькомолекулярних домішок

ТП 9.1 Ректифікація

Отримана на попередній стадії суміш біоетанолу і води подається далі на очищення від домішок і води за допомогою насоса (H-50) у ректифікаційну колону (РК-40). Для процесу ректифікації встановлюють температуру 90 °С та тиск 0,2 МПа.

ТП 10. Зневоднення біоетанолу

ТП 10.1. Пропускання через молекулярні сита

Отриманий на попередній стадії пар за допомогою насоса (H-51) подається далі на установки дегідратації (A-41; A-42) для звільнення від залишкової води. Так, спочатку парову суміш за допомогою насоса (H-51) подають до адсорберу (A-41). В адсорбері (A-41) встановлюють температуру 90 °С та тиск 0,2 МПа. Після насичення адсорбенту водою, потік перегрітої пари перемикають на другий адсорбер (A-42), де процес дегідратації протікає аналогічним чином. Перший адсорбер (A-41) в цей час ставиться на регенерацію – відновлення водовбирної здатності адсорбенту. Цей процес

проводять шляхом пропускання через нього знизу вгору частини (30%) зневодненого пара, що виходить з іншого адсорбера (А-41). Зневоднений пар витісняє воду з адсорбенту і разом з її парами виходить з верхньої частини адсорбера, що знаходиться в режимі регенерації.

Якщо в режимі сорбції адсорбер знаходиться під підвищеним тиском, то в режимі регенерації – під вакуумом. Перемикання адсорберів з режиму на режим проводиться кожні 15 хвилин системою клапанів, керованих за заданою програмою. Після закінчення процесу біетанол у вигляді пару подається за допомогою насоса (Н-52) у збірник об'ємом 0,63 м³ (Зб-43), де конденсується та перетворюється на рідину.

ПМВ 11. Пакування готового продукту

ПМВ 11.1. Пакування біоетанолу

Отриманий біоетанол за допомогою насоса (Н-53) зі збірника (Зб-43) подають до розливного апарату (РА-44). За допомогою автоматизованого розливного апарату (РА-44) проходить розлив біоетанолу у бочки з нержавіючої сталі об'ємом 50 л та автоматичне закупорювання даної тари.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю біосинтезу біоетанолу

Таблиця 7.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Підготовка розчинів титрувальних агентів				
ДР 1.1. Приготування розчину HCl	Концентрація розчину хлороводню	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
Кх				
ДР 1.2. Приготування та стерилізація розчину NaOH	Концентрація розчину гідроксиду натрію, температура, час роботи, тиск	Хімічний метод, термометр технічний, годинник, манометр	Концентрацію – після приготування розчину; тиск і температуру – безперервно під час стерилізації	C = 6% T = 131 °C τ = 40 хв P = 0,05 МПа
Кх, Кт				
ДР 2. Підготовка лігноцелюлозної сировини				
ДР 2.1. Вимочування соломи у воді	Температура, час роботи	Термометр технічний, годинник	Температура – безперервно під час процесу	T = 80 °C τ = 5-10 хв
Кт				
ДР 2.2. Обробка паром	Температура, час роботи, концентрація сухих речовин	Термометр технічний, годинник, вологомір	Температура – безперервно під час процесу, концентрація сухих речовин – в кінці процесу	T = 195 °C τ = 12 хв CP = 44%
Кт, Кх				

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА			Літ.	Арк.	Акрюшів
Розроб.	Потапенко В.В.							<i>Продовження таблиці 7.1</i>		
Перевір.	Скороцька О.І.							Кафедра БТМ		
Реценз.								81		
Н. Контр.										
Затверд.	Пирог Т.П.									

<i>ДР 2.3. Гідроліз соломи</i>	Температура, час роботи, концентрація сухих речовин, рН гідролізату, швидкість переміщення	Термометр технічний, годинник, вологомір, рН – метр, тахометр	Температура, рН, швидкість переміщення – безперервно під час процесу, концентрація сухих речовин – в кінці процесу	T = 50 °C τ = 96 год CP = 30% рН = 4,8-5,0 w = 6,6 об/хв
Кт, Кх				
<i>ДР 3. Підготовка аераційного повітря</i>				
<i>ДР 3.2. Очищення повітря на фільтрі грубої очистки</i>	Повітря на виході з фільтра грубого очищення. Ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 85 % Тиск згідно паспорту
Кт				
<i>ДР 3.3. Стиснення (компрювання) повітря</i>	Стиснене повітря. Тиск, температура	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,35 МПа t = 120-250 °C
Кт				
<i>ДР 3.4. Охолодження та видалення вологи з повітря</i>	Охолоджене повітря. Температура. Повітря після видалення зайвої вологи. Вміст вологи	Термометр технічний Психрометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	T = 25 °C W = 65%
Кт				
<i>ДР 3.5. Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря. Температура. Вміст вологи	Термометр технічний Психрометричний метод	Після нагрівання повітря	T = 50 °C W = 50%
Кт				
<i>ДР 3.6. Очищення повітря на фільтрі тонкого очищення</i>	Очищене повітря. Ступінь очищення, перепад тисків	Перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра. Манометр	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	E=95%
Кт				
<i>ДР 3.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря. Ступінь очищення	Перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	E = 99,99%
Кт				

Продовження табл. 7.1

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ				
<i>ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці</i>				
<i>ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А</i>	Розчин компонентів. Тиск, температура, час	Манометр, термометр технічний, годинник	Тиск і температуру – безперервно під час стерилізації	P = 0,05 МПа T = 112 °C τ = 30 хв
КТ				
<i>ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л</i>				
<i>ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А</i>	Розчин компонентів. Тиск, температура, час	Манометр, термометр технічний, годинник	Тиск і температуру – безперервно під час стерилізації	P = 0,05 МПа T = 112 °C τ = 30 хв
КТ				
<i>ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³</i>				
<i>ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А</i>	Розчин компонентів. Тиск, температура, час	Манометр, термометр технічний, годинник	Тиск і температуру – безперервно під час стерилізації	P = 0,05 МПа T = 112 °C τ = 30 хв
КТ				
<i>ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м³</i>				
<i>ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А</i>	Розчин компонентів. Тиск, температура, час	Манометр, термометр технічний, годинник	Тиск і температуру – безперервно під час стерилізації	P = 0,05 МПа T = 112 °C τ = 30 хв
КТ				
ТП 5. Підготовка посівного матеріалу				
<i>ТП 5.1. Підтримання колекційної культури</i>	Культура <i>S. cerevisiae</i> 36aSI.10.4, температура, час пересіву	Термометр технічний, годинник	Температура визначається безперервно під час збереження	T = 4-5 °C τ = 3 міс
КТ				

Продовження табл. 7.1

<p>ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі</p>	<p>Культура <i>S. cerevisiae</i> 36aSI.10.4, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування</p>	<p>T = 30 °C τ = 24 год Відсутність сторонньої мікрофлори</p>
<p>Кт, Км</p>				
<p>ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі</p>	<p>Культура <i>S. cerevisiae</i> 36aSI.10.4, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування</p>	<p>T = 30 °C τ = 12 год Відсутність сторонньої мікрофлори</p>
<p>Кт, Км</p>				
<p>ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалці</p>	<p>Посівний матеріал, температура культивування, тривалість культивування, рН середовища, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси</p>	<p>Термометр технічний, годинник, рН- метр, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і частота обертів контролюються безперервно під час культивування, рН контролюється перед початком культивування, мікробіологічний контроль і визначення біомаси проводиться після культивування</p>	<p>T = 30 °C τ = 24 год рН = 5,5 w=100 об/хв Відсутність сторонньої мікрофлори X = 12 г/л</p>
<p>Кт, Км, Кх</p>				

Продовження табл. 7.1

<p><i>ТП 5.5.</i> <i>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л</i></p>	<p>Посівний матеріал, температура культивування, тривалість культивування, рН середовища, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси</p>	<p>Термометр технічний, годинник, рН-метр, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів контролюються безперервно під час культивування. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 4 годин</p>	<p>$T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 8\text{ год}$ $pH = 5,5$ $w=100\text{ об/хв}$ Відсутність сторонньої мікрофлори $X = 12\text{ г/л}$</p>
<p>Кт, Км, Кх</p>				
<p><i>ТП 5.6.</i> <i>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³</i></p>	<p>Посівний матеріал, температура культивування, тривалість культивування, рН середовища, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси</p>	<p>Термометр технічний, годинник, рН-метр, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів контролюються безперервно під час культивування. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 4 годин</p>	<p>$T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 8\text{ год}$ $pH = 5,5$ $w=100\text{ об/хв}$ Відсутність сторонньої мікрофлори $X = 12\text{ г/л}$</p>
<p>Кт, Км, Кх</p>				
<p><i>ТП 6. Біосинтез</i></p>				
<p><i>ТП 6.1.</i> <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 10 м³ (I стадія)</i></p>	<p>Посівний матеріал, температура культивування, тривалість культивування, рН середовища, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси</p>	<p>Термометр технічний, годинник, рН-метр, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і частота обертів контролюються безперервно. Проба культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбирається 1 раз.</p>	<p>$T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 12\text{ год}$ $w=100\text{ об/хв}$ $pH = 5,5$ Відсутність сторонньої мікрофлори $X = 12\text{ г/л}$</p>
<p>Кт, Км, Кх</p>				

Закінчення табл. 7.1

<i>ТП 6.2. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 10 м³ (II стадія)</i>	Посівний матеріал, температура культивування, тривалість культивування, рН середовища, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси концентрація біоетанолу	Термометр технічний, годинник, рН- метр, тахометр, мікробіологічний контроль, біосенсор	Температура і частота обертів контролюються безперервно під час культивування. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси та концентрації біоетанолу відбираються 2 рази кожні 15 годин.	Т = 30 °С τ = 34 год w=100 об/хв рН = 5,5 Відсутність сторонньої мікрофлори Х = 12 г/л С _{біоетанол} = 54,1 г/л
Кт, Км, Кх				
ТП 7. Відділення біомаси				
<i>ТП 7.1. Сепарування культуральної рідини</i>	Швидкість обертів	Тахометр технічний	Під час проведення операції	w = 3000 об/хв
Кт				
ТП 8. Відділення високомолекулярних домішок				
<i>ТП 8.1. Дистиляція</i>	Температура, тиск	Термометр технічний, манометр	Під час проведення операції	t = 90°С, p=0,2 МПа
Кт				
ТП 9. Відділення низькомолекулярних домішок				
<i>ТП 9.1 Ректифікація</i>	Температура, тиск	Термометр технічний, манометр	Під час проведення операції	t = 90°С, p=0,2 МПа
Кт				
ТП 10. Зневоднення біоетанолу				
<i>ТП 10.1. Пропускання через молекулярні сіта</i>	Температура, тиск	Термометр технічний, манометр	Під час проведення операції	t = 90°С, p=0,2 МПа
Кт				
ПМВ 11. Пакування готового продукту				
<i>ПМВ 11.1. Пакування біоетанолу</i>	Об'єм біоетанолу в одній розлитій бочці	Об'ємний дозатор	Під час процесу розливу	V=50 л
Кт				

Для контролю виробництва під час біосинтезу (46 год) через пробовідбірник відбирають проби культуральної рідини кожні 15 годин з метою проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси сахароміцетів та отриманого продукту – біоетанолу, джерела вуглецю (гідролізат соломи пшениці) і джерела азоту (пептон).

7.2. Мікробіологічний контроль

7.2.1. Мікроскопіювання культуральної рідини

Для оцінки фізіологічного стану посівного матеріалу під час його підготовки та культуральної рідини під час біосинтезу оцінюють морфологію дріжджових клітин. За допомогою мікроскопа протягом всього процесу вирощування стежать за станом дріжджів, кількістю мертвих клітин і сторонніх домішок. Для цього використовують метод «роздавлена» крапля: на поверхню знежиреного предметного скла мікробіологічною петлею наносять краплю суспензії досліджуваної культури сахароміцетів з рідким поживним середовищем, при необхідності додають краплю барвника (метиленовий синій). Потім обережно покривають покривним склом краплю так, щоб між покривним і предметним склом не було бульбашок повітря, і рідина не виступала за краї покривного скла. Вивчають морфологічні особливості культури *S. cerevisiae* 36aS1.10.4: форму і розміри клітин, характер розмноження, наявність вакуолей і ліпідних включень, кількість неактивних і мертвих клітин [148].

Морфологія *S. cerevisiae*: клітини мають округлу, яйцевидну або еліпсоїдну форму; розмір їх коливається від 2,5 до 10 мкм поперечно і від 4,5 до 21 мкм в довжину. Клітини складаються з мікроскопічних (видимих в звичайному мікроскопі при збільшенні в 600-900 разів) і субмікроскопічних, видимих тільки в електронному мікроскопі (збільшення від 15-20 тис. разів), структур [149].

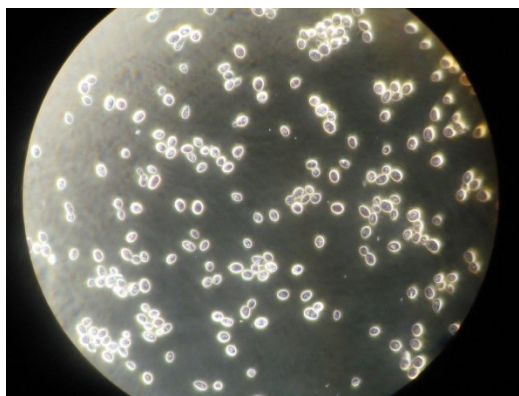


Рис. 7.1. Вигляд *S. cerevisiae* під мікроскопом ($\times 40$) [150].

Якщо під час мікроскопіювання були виявлені клітини, що є не типовими та не відповідають морфологічним властивостям сахароміцетів, то це може свідчити про наявність контамінації в культуральній рідині сторонньою мікрофлорою.

Перед підрахунком кількості мертвих клітин сахароміцетів в культуральній рідині, визначають їх в готовому стерильному поживному середовищі і вичитають це значення з кількості мертвих клітин в культуральній рідині. В ході роботи до однієї краплі досліджуваної проби додають одну краплю метиленового синього, перемішують краєм покривного скла і накривають ім. Через 2-3 хвилини в 19 полях зору препарату підраховують кількість забарвлених клітин, обчислюють відсоток (%) вмісту мертвих клітин [151].

7.2.2. Методика розсіву на чашки Петрі

Кількісний облік сахароміцетів та перевірку на чистоту здійснюють шляхом висіву на тверді поживні середовища. Кількісний облік дріжджів здійснюють чашковим методом Коха. Цей метод є найбільш поширеним для визначення загального мікробного забруднення різних субстратів. Суть чашкового методу полягає в тому, що проводять посів певного об'єму досліджуваного матеріалу в чашки Петрі з твердим поживним середовищем. При подальшому вирощуванні посіву в термостаті з кожної клітини внаслідок розмноження утворюється колонія. Кількість колоній підраховують.

Як поживне середовище для дріжджів використовують сусло-агар. Крім того, для виявлення бактерій застосовують м'ясо-пептонний агар, а для підрахунку цвілевих грибів також сусло-агар. Робота за таким методом включає три етапи: приготування розведень, посів на тверде поживне середовище в чашки Петрі і підрахунок колоній, що вирости.

Приготування розведень. Кількість мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища, як правило, велика, тому для отримання окремих колоній готують ряд розведень досліджуваного субстрата. Розведення готують у стерильній водопровідній воді або фізіологічному розчині (0,5% водний розчин NaCl), зазвичай використовують десятиразові послідовні розведення (1:10, 1:100, 1:1000 і т. п.). Ступінь розведення досліджуваного зразка визначається передбачуваною кількістю мікроорганізмів в зразку. Відповідно число розведень тим більше, чим більше мікроорганізмів в вихідному субстраті.

Для приготування кожного розведення обов'язково використовують окрему піпетку. Нехтування цим правилом може привести до отримання помилкового результату, інколи в 1000 і більше разів того, що перевищує достеменний. Помилка пов'язана з адсорбцією мікроорганізмів на стінках піпетки, внаслідок чого не всі клітини видаляються з піпетки при приготуванні відповідного розведення. Частина клітин, що залишилася на стінках піпетки, може потім потрапити в одне з подальших розведень, що і з'явиться причиною отримання завищеного результату.

Посів роблять з певних розведень залежно від передбачуваної кількості мікроорганізмів в досліджуваному субстраті. Стерильною піпеткою наносять певний об'єм (зазвичай 0,05, 0,1 або 0,2 мл) відповідного розведення, задалегідь ретельно перемішаного, на поверхню агарової пластинки в чашці Петрі. Цей об'єм розподіляють по поверхні середовища стерильним шпателем. Потім цим же шпателем проводять по всій поверхні в другій чашці, куди посівний матеріал не вносили. При виявленні мікроорганізмів, кількість яких в субстраті відносно невелика, посівний матеріал розподіляють по поверхні

середовища тільки в одній чашці Петрі. З кожного розведення роблять 4–6 паралельних посівів. Для паралельних посівів з одного розведення можна користуватися однією стерильною піпеткою і одним шпателем. Для посівів з різних розведень, використовують нову стерильну піпетку і новий шпатель. Чашки із засіяним середовищем поміщають в термостат, відрегульований на певну температуру, сприятливу для розвитку мікроорганізмів, перевернувши їх догори дном.

Колонії бактерій підраховують зазвичай через 2 діб, колонії грибів і дріжджів – через 5–7 діб. Колонії, як правило, підраховують з невеликим збільшенням, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності відзначають прораховану колонію крапкою на зовнішній стороні дна чашки, користуючись маркером. Колонії підраховують такими способами: якщо вони ізольовані один від одного, великі і в невеликій кількості, то зазвичай їх рахують по всій поверхні чашки. Якщо розвинулась велика кількість колоній, дно чашки Петрі ділять на сектори, підраховують в 2–3 секторах, знаходять, середнє арифметичне на один сектор, а потім множать на кількість секторів (або підраховують кількість колоній в кожному секторі і результати підсумовують).

Посіви на МПА інкубують при температурі $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ спочатку в горизонтальному (протягом 2 діб), а потім у вертикальному положенні. Результати посівів слід враховувати через 48, 72 години і остаточно через 8 діб. Посіви на середовищі Сабуро інкубують при температурі $(22\pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 8 діб, спочатку в горизонтальному (протягом 2 діб), а потім у вертикальному положенні. В результаті інкубації зроблених посівів протягом зазначених термінів на МПА не повинний бути виявлений ріст сторонньої мікрофлори, на середовищі Сабуро – ріст грибів [152].

7.3. Визначення концентрації біомаси *S. cerevisiae* 36aS1.10.4

Концентрацію біомаси сахароміцетів під час культивування (вирощування інокуляту та біосинтезу) визначають ваговим методом. Для цього відбирають пробу 10 см^3 культуральної рідини. Після чого зразок

поміщають у центрифугу. Проводять центрифугування 10 хв при швидкості 5000 об/хв. Після чого зливають надосадову рідину. Потім дистильованою водою з циліндра у кількості 5 см³ за допомогою скляної палички промивають осад та іншими 5 см³ води промивають скляну паличку (кількісний метод). Після чого знову центрифугують 10 хв при швидкості 5000 об/хв. Далі в ході роботи ми зважують доведений до постійної маси паперовий фільтр. Потім через паперовий зважений фільтр проводять фільтрацію отриманої рідини. Пробу поміщають в бокс, висушують не менше 10 год і доводять до постійної маси в сушильній шафі при температурі 103 ± 2 ° С.

Масу сухої речовини визначають за формулою (в г/л):

$$x = (A-B) \times 5 / V,$$

де А – маса фільтрувального паперу з сухою біомасою, г; В – маса сухого фільтрувального паперу, г; V – робочий об'єм – 0,2 л [153].

7.4. Визначення концентрації цільового продукту (біоетанол)

Методика визначення етанолу в культуральній рідині проводиться за допомогою амперометричного біосенсора на основі алкогольоксидази. В основі роботи амперометричного ферментного біосенсора для визначення етанолу лежить така ферментативна реакція:



Гідроліз субстрату супроводжується накопиченням електрохімічно активної речовини – пероксиду водню, що розкладається з утворенням електронів, які й реєструються амперометричним перетворювачем.

Реєстрацію сигналу в біосенсорному аналізі проводять, використовуючи кисневий електрод Кларка, на поверхні якого закріплений рецепторний елемент – іммобілізована алкогольоксидаза. В якості перетворювача використовують установку БПК-термооксіметр Експерт-001 (Еконікс-Експерт: обсяг кювети 5 мл; натрій-калієвий фосфатний буфер рН = 7,6); перемішування розчину в кюветі здійснюють з використанням магнітної мішалки (швидкість перемішування 300 об/хв); введення проби здійснюють автоматичними мікропіпетками змінного обсягу (20-200 мкл, 1000-5000 мкл).

Вимірювання етанолу за допомогою амперометричного біосенсора проводять в 100 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,6 за кімнатної температури. Для отримання калібрувальної кривої до електрохімічної комірки додають аліквоти концентрованої розчину етанолу. Потім додають пробу культуральної рідини (5 мкл, що призводило до 1000-кратного розведення). Після отримання відгуку (час відгуку приблизно 2-3 хвилини) за допомогою калібрувальної кривої визначають концентрацію етанолу у відібраній пробі культуральної рідини. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивають буферним розчином до стабілізації базового сигналу [154, 155].

7.5. Визначення концентрації джерела вуглецю (гідролізат соломи пшениці)

В данному курсовому проєкті джерелом вуглецю є гідролізат соломи пшениці, до складу якого входить целюлоза та геміцелюлоза, які в свою чергу гідролізують до глюкози, фруктози, ксилози, галактози, манози, арабінози, рамнози і тд. Тому, доцільним є визначення редукуючих речовин, тобто загального вмісту вуглеводів в отриманому гідролізаті та в культуральній рідині. Метод ґрунтується на окисненні редукуючих цукрів лужним розчином заліzosинеродистого калію з наступним вимірюванням інтенсивності забарвлення окислювача фотоелектроколориметром. Тобто метод заснований у визначенні оптичної густини розчину фероціаніду калію після того, як він прореагує із редукуючими вуглеводами. Вміст редукуючих речовин визначають феріціанідним методом (метод Хагедорна – Ієнсена) наступним чином: в пробірку вносять 1 мл відібраної проби культуральної рідини і додають 3 мл ферріціанідного реактиву. Суміш кип'ятять на водяній бані протягом 10 хв, охолоджують і вимірюють інтенсивність фарбування на спектрофотометрі (ФЕК) при довжині хвилі 400 нм відносно дистильованої води. Вміст редукуючих речовин визначають за допомогою калібрувального графіка, який був попередньо побудований з використанням глюкози в якості стандарту.

Розрахунок проводять за формулою:

$PP = x \times p$, де

x – кількість глюкози по калібрувальної кривої, мкг/мл;

p – коефіцієнт, що враховує розведення проби [156].

7.6. Визначення концентрації джерела азоту (пептон)

Визначення вмісту амінного азоту (джерело азоту – пептон) в культуральній рідині проводять методом формольного титрування. Амінным називається азот, який входить до вільних аміногруп ($-NH_2$) амінокислот та інших продуктів гідролізу білків. Принцип методу заснований на блокуванні формальдегідом при рН 7,0 вільних аміногруп, а також титрування лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично.

У склянку місткістю 50 мл наливають необхідний обсяг (0,5 мл) культуральної рідини і доводять загальний об'єм дистильованою водою до 20 мл. Після чого електроди потенціометра занурюють в досліджуваний розчин, рН якого доводять до значення 7,0 за допомогою розчину натрію гідроксиду (0,1 моль/л) або розчину соляної кислоти (0,1 моль/л). Потім до вже нейтралізованого розчину додають 2 мл нейтрального формаліну, перемішують і, не виймаючи електроди, титрують вміст розчином натрію гідроксиду (0,1 моль/л) до рН 9,1. Проводять два однакових паралельних вимірювання. Перед кожним визначенням рН формаліну доводять до рН 7,0 10%-м розчином натрію гідроксиду. У ході визначення електроди повинні весь час залишатися зануреними в розчин. При титруванні слід використовувати бюретки, місткістю 5 мл.

Вміст амінного азоту в культуральній рідині у відсотках обчислюють:

$$X = \frac{V \times K \times 1,4 \times 100}{A \times 1000}, \text{ де}$$

A – кількість рідкого зразка (мл), взятого на аналіз;

100 – коефіцієнт перерахунку міліграмів в відсотки;

1000 – коефіцієнт перерахунку міліграмів в грами [157].

7.7. Визначення об'ємної частки біостанолу

Визначення буде проводитись ареометричним методом. Метод заснований на вимірюванні об'ємної частки біоетанолу в водно-спиртових розчинах ареометром типу АСп-1 (рис. 7.2) для спирта. базується на залежності відносної густини розчину від вмісту в ньому сухих речовин, а відносну густину визначають за допомогою ареометра. Дія ареометра заснована на гідростатичному законі Архімеда, згідно з яким тіло, що занурене в рідину, виштовхується силою, яка дорівнює масі рідини, що була витіснена. Ареометр являє собою тіло, що плаває в рідині. При одній і тій самій масі ареометра глибина його занурення і витіснений ним об'єм залежать тільки від густини досліджуваного розчину. Чим вище густина рідини, тим менше занурюється в неї ареометр і навпаки. Діапазон вимірювання об'ємної частки етилового спирту: 0%-100%. Похибка вимірювання: 0,1%.

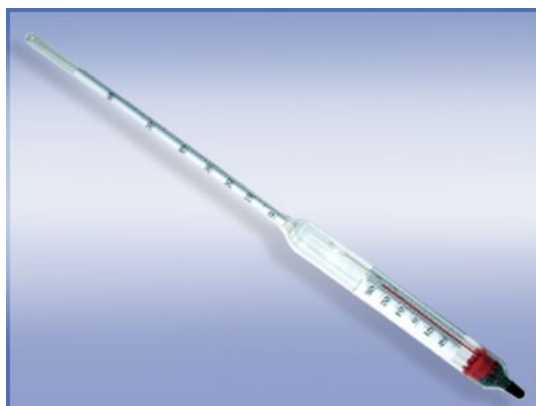


Рис. 7.2. Зовнішній вигляд ареометра типу АСп-1

Скляний циліндр для ареометра місткістю 250 або 500 см³ споліскують невеликою кількістю аналізованого дистилляту (~20 см³). Дистиллят, що залишився в колбі об'ємом 500 см³ переливають по стінці в циліндр, перемішують його скляною мішалкою по всій висоті стовпа рідини, вимірюють температуру дистилляту і визначають об'ємну частку етилового спирту. Ареометр беруть за верхній кінець стрижня, вільний від шкали, опускають в аналізуємий розчин, занурюючи його до тих пір, поки до передбачуваної відмітки шкали не залишиться 3-4 мм, потім дають ареометру вільно плавати. Після закінчення 3 хв знімають відлік показань ареометра,

використовуючи при необхідності лупу. Якщо ареометр занурився в розчин більш, ніж на 5 мм по відношенню до передбачуваної позначці шкали, то його виймають з розчину, протирають лляним рушником і вимір повторюють. Ареометр повинен плавати в розчині, не торкаючись стінок циліндра.

За остаточний результат вимірювання беруть середнє арифметичне результатів двох паралельних вимірювань, розбіжність між якими не повинна перевищувати 0,1% [158, 159].

7.8. Сучасний метод контролю виробництва – вимірювання об'ємної частки біоетанолу

Оптичний спиртомер "ІКОНЕТ-М" (рис. 7.3) є автоматичним електронним приладом для визначення об'ємної частки етилового спирту у водно-спиртових і багатокомпонентних спиртовмісних розчинах без попередньої перегонки спирту та використовується замість ареометру. Метод заснований на порівнянні оптичних характеристик аналізованого розчину з характеристиками еталонного водно-спиртового розчину.



Рис. 7.3. Зовнішній вигляд оптичного спиртометра "ІКОНЕТ-М"

Обсяг аналізованої проби – 15 см³. Діапазон вимірювань: 3% - 97%. Межа похибки вимірювань: $\pm 0,05\%$. Допустимий час безперервної роботи – 8 год.

За існуючою методикою вимірювання об'ємної частки етилового спирту кожного багатокомпонентного розчину, який містить етанол з його «перегонкою» займає близько 40 хвилин. Вимірювання оптичним спиртоміром – 1 хвилина з похибкою $\pm 0,1\%$ об.

Принцип дії спиртомера заснований на порівнянні коефіцієнтів поглинання досліджуваного розчину і водно-спиртового розчину, прийнятого за опорний. Вимірювання поглинання здійснюється в оптичній двухкамерній кюветі, яка встановлюється в оптичне відділення спиртомера. Один канал кювети (опорний) заповнений водно-спиртовим розчином з відомою об'ємною часткою етилового спирту і опломбований, в інший (вимірювальний) канал через штуцер заливається досліджуваний розчин.

Об'ємна частка етилового спирту в вимірюваному розчині розраховується за алгоритмом, закладеному в програмному забезпеченні спиртомера і відображається на дисплеї. Конструктивно спиртомер складається з вимірювального блоку і набору кювет з різними еталонними водно-спиртовими розчинами [158, 160, 161].

ВИСНОВКИ

Отже, при конструюванні рекомбінантних клітин *S. cerevisiae* використовують різні підходи, щоб збільшити концентрацію і вихід цільового продукту, створити стійкі до дії інгібіторів штами, а також розширити діапазон споживання субстрату. Перспективним є створення дріжджових продуцентів етанолу, що можуть використовувати лігноцелюлозну сировину. Оскільки природні штами *S. cerevisiae* не здатні до споживання ксилози, використовують кілька генетичних стратегій для конструювання сахароміцетів, які можна культивувати на середовищах з цим джерелом вуглецю. Ведуться роботи зі створення рекомбінантних *S. cerevisiae*, які здатні синтезувати бутанол, але, порівняно з бактеріальними системами експресії, гетерологічний синтез цього виду палива у сахароміцетів є дуже низьким. Оскільки ізобутанол може стати біопаливом наступного покоління, яке можна отримувати за допомогою мікроорганізмів, ведуться дослідження з генетичної модифікації *S. cerevisiae* з метою отримання високих концентрацій вказаного продукту.

Враховуючи всебічну ґрунтовну вивченість клітин *S. cerevisiae* на клітинному та молекулярному рівні, їх досить широко використовують як еукаріотичну систему експресії рекомбінантних сполук. На сьогодні сконструйовані штами сахароміцетів, що синтезують різні органічні кислоти – бурштинову, фумарову, ітаконову, гідроксипропіонову, молочну та ін. Також ведуться роботи із створення штамів *S. cerevisiae*, які можуть продукувати такі промислово важливі ферменти, як ліпазу, декстраназу, кутиназу, лаказу тощо. Враховуючи постійно зростаючий попит на фармацевтичні білки та здатність дріжджів до їх посттрансляційної модифікації, сконструйовані штами *S. cerevisiae*, які синтезують гірудин, глутатіон, антитромбін, ексенатид. Біологічні властивості каротиноїдів, а саме їх антимікробна, антиоксидантна та протипухлинна активність, дозволяють їх використовувати у медичній, фармацевтичній та харчовій галузях промисловості. Одним із способів отримання каротиноїдів є їх мікробний

синтез. Зокрема, за останні кілька років створені *S. cerevisiae*, що синтезують різні види даних сполук. Також генетично модифіковані дріжджі можна використовувати для отримання таких промислово важливих сполук, як 2,3-бутандіол, леван, ангідрид дифруктози та інших.

ЖИТЕПАТЫПА

1. Alfonzo A., Francesca N., Matraxia M., Craparo V., Naselli V., Mercurio V., Moschetti G. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to racemes of Grillo grape variety. *FEMS Microbiol. Lett.* 2020, 367(12): fnaa079. doi: 10.1093/femsle/fnaa079.
2. Pauley M., Maskell D. Mini-review: the role of *Saccharomyces cerevisiae* in the production of gin and vodka. *Beverages.* 2017, 3: 13. doi: 10.3390/beverages3010013.
3. Elghandour M., Tan Z., Abu Hafsa S., Adegbeye M., Greiner R., Ugbo E., Cedillo Monroy J., Salem A. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. *J. Appl. Microbiol.* 2020, 128: 658—674. doi: 10.1111/jam.14416.
4. Lee Y.G., Jin Y.S., Cha Y.L., Seo J.H. Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 2017, 228: 355—361. doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.042.
5. Huang S., Liu T., Peng B., Geng A. Enhanced ethanol production from industrial lignocellulose hydrolysates by a hydrolysate-cofermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2019, 42(5): 883—896. doi: 10.1007/s00449-019-02090-0.
6. Swidah R., Ogunlabi O., Grant C.M., Ashe M.P. n-Butanol production in *S. cerevisiae*: coordinate use of endogenous and exogenous pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, 102(22): 9857—9866. doi: 10.1007/s00253-018-9305-x.
7. Matsuda F., Ishii J., Kondo T., Ida K., Tezuka H., Kondo A. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance. *Microb. Cell.* 2013, 12: 119. doi: 10.1186/1475-2859-12-119.
8. Wess J., Brinek M., Boles E. Improving isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by successively blocking competing metabolic

pathways as well as ethanol and glycerol formation. *Biotechnol. Biofuels.* 2019, 12(1): 173. doi: 10.1186/s13068-019-1486-8.

9. Norouzi N., Fani M., Ziarani Z.K. The fall of oil age: a scenario planning approach over the last peak oil of human history by 2040. *J. Petrol. Sci. Eng.* 2020, 188: 106827. doi: 10.1016/j.petrol. 2019.106827.

10. Ko J.K., Lee J.H., Jung J.H., Lee S.-M. Recent advances and future directions in plant and yeast engineering to improve lignocellulosic biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2020, 134: 110390. doi: 10.1016/j.rser.2020.110390.

11. Xin F., Chen T., Jiang Y., Dong W., Zhang W., Zhang M., Wu H., Ma J., Jiang M. Strategies for improved isopropanol-butanol production by a *Clostridium* strain from glucose and hemicellulose through consolidated bioprocessing. *Biotechnol. Biofuels.* 2017, 10. doi: 10.1186/s13068-017-0805-1.

12. Rodrussamee N., Lertwattanasakul N., Hirata K., Suprayogi, Limtong S., Kosaka T., Yamada M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Bio-technol.* 2011, 90: 1573—1586. doi: 10.1007/s00253-011-3218-2.

13. Kostas E.T., White D.A., Du C., Cook D.J. Selection of yeast strains for bioethanol production from UK seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 2016, 28: 1427—1441. doi: 10.1007/s10811-015-0633-2.

14. Auesukaree C., Damnernsawad A., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Boonchird C., Kaneko Y., Harashima S. Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Genet.* 2009, 50: 301-310. doi: 10.1007/BF03195688.

15. Lian J., Mishra S., Zhao H. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: new tools and their applications. *Metab. Eng.* 2018, 50: 85—108. doi: 10.1016/j.ymben. 2018.04.011.

16. Lian J., Mishra S., Zhao H. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: new tools and their applications. *Metab. Eng.* 2018, 50, 85-108. doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.011.
17. Zhang J., Lan N. Hirudin variants production by genetic engineered microbial factory. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2018, 34 (2): 261-280. doi: 10.1080/02648725.2018.1506898.
18. Kobayashi J., Sasaki D., Bamba T., Hasunuma T., Kondo A. Sustainable production of glutathione from lignocellulose-derived sugars using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 103 (3): 1243-1254. doi: 10.1007/s00253-018-9493-4.
19. Lopez J., Cataldo V.F., Pena M., Saitua F., Ibaceta M., Saa P.A., Agosin E. Build your bioprocess on a solid strain- β -carotene production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019, 7: 171. doi: 10.3389/fbioe.2019.00171.
20. Blazic M., Balaz A.M., Tadic V., Draganic B., Ostafe R., Fischer R., Prodanovic R. Protein engineering of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* in yeast *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 for increased activity and stability. *Biochem. Eng. J.* 2019, 146: 179-185. doi: 10.1016/j.bej.2019.03.025.
21. Liu J., Sun Q., Yin H., Wang L., Wei H., Li K., Hang F. Optimal fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* expressing a dextranase from *Chaetomium gracile*. *Sugar Tech.* 2019, 1-8. doi: 10.1007/s12355-019-00476-5.
22. Niu Y., Wu L., Shen Y., Zhao J., Zhang J., Yi Y., Li H., Bao X. Coexpression of β -xylosidase and xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of saccharification and fermentation from xylo-oligosaccharides. *Cellulose.* 2019, 26 (13-14): 7923-7937. doi: 10.1007/s10570-019-02650-3.
23. Hull C.M., Loveridge E.J., Rolley N.J., Donnison I.S., Kelly S.L., Kelly D.E. Co-production of ethanol and squalene using a *Saccharomyces cerevisiae*

ERG1 (squalene epoxidase) mutant and agro-industrial feedstock. *Biotechnol. Biofuels*. 2014, 7 (1): 133. doi:10.1186/s13068-014-0133-7.

24. Shahsavarani H., Hasegawa D., Yokota D., Sugiyama M., Kaneko Y., Boonchir C., Harashima S. Enhanced bio-ethanol production from cellulosic materials by semi-simultaneous saccharification and fermentation using high temperature resistant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14. *J. Biosci Bioeng*. 2013, 115 (1): 20-23. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.07.018.

25. Stafa A., Zunar B., Franklin A., Zandona A., Miklenic M.S., Santek B., Svetec I.K. Novel approach in the construction of bioethanol-producing *Saccharomyces cerevisiae* hybrids. *Food. Technol. Biotechnol*. 2019, 57 (1): 5-16. doi: 10.17113/ftb.57.01.19.5685.

26. Zhang M.M., Xiong L., Tang Y.J., Mehmood M.A., Zhao Z.K., Bai F.W., Zhao X.Q. Enhanced acetic acid stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating expression of the de novo purine biosynthesis genes. *Biotechnol. Biofuels*. 2019, 12 (1): 116. doi: 10.1186/s13068-019-1456-1.

27. Zhang M., Fan W.J., Wang J.Y., Cao L.M. Optimized xylose isomerase uptake and expression level in *Saccharomyces cerevisiae* for improving ethanol production. *Appl. Environ. Biotechnol*. 2018, 3 (1): 47-52. doi: 10.26789/AEB.2018.01.007.

28. Huang S., Liu T., Peng B., Geng, A. Enhanced ethanol production from industrial lignocellulose hydrolysates by a hydrolysate-cofermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioprocess Biosyst. Eng*. 2019, 42(5), 883-896. doi: 10.1007/s00449-019-02090-0.

29. Azhar S.H.M., Abdulla R., Jambo S.A., Marbawi H., Gansau J.A., Faik A.A.M., Rodrigues K.F. Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. *Biochem. Biophys. Rep*. 2017, 10: 52-61. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.03.003.

30. Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A.S., Hatziloukas E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol*. 2020, 6(1): 1. doi: 10.3934/microbiol.2020001.

31. Li H., Shen Y., Wu M., Hou J., Jiao C., Li Z., Liu X., Bao X. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production. *Bioresour. Bioprocess.* 2016, 3(1): 51. doi: 10.1186/s40643-016-0126-4.
32. Cheng C., Tang R.Q., Xiong L., Hector R.E., Bai F.W., Zhao X.Q. Association of improved oxidative stress tolerance and alleviation of glucose repression with superior xylose-utilization capability by a natural isolate of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels.* 2018, 11(1): 1-19. doi: 10.1186/s13068-018-1018-y.
33. Hoang P.T.N., Ko J.K., Gong G., Um Y., Lee S.M. Genomic and phenotypic characterization of a refactored xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain for lignocellulosic biofuel production. *Biotechnol. Biofuels.* 2018, 11: 268. doi: 10.1186/s13068-018-1269-7.
34. Demeke M.M., Dietz H., Li Y., Foulquie-Moreno M.R., Mutturi S., Deprez S., Abt T.D., Bonini B.M., Liden G., Dumortier F., Verplaetse A., Boles E., Thevelein J.M. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol. Biofuels.* 2013, 6: 89. doi: 10.1186/1754-6834-6-89.
35. Li Y.C., Xie C.Y., Yang B.X., Tang Y.Q., Wu B., Sun Z.Y., Xia, Z.Y. Comparative transcriptome analysis of recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains with different xylose utilization pathways. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019, 189: 1007-1019. doi: 10.1007/s12010-019-03060-8.
36. Katahira S., Muramoto N., Moriya S., Nagura R., Tada N., Yasutani N., Tokuhira K. Screening and evolution of a novel protist xylose isomerase from the termite *Reticulitermes speratus* for efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels.* 2017, 10: 203. doi: 10.1186/s13068-017-0890-1.
37. Wang C., Zhao J., Qiu C., Wang S., Shen Y., Du B., Bao X. Couitilization of d-glucose, d-xylose, and l-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae* by

coexpressing the metabolic pathways and evolutionary engineering. *BioMed Res. Int.* 2017; 5318232. doi: 10.1155/2017/5318232.

38. Li S., Du J., Sun J., Galazka J.M., Glass N.L., Cate J.H., Yang X., Zhao H. Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biosyst.* 2010, 6(11): 2129-2132. doi: 10.1039/c0mb00063a.

39. Sadie C.J., Rose S.H., Den Haan R., Van Zyl W.H. Coexpression of a cellobiose phosphorylase and lactose permease enables intracellular cellobiose utilisation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 90(4): 1373-1380. doi: 10.1007/s00253-011-3164-z.

40. Aeling K.A., Salmon K.A., Laplaza J.M., Li L., Headman J.R., Hutagalung A.H., Picataggio S. Co-fermentation of xylose and cellobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.* 2012, 39(11): 1597-1604. doi: 10.1007/s10295-012-1169-y.

41. Li Y.C., Mitsumasu K., Gou Z.X., Gou M., Tang Y.Q., Li G.Y., Kida K. Xylose fermentation efficiency and inhibitor tolerance of the recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain NAPX37. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100(3): 1531-1542. doi: 10.1007/s00253-015-7167-z.

42. Wang C., Zhao J., Qiu C., Wang S., Shen Y., Du B., Bao X. Co-utilization of d-glucose, d-xylose, and l-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae* by coexpressing the metabolic pathways and evolutionary engineering. *BioMed Res. Int.* 2017; 5318232. doi: 10.1155/2017/5318232.

43. Li Y.C., Xie C.Y., Yang B.X., Tang Y.Q., Wu B., Sun Z.Y., Xia, Z.Y. Comparative transcriptome analysis of recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains with different xylose utilization pathways. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019, 189: 1007-1019. doi: 10.1007/s12010-019-03060-8.

44. Li Y.C., Mitsumasu K., Gou Z.X., Gou M., Tang Y.Q., Li G.Y., Kida K. Xylose fermentation efficiency and inhibitor tolerance of the recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain NAPX37. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100(3): 1531-1542. doi: 10.1007/s00253-015-7167-z.

45. Hector R.E., Dien B.S., Cotta M.A., Mertens J.A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. *Biotechnol. Biofuels*. 2013, 6(1): 84. doi: 10.1186/1754-6834-6-84.
46. Klimacek M., Kirl E., Krahulec S., Longus K., Novy V., Nidetzky B. Stepwise metabolic adaptation from pure metabolization to balanced anaerobic growth on xylose explored for recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 2014, 13(1): 37. doi: 10.1186/1475-2859-13-37.
47. Goncalves D.L., Matsushika A., Belisa B., Goshima T., Bon E.P., Stambuk B.U. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzyme Microb. Technol.* 2014, 63: 13-20. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.05.003.
48. Peng B., Huang S., Liu T., Geng A. Bacterial xylose isomerases from the mammal gut Bacteroidetes cluster function in *Saccharomyces cerevisiae* for effective xylose fermentation. *Microb. Cell Fact.* 2015, 14: 70. doi: 10.1186/s12934-015-0253-1.
49. Qi X., Zha J., Liu G.G., Zhang W., Li B.Z., Yuan Y.J. Heterologous xylose isomerase pathway and evolutionary engineering improve xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 2015, 6: 1165. doi: 10.3389/fmicb.2015.01165.
50. Katahira S., Muramoto N., Moriya S., Nagura R., Tada N., Yasutani N., Tokuhira K. Screening and evolution of a novel protist xylose isomerase from the termite *Reticulitermes speratus* for efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*. 2017, 10: 203. doi: 10.1186/s13068-017-0890-1.
51. Konishi J., Fukuda A., Mutaguchi K., Uemura T. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes. *Biotechnol. Lett.* 2015, 37(8): 1623-1630. doi: 10.1007/s10529-015-1840-2.
52. Aeling K.A., Salmon K.A., Laplaza J.M., Li L., Headman J.R., Hutagalung A.H., Picataggio S. Co-fermentation of xylose and cellobiose by an

engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.* 2012, 39(11): 1597-1604. doi: 10.1007/s10295-012-1169-y.

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

54. Almeida J., Modig T., Petersson A., Hahn-Hagerdal B., Liden G, Gorwa-Grauslund M. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007, 82: 340-349. doi: 10.1002/jctb.1676.

55. Smith J., van Rensburg E., Gorgens J.F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. *BMC Biotechnol.* 2014, 14: 41. doi: 10.1186/1472-6750-14-41.

56. Liu T., Huang S., Geng A. Recombinant diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain development for rapid glucose and xylose co-fermentation. *Fermentation.* 2018, 4(3): 59. doi: 10.3390/fermentation4030059.

57. Lee Y.G., Jin Y.S., Cha Y.L., Seo J.H. Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 2017, 228: 355-361. doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.042.

58. Tran P.H.N., Ko J.K., Gong G., Um Y., Lee S.M. Improved simultaneous co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery. *Biotechnol. Biofuels.* 2020, 13: 12. doi: 10.1186/s13068-019-1641-2.

59. Nawab S., Wang N., Ma X., Huo Y.X. Genetic engineering of non-native hosts for 1-butanol production and its challenges: a review. *Microb. Cell Fact.* 2020, 19: 79. doi: 10.1186/s12934-020-01337-w.

60. Azambuja S.P.H., Goldbeck R. Butanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: perspectives, strategies and challenges. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2020, 36: 48. doi: 10.1007/s11274-020-02828-z.

61. Schadeweg V., Boles E. n-Butanol production in *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the availability of coenzyme A and cytosolic acetyl-CoA. *Biotechnol. Biofuels*. 2016, 9: 44. doi: 10.1186/s13068-016-0456-7.

62. Shi S., Si T., Liu Z., Zhang H., Ang E.L., Zhao H. Metabolic engineering of a synergistic pathway for n-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 2016, 6: 25675. doi: 10.1038/srep25675.

63. Swidah R., Ogunlabi O., Grant C.M., Ashe M.P. n-Butanol production in *S. cerevisiae*: co-ordinate use of endogenous and exogenous pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, 102(22): 9857-9866. doi: 10.1007/s00253-018-9305-x.

64. Ashok B., Nanthagopal K., Saravanan B., Azad K., Patel D., Sudarshan B., Ramasamy R.A. Study on isobutanol and *Calophyllum inophyllum* biodiesel as a partial replacement in CI engine applications. *Fuel*. 2019, 235: 984-994. doi: 10.1016/j.fuel.2018.08.087.

65. Kuroda K., Ueda M. Cellular and molecular engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biobutanol production. *FEMS Microbiol. Lett.* 2016, 363 (3): fnv247. doi: 10.1093/femsle/fnv247.

66. Kondo T., Tezuka H., Ishii J., Matsuda F., Ogino C., Kondo A. Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 2012, 159(1-2): 32-37. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.01.022.

67. Park S.H., Kim S., Hahn J.S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98(21): 9139-9147. doi: 10.1007/s00253-014-6081-0.

68. Brat D., Weber C., Lorenzen W. Cytosolic re-localization and optimization of valine synthesis and catabolism enables increased isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. 2012, 5: 65. doi: 10.1186/1754-6834-5-65.

69. Matsuda F., Ishii J., Kondo T., Ida K., Tezuka H., Kondo A. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing

pathways and resolving cofactor imbalance. *Microb. Cell.* 2013, 12: 119. doi: 10.1186/1475-2859-12-119.

70. Wess J., Brinek M., Boles E. Improving isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by successively blocking competing metabolic pathways as well as ethanol and glycerol formation. *Biotechnol. Biofuels.* 2019, 12(1): 173. doi: 10.1186/s13068-019-1486-8.

71. Raab A.M., Gebhardt G., Bolotina N., Weuster-Botz D., Lang C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metab. Eng.* 2010, 12(6), 518-525. doi: 10.1016/j.ymben.2010.08.005.

72. Yan D., Wang C., Zhou J., Liu Y., Yang M., Xing J. Construction of reductive pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for effective succinic acid fermentation at low pH value. *Bioresour. Technol.* 2014, 156, 232-239. doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.053.

73. Xu G., Zou W., Chen X., Xu N., Liu L., Chen J. Fumaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by *in silico* aided metabolic engineering. *PLoS One.* 2012, 7(12). doi: 10.1371/journal.pone.0052086.

74. Xu G., Liu L., Chen J. Reconstruction of cytosolic fumaric acid biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 2012, 11(1), 24. doi: 10.1186/1475-2859-11-24.

75. Xu G., Chen X., Liu L., Jiang L. Fumaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneous use of oxidative and reductive routes. *Bioresour. Technol.* 2013, 148, 91-96. doi: 10.1016/j.biortech.2013.08.115.

76. Chen Y., Bao J., Kim I. K., Siewers V., Nielsen J. Coupled incremental precursor and co-factor supply improves 3-hydroxypropionic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 2014, 22, 104-109. doi: 10.1016/j.ymben.2014.01.005.

77. Kildegaard K.R., Jensen N.B., Schneider K., Czarnotta E., Ozdemir E., Klein T., Kim I.K. Engineering and systems-level analysis of *Saccharomyces cerevisiae* for production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA reductase-

dependent pathway. *Microb. Cell Fact.* 2016, 15(1), 53. doi: 10.1186/s12934-016-0451-5.

78. Borodina I., Kildegaard K.R., Jensen N.B., Blicher T.H., Maury J., Sherstyk S., Oberg F. Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via β -alanine. *Metab. Eng.* 2015, 27, 57-64. doi: 10.1016/j.ymben.2014.10.003.

79. Yamada R., Wakita K., Mitsui R., Ogino H. Enhanced D-lactic acid production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* following optimization of the global metabolic pathway. *Biotechnol. Bioeng.* 2017, 114(9), 2075-2084. doi: 10.1002/bit.26330.

80. Baek S.H., Kwon E.Y., Bae S.J., Cho B.R., Kim S.Y., Hahn J.S. Improvement of D-lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* under acidic conditions by evolutionary and rational metabolic engineering. *Biotechnol. J.* 2017, 12(10), 1700015. doi: 10.1002/biot.201700015.

81. Baek S.H., Kwon E.Y., Kim Y.H., Hahn J.S. Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100(6), 2737-2748. doi: 10.1007/s00253-015-7174-0.

82. Lee J.Y., Kang C.D., Lee S.H., Park Y.K., Cho K.M. Engineering cellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae* for improved production of L-lactic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 2015, 112(4), 751-758. doi: 10.1002/bit.25488.

83. Rodriguez A., Kildegaard K.R., Li M., Borodina I., Nielsen J. Establishment of a yeast platform strain for production of p-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis. *Metab. Eng.* 2015, 31, 181-188. doi: 10.1016/j.ymben.2015.08.003.

84. Blazeck J., Miller J., Pan A., Gengler J., Holden C., Jamoussi M., Alper H.S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for itaconic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98(19), 8155-8164. doi: 10.1007/s00253-014-5895-0.

85. Curran K.A., Leavitt J.M., Karim A.S., Alper H.S. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 2013, 15, 55-66. doi: 10.1016/j.ymben.2012.10.003.
86. Franco-Duarte R., Bessa D., Goncalves F., Martins R., Silva-Ferreira A.C., Schuller D. Sampaio P., Pais C. Genomic and transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* isolates with focus in succinic acid production. *FEMS Yeast Res.* 2017, 17(6). doi: 10.1093/femsyr/fox057.
87. Blazic M., Balaz A.M., Tadic V., Draganic B., Ostafe R., Fischer R., Prodanovic R. Protein engineering of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* in yeast *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 for increased activity and stability. *Biochem. Eng. J.* 2019, 146, 179-185. doi: 10.1016/j.bej.2019.03.025.
88. Darvishi F. Expression of native and mutant extracellular lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial. Biotechnol.* 2012, 5(5), 634-641. doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00354.x.
89. Liu J., Sun Q., Yin H., Wang L., Wei H., Li K., Hang F. Optimal fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* expressing a dextranase from *Chaetomium gracile*. *Sugar Tech.* 2020, 22(1), 171-178. doi: 10.1007/s12355-019-00746-5.
90. Jeong Y.S., So K.K., Lee J.H., Kim J.M., Chun G.T., Chun J., Kim D.H. Optimization of growth medium and fermentation conditions for the production of laccase 3 from *Cryphonectria parasitica* using recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycobiology.* 2019, 47(4), 512-520. doi: 10.1080/12298093.2019.1661566.
91. Iimura Y., Sonoki T., Habe H. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.* 2018, 141, 39-43. doi: 10.1016/j.pep.2017.09.004.
92. Kwiatos N., Jedrzejczak-Krzepkowska M., Krzeminska A., Delavari A., Paneth P., Bielecki S. Evolved *Fusarium oxysporum* laccase expressed in

Saccharomyces cerevisiae. *Sci. Rep.* 2020, 10(1), 1-11. doi: 10.1038/s41598-020-60204-1.

93. Shalini T., Martin A. Identification, isolation, and heterologous expression of sunflower wax synthase for the synthesis of tailored wax esters. *J. Food Biochem.* 2020, 44(10), e13433. doi: 10.1111/jfbc.13433.

94. Zhang J., Cai Y., Du G., Chen J., Wang M., Kang Z. Evaluation and application of constitutive promoters for cutinase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol.* 2017, 55(7), 538–544. doi: 10.1007/s12275-017-6514-4.

95. Preethi P.S., Gomathi A., Srinivasan R., Pavan Kumar J.G.S., Murugesan K., Muthukailannan G.K. Laccase: recombinant expression, engineering and its promising applications. *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries.* 2020, 63-85. doi: 10.1007/978-981-15-1710-5_3.

96. Thak E.J., Yoo S.J., Moon H.Y., Kang H.A. Yeast synthetic biology for designed cell factories producing secretory recombinant proteins. *FEMS Yeast Res.* 2020, 20(2), foaa009. doi: 10.1093/femsyr/foaa009.

97. Zhang J., Lan N. Hirudin variants production by genetic engineered microbial factory. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2018, 34(2), 261-280. doi: 10.1080/02648725.2018.1506898.

98. Kim M.D, Rhee S.K, Seo J.H. Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal δ -integration. *J. Biotechnol.* 2001, 85(1), 41-48. doi: 10.1016/S0168-1656(00)00376-X.

99. Kim M.D., Han K.C., Kang H.A., Rhee S.K., Seo J.H. Coexpression of BiP increased antithrombotic hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 2003, 101(1), 81-87. doi: 10.1016/S0168-1656(02)00288-2.

100. Kim M.D., Lee T.H., Lim H.K., Seo J.H. Production of antithrombotic hirudin in GAL1-disrupted *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 65(3), 259-262. doi: 10.1007/s00253-004-1598-2.

101. Kim C.H., Rao K.J., Youn D.J., Rhee, S.K. Scale-up of recombinant hirudin production from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2003, 8(5), 303-305. doi: 10.1007/BF02949222.

102. Ramiseti S., Kang H.A., Rhee S.K., Kim C.H. Production of recombinant hirudin in galactokinase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* by fed-batch fermentation with continuous glucose feeding. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2003, 8(3), 183. doi: 10.1007/BF02935894.

103. Hara K.Y., Kiriya K., Inagaki A., Nakayama H., Kondo A. Improvement of glutathione production by metabolic engineering the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 94(5), 1313-1319. doi: 10.1007/s00253-011-3841-y.

104. Kobayashi J., Sasaki D., Hara K.Y., Hasunuma T., Kondo A. Enzymatic improvement of mitochondrial thiol oxidase *Erv1* for oxidized glutathione fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 2017, 16(1), 44. doi: 10.1186/s12934-017-0658-0.

105. Prima A., Hara K.Y., Djohan A.C., Kashiwagi N., Kahar P., Ishii J., Nakayama H., Okazaki F., Prasetya B., Kondo A., Yopi, Ogino C. Glutathione production from mannan-based bioresource by mannanase/mannosidase expressing *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 2017, 245, 1400-1406. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.190.

106. Kobayashi J., Sasaki D., Bamba T., Hasunuma T., Kondo A. Sustainable production of glutathione from lignocellulose-derived sugars using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 103(3), 1243–1254. doi: 10.1007/s00253-018-9493-4.

107. Tang L., Wang W., Zhou W., Cheng K., Yang Y., Liu M., Cheng K., Wang W. Three-pathway combination for glutathione biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 2015, 14(1), 139. doi: 10.1186/s12934-015-0327-0.

108. Mallu M.R., Vemula S., Ronda S.R. Production, purification and characterization of recombinant human antithrombin III by *Saccharomyces*

cerevisiae. *Electron. J. Biotechnol.* 2016, 19(4), 81-89. doi: 10.1016/j.ejbt.2016.06.002.

109. Jung S.J., Nguyen N.T.T., Lee S.A., Seo S.H., Choi E.S., Lee H.W., Seong G.H., Bae O.N., Lee E.K. In-vivo half-life and hypoglycemic bioactivity of a fusion protein of exenatide and elastin-based polypeptide from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 2019, 303, 16-24. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.06.304.

110. Vargas-Sinisterra A.F., Ramirez-Castrillon M. Yeast carotenoids: production and activity as antimicrobial biomolecule. *Arch. Microbiol.* 2020, 1-16. doi: 10.1007/s00203-020-02111-7.

111. Zhou P., Xie W., Li A., Wang F., Yao Z., Bian Q., Zhu Y., Yu H., Ye L. Alleviation of metabolic bottleneck by combinatorial engineering enhanced astaxanthin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 2017, 100, 28-36. doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.02.006.

112. Wang R., Gu X., Yao M., Pan C., Liu H., Xiao W., Yuan Y. Engineering of β -carotene hydroxylase and ketolase for astaxanthin overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Chem. Sci. Eng.* 2017, 11(1), 89-99. doi: 10.1007/s11705-017-1628-0.

113. Lopez J., Cataldo V.F., Pena M., Saitua F., Ibaceta M., Saa P.A., Agosin E. Build your bioprocess on a solid strain- β -carotene production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019, 7, 171. doi: 10.3389/fbioe.2019.00171.

114. Sun L., Atkinson C.A., Lee Y.G., Jin Y.S. High-level β -carotene production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without overexpression of a truncated HMG1 (tHMG1). *Biotechnol. Bioeng.* 2020, 117(11), 3522-3532. doi: 10.1002/bit.27508.

115. Su B., Song D., Yang F., Zhu H. Engineering a growth-phase-dependent biosynthetic pathway for carotenoid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2020. doi: 10.1007/s10295-020-02271-x.

116. Cataldo V.F., Arenas N., Salgado V., Camilo C., Ibanez F., Agosin E. Heterologous production of the epoxy-carotenoid violaxanthin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 2020, 59, 53-63. doi: 10.1016/j.ymben.2020.01.006.
117. Bamba T., Yukawa T., Guirimand G., Inokuma K., Sasaki K., Hasunuma T., Kondo A. Production of 1, 2, 4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering. *Metab. Eng.* 2019, 56, 17-27. doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.012.
118. Kim S.J., Sim H.J., Kim J.W., Lee Y.G., Park Y.C., Seo J.H. Enhanced production of 2, 3-butanediol from xylose by combinatorial engineering of xylose metabolic pathway and cofactor regeneration in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 2017, 245, 1551-1557. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.034.
119. Lee Y.G., Seo J.H. Production of 2, 3-butanediol from glucose and cassava hydrolysates by metabolically engineered industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels.* 2019, 12(1), 204. doi: 10.1186/s13068-019-1545-1.
120. Ko H., Bae J.H., Kim M.J., Sung B.H., Sohn J.H. Microbial production of difructose anhydride III from *Jerusalem artichoke* tuber powder by recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Ind. Crops Prod.* 2019, 135, 99-106. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.04.026.
121. Ko H., Bae J.H., Sung B.H., Kim M.J., Kim C.H., Oh B.R., Sohn J.H. Efficient production of levan using a recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* hypersecreting a bacterial levansucrase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 46(11), 1611–1620. doi: 10.1007/s10295-019-02206-1.
122. Lopez J., Bustos D., Camilo C., Arenas N., Saa P.A., Agosin E. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the overproduction of β -ionone and its precursor β -carotene. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020, 8. doi: 10.3389/fbioe.2020.578793.

123. Гарбуз С.А. Производство этилового спирта с использованием нового штамма *Saccharomyces cerevisiae*. *Наука, техника и образование*. 2015, 10 (16).
124. Дерегуляція ринку біоетанолу – крок до енергетичної незалежності України. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://daily.rbc.ua/ukr/show.html>.
125. Названо ключові переваги використання біоетанолу в якості палива. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://superagronom.com/news>.
126. Високоєфективні засоби приготування біопалива / О.Є. Колосов, Г.Л. Рябцев, В.І. Сівецький, Д.Е. Сідоров, С.О. Пристайлов. – К.: Січкара, 2010. – 152 с.
127. Види палива для автомобілів. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ukr-prokat.com.html>.
128. На сколько изменился жилой фонд и автопарк Киева. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://autoconsulting.ua>.
129. На що слід зважати, заправляючи автомобіль паливом Євро? [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://agroexpert.ua>.
130. Визначення бродильної активності дріжджів: метод. вказ. до вик. лаб. роботи з дисципліни «Технічна мікробіологія» для студ. першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ден. та заоч. форм навч. / уклад. О.М. Шаніна, Т.В. Гавриш, Н.О. Боровікова. – Х.: ХНТУСГ, 2019. – 17 с.
131. Загальна біотехнологія: метод. рекомендації щодо розрахунків критеріїв ефективності біотехнологічних процесів для здобувачів вищої освіти «Бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ден. форми навч. / уклад. О.І. Юлевич. – М.: МНАУ, 2017. – 28 с.
132. Ратушняк Г.С., Джеджула В.В., Анохіна К.В. Енергозберігаючі відновлювальні джерела теплопостачання. ВНТУ, 2010. – 170 с.
133. Лантух Г.В., Лукашевич К.Н., Новак А.Г., Цыганков С.П. Получение обогащенного топливного этанола. *Відновлювана енергетика*. 2012, 4.

134. Биоэтанольные решения. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://agrotechnology.com.ua>.
135. Этаноловое топливо. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.hisour.com>.
136. Біоенергетика та охорона довкілля: консп. лекц. для студ. спец. 7.05140101 «Промислова біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К: НУХТ, 2013. – 88 с.
137. Методи відділення біомаси від культуральної рідини. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://4ua.co.ua>.
138. Методи відділення біомаси від культуральної рідини. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ukrbukva.net>.
139. Відділення біомаси. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://um.co.ua>.
140. Апарати мікробіологічної промисловості: навч. посібник / І.П. Данилов, С.І. Самійленко. – Х.: НТУ «ХПІ», 2008. – 272.
141. Основи проектування біотехнологічних виробництв: консп. лекц. для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Ю.В. Карлаш – К: НУХТ, 2013. – 143 с.
142. Відцентрове розділення неоднорідних систем. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://dl.sumdu.edu.ua>.
143. Дистиляція і ректифікація однорідних бінарних розчинів. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://dl.sumdu.edu.ua>.
144. Установки для перегонки з ректифікаційними колонками. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ua.uoslab.com>.
145. Установки зневоднення етанолу. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.vinprom.com.ua>.
146. Мельничук В.П., Шиян П.Л., Щуцький І.В. Використання мембранних процесів для дегідратації етанолу. *Цукор України*. 2013, 7-8, 91-92.

147. ГОСТ 33872-2016. Біоетанол паливний денатурований. Технічні умови (Перевидання). [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://docs.cntd.ru>.

148. Меледина Т.В., Иванова В.А., Федоров А.В. Аппаратурно-методическая база экспериментов в области пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья. Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2017. – 60 с.

149. Меледина Т.В., Давыденко С.Г. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм: Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 88 с.

150. *Saccharomyces cerevisiae*. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.flickr.com>.

151. Кокиева Г.Е. Механико-технологические основы производства кормового белково-витаминного концентрата в условиях сельскохозяйственных предприятий: Дис. д-ра техн. наук. Барнаул, 2017. 377 с.

152. Методичні вказівки до лабораторних робіт з технічної мікробіології для студентів напряму підготовки 6091501 «Харчові технології та інженерія» / уклад. О.В. Ващенко. – Харків: НТУ «ХПІ», 2008. –72с.

153. Культивування і визначення біомаси дріжджів. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://bio-x.ru>.

154. Зайцева Д.Ю., Зайцев М.Г., Мингалимов М.Р. Биосенсор на основе алкогольоксидазы из метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* NCYC 495 In для определения метилового и этилового спиртов. *Известия ТулГУ. Естественные науки*. 2016, 6.

155. Шкотова Л.В. Розробка амперометричних біосенсорів для визначення лактату, етанолу та глюкози у виноматеріалах: Автореф. дис. канд. біол. наук. Київ, 2006. 20 с.

156. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. Т. 2 / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – Киев, 2012. – 459 с.

157. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. – М.: ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзор, 2008. – 67 с.

158. ГОСТ 32035-2013. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.

159. ГОСТ 3639-79 Растворы водно-спиртовые. Методы определения концентрации этилового спирта. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.

160. Оптический спиртомер ИКОНЕТ-М. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://sigma-optic.com>.

161. Спиртомеры оптические ИКОНЭТ-М. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://all-pribors.ru>.

Додатки

Перелік публікацій за період навчання у магістратурі

Статті у фахових журналах:

1. *Потапенко В.В., Скроцька О.І.* Отримання практично цінних сполук з використанням рекомбінантних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Частина 1: синтез етанолу, бутанолу та ізобутанолу // Наукові праці НУХТ. – Т. 26, № 5. – С. 41-52.

Тези у збірниках міжнародних конференцій за межами України:

1. *Потапенко В.В., Скроцька О.І.* Синтез биогенных наночастиц серебра дрожжами рода *Saccharomyces* // Материалы международной научно-технической конференции молодых ученых «Инновационные материалы и технологии – 2020» (г. Минск, Республика Беларусь, 9-10 января 2020 г.). – С. 339-340.

Тези у збірниках міжнародних конференцій в Україні:

1. *Потапенко В.В.* Можливості використання сахароміцетів для отримання антитромбіну // Матеріали IV Міжнародної науково-практичної дистанційної конференції «Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних та косметичних лікарських засобів» (м. Харків, 20 березня 2020 р.). – С. 110.

Тези у збірниках Всеукраїнських конференцій:

1. *Потапенко В.В., Скроцька О.І.* Біосинтез молочної кислоти генетично модифікованими дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* // Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» (м. Київ, 20 травня 2020 р.) – С. 73.

2. *Потапенко В.В., Скроцька О.І.* Отримання рекомбінантних сполук з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* // Збірник наукових праць «Науково-практичні засади загальноінженерної підготовки фахівців фармації» (м. Харків, 24 жовтня 2019 р.). – С. 138-139.

3. *Потапенко В.В., Скроцька О.І.* Синтез біоетанолу дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* на лігноцелюлозних субстратах // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2019» (м. Сєвєродонецьк, 12 грудня 2019 р.). – Ч. 1. – С. 282.

Тези у збірниках студентських конференцій НУХТ:

1. *Потапенко В., Скроцька О.* Рекомбінантні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* як продуценти біоетанолу // Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 2-3 квітня 2020 р.). – Ч. 1. – С. 397.



2020

НАУКОВІ ПРАЦІ

НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Том 26 № 5

*Журнал
«Наукові праці Національного університету харчових технологій»
видається з 1938 року*

КИЇВ ✦ НУХТ ✦ 2020

ОТРИМАННЯ ПРАКТИЧНО ЦІННИХ СПОЛУК З ВИКОРИСТАННЯМ РЕКОМБІНАНТНИХ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. ЧАСТИНА 1: СИНТЕЗ ЕТАНОЛУ, БУТАНОЛУ ТА ІЗОБУТАНОЛУ

В. В. Потапенко, О. І. Скроцька

Національний університет харчових технологій

У пропонуваному огляді зроблено аналіз сучасної наукової літератури щодо отримання етанолу, бутанолу та ізобутанолу з використанням генетично модифікованих клітин *S. cerevisiae*.

Сучасні дослідження щодо можливості отримання біоетанолу за допомогою мікробного синтезу спрямовані на використання лігноцелюлозної сировини як поновлюваного джерела енергії, тому метою конструювання рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* є створення клітин, здатних споживати цукри лігноцелюлозних матеріалів. Оскільки *saccharomycети* не здатні катаболізувати ксилану, модифікацію дріжджів проводять, використовуючи такі гетерологічні шляхи, як ксиланоредуктазно-ксилітальдегідгидрогеназний або ксиланозізамерказний. Наступним завданням є створення штамів *S. cerevisiae*, здатних одночасно зброжджувати змішані цукри лігноцелюлозних матеріалів. У процесі попередньої обробки лігноцелюлозної сировини фізичними чи хімічними методами утворюється велика кількість токсичних сполук, які є інгібіторами мікробної ферментації, тому одним із завдань є конструювання *S. cerevisiae*, що будуть стійкими до однієї з цих інгібіторів.

Мікробіологічне виробництво бутанолу було одним з перших широкомасштабних промислових процесів глобального значення. Дослідження цього процесу, незважаючи на його столітню історію розвитку, продовжуються і нині. Природними продуцентами бутанолу є бактерії роду *Clostridium*. Через ряд недолків їх застосування у великій промисловій привабливості інші мікроорганізми, які широко використовуються у промислових масштабах, зокрема дріжджі *S. cerevisiae*.

Ізобутанол є біомативом наступного покоління. Це побічний продукт синтезу етанолу у *S. cerevisiae*. Для збільшення його синтезу створюють рекомбінантні штами дріжджів, використовуючи різні стратегії генетичної та метаболічної інженерії.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, рекомбінантні дріжджі, біоетанол, біобутанол, ізобутанол.

Постановка проблеми. Традиційні сфери використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* — це клібопечення, виноробство, пивоваріння, виробництво спирту, виготовлення квасу, отримання кормового білка та використання як добавки до кормів сільськогосподарських тварин [1—3]. З розвитком методів генної інженерії їх стали використовувати як експресійну платформу для отримання практично цінних сполук, зокрема спиртів, які можна використати як біопаливо [4—8].

Мікробіологічний синтез біопалива з використанням поновловальних джерел енергії є альтернативним нафтопереробним заводам. Хоч нафта і є одним із найбільш важливих джерел енергії, але її запаси не є невичерпними [9], тому розробка технологій поновлюваного й економічно вигідного біопалива є актуальним завданням сьогодення.

При розробці економічних процесів мікробної конверсії в промислових масштабах необхідно враховувати, що субстрати для мікробного синтезу повинні бути дешевими, екологічними і не конкурувати з продуктами харчування. Саме тому лігноцелюлозна сировина є найбільш перспективним поновлювальним джерелом, що відповідає вказаним вимогам [10]. Глюкоза і ксиліоза — найбільш поширені моносахариди у лігноцелюлозній біомасі. Незважаючи на те, що існує велика кількість бактерій і дріжджів, які здатні природним шляхом утилізувати ксиліозу [11—13], клітини *S. cerevisiae* мають ряд переваг — стійкість до високого осмотичного тиску, низьких значень рН, високих концентрацій спиртів та до дії інгібіторів лігноцелюлозних гідролізатів [14].

На сьогодні *S. cerevisiae* — це широко вивчена на клітинному та молекулярному рівні модельна еукаріотична система, при роботі з якою можна використовувати велику кількість доступних генетичних інструментів [15], тому метою проведеного огляду є аналіз сучасної наукової літератури останніх років щодо отримання етанолу, бутанолу та ізобутанолу з використанням генетично модифікованих клітин *S. cerevisiae*.

Викладення основних результатів дослідження. Етанол. Біоетанол є екологічно чистим автомобільним паливом, яке можна використовувати окремо або в суміші з бензином. Він має ряд переваг: високе октанове число, широкій температурний діапазон займання, нетоксичний, може легко розкладатись мікроорганізмами [16]. Використання сільськогосподарських культур як джерела для отримання біоетанолу на сьогодні не є актуальним, оскільки на цей процес витрачається велика кількість сировини, яку потрібно вирощувати на великих площах тривалий час. Тому лігноцелюлозна сировина, яка є відходами сільського господарства та деревопереробної промисловості, є перспективним поновлювальним джерелом для отримання біоетанолу [17].

Лігноцелюлоза складається з таких полісахаридів, як целюлоза і геміцелюлоза, а також ароматичного полімеру лігніну. Для ефективного використання лігноцелюлози необхідне швидке та повне споживання її цукрів, тобто має відбуватись біоконверсія ксилану, ксилітолігосукрів і целюлози. Зазвичай, ксилан геміцелюлози розщеплюється на ксилітолігосукри ендо- β -ксиліаназою, після чого β -ксиліаніаза розкладає ксилітолігосукри до ксиліози [18]. Для того, щоб у процесі біосинтезу отримати високі концентрації етанолу, дріжджі *S. cerevisiae* повинні використовувати всі цукри, що містяться в середовищі. Проте проблема полягає в тому, що сахароміцети не здатні споживати ксиліозу [19].

Для здійснення катаболізму ксиліози клітини *S. cerevisiae* модифікують, використовуючи такі гетерологічні шляхи, як ксилізоредуктазно-ксилітолдегідрогеназний (КР-КДР) або ксилізоізомеразний (КІ) [20]. При використанні шляху КР-КДР спостерігається окисно-відновний дисбаланс, оскільки відновлення ксиліози до ксилітолу каталізується за допомогою ксилізоредуктази з використанням NADPH, а окислення ксилітолу в ксилітозу каталізується ксилітолдегідрогеназою з використанням NAD⁺, що призводить до накопичення ксилітолу та зменшення концентрації етанолу. З іншого боку, проміжний продукт не утворюється

при використанні KI шляху, оскільки ксиліоза безпосередньо метаболізується в ксилулозу, але швидкість споживання ксиліози в рекомбінантних штамів, що мають шлях KI, значно нижча, ніж у штамів зі шляхом KP-KDP [21].

Використовуючи гетерологічний шлях KP-KDP, було модифіковано ряд сахароміцетів. Лі зі співавт. виділили з *Oryzomyces* sp. та *Penicillia lamiiicola* ген β -ксилозидази й експресували у *S. cerevisiae* Alpha25, що дало змогу одержати на середовищі з ксиліозою 13 г/л етанолу [22]. Із *Penicillium oxalicum* був виділений ген β -ксилозидази (*xyl3A*). Цей фермент перетворює ксилоолігосахариди в ксилузу з подальшим утворенням етанолу на лігноцелюлозних відходах. У результаті генетичної модифікації геном *xyl3A* *S. cerevisiae* були отримані рекомбінантні штами BSPX042, BSGO, BSGBX, BSGMBX, BSGIBX, BSGPBX, BSGSBX. Найвища концентрація етанолу спостерігалась при культивуванні штаму *S. cerevisiae* BSGIBX [23].

Триває пошук нових джерел генів ксилозоізомераз, які можна було б інтегрувати в геном дріжджів. Використовуючи гени KI *Reticulitermes flavipes*, які було виділено з термітів, дослідники створили рекомбінантні дріжджі *S. cerevisiae* WR311. Штам характеризується підвищеною здатністю до утилізації ксиліози [24].

Конструювання дріжджів, які здатні одночасно збродажувати змішані цукри лігноцелюлозних матеріалів, є основним завданням при оптимізації виробництва біоетанолу. Wang зі співавт. створили штам *S. cerevisiae* BSW4XA3, здатний до одночасного споживання D-глюкози, D-ксилози і L-арабінози. Сконструйований штам характеризувався підвищеним споживанням змішаних цукрів і виходом етанолу під час культивування [25].

При культивуванні дріжджів на середовищі з ксиліозою і глюкозою споживання ксиліози розпочинається лише після повного катаболізму глюкози. Тому при конструюванні рекомбінантних дріжджів, у яких функціонує гетерологічний шлях KI, необхідно вдосконалити систему поглинання і катаболізму ксиліози за одночасної наявності глюкози в середовищі культивування. Нещодавно створено штам *S. cerevisiae* CW9, в клітині якого інтегровано гени ксилозоізомераз разом із білками гексозних транспортерів. У результаті культивування цього штаму вихід етанолу становив 90% від теоретично розрахованого [26].

При ферментативному гідролізі целюлози утворюється целобіоза — дисахарид глюкози. Для на целобіозу β -глюкозидази призводить до вивільнення глюкози, яка спричиняє катаболітну репресію ксиліози в процесі культивування [27]. Природні штами *S. cerevisiae* не збродажують целобіозу. Існують також два підходи до конструювання дріжджів, які будуть здатні засвоювати целобіозу. Перший — експресія гетерологічних генів, що кодують транспортер целобіози і β -глюкозидази, яка каталізує гідроліз целобіози до двох молекул глюкози, що далі фосфорилуються до глюкозо-6-фосфату. Другий — скоординована експресія транспортера целобіози і целобіозофосфорилази, яка використовує неорганічний фосфат для гідролізу целобіози, при цьому утворюється глюкоза і глюкозо-1-фосфат [28]. Американськими вченими створено штам *S. cerevisiae* BF3645, в якому функціонують гени ксилозоізомераз, двох транспортерів целобіози і целобіозофосфорилази, за допомогою яких цей штам здатний до коферментації ксиліози і целобіози з утворенням етанолу в анаеробних умовах [29].

Ведуться роботи з конструювання сахароміцетів не лише з високим метаболічним потенціалом для ферментації ксиліози, а й з високою стійкістю до дії

інгібіторів (органічні кислоти, фурани, феноли тощо), що наявні в лігноцелюлозних гідролізатах. Так, сконструйовано штамп *S. cerevisiae* NAPX37, який може швидко метаболізувати ксилозу у високим концентраціях (75 г/л) під час періодичного та безперервного культивування. Клітини цього штаму стійкі до дії оцтової, мурашиної та левулінової кислот, що наявні в лігноцелюлозних гідролізатах [30].

У табл. 1 наведено узагальнену інформацію щодо рекомбінантних штамів *S. cerevisiae*, які здатні синтезувати етанол, використовуючи як джерела вуглецю різні цукри лігноцелюлозної сировини.

Таблиця 1. Синтез етанолу рекомбінантними штамми *Saccharomyces cerevisiae*

Штам	Експресовані гени	Джерело вуглецю	Тривалість культивування, год	Вихід етанолу, г/л у кві	Концентрація етанолу, г/л	Джерело
1	2	3	4	5	6	7
BSW4XA3	D-ксилозоізомераз (XZ), D-ксилозоредуктази (XR), ксилітодегідрогенази (XDH), ксилулокінази (XK)	D-глюкоза, D-ксилоза, L-арабіноза	120	0,35	12	[25]
Alpha25	β-ксилозидази (xylA)	Ксилроза	48	0,31	13	[22]
NAPX37	Ксилоредуктази (XYL1), ксилітодегідрогенази (XYL2), ксилулокінази (XKS1), β-глюкозидази (BGL1)	Ксилроза, глюкоза	36	0,39	13,5	[30]
YKH1114	D-ксилозоізомераз (XZ), D-ксилулокінази (XK)	D-ксилоза	91	0,04	13,6	[31]
BP10001	Ксилоредуктази (XR), ксилітодегідрогенази (XDH), ксилулокінази (XK)	Ксилроза	120	0,35	14	[32]
DLG-K1T7 (HKT7)	Ксилоредуктази (XYL1), ксилітодегідрогенази (XYL2), ксилулокінази (XKS1)	Глюкоза, ксилроза	36	0,38	15	[33]
39a (Bvu)	Ксилосоізомераз (XZ)	Ксилроза	24	0,36	16,7	[34]
SyBE003	Ксилосоізомераз (xylA), ксилулокінази (XKS1)	Ксилроза	36	0,43	18	[35]
BSGIBX	Ксилосоізомераз (Xp-xylA) та β-ксилозидази (xyl3A)	Глюкоза, ксилроза	48	0,47	19,4	[23]
WB311	Ксилосоізомераз (XZ)	ксилроза	72	0,40	21	[24]
K7-XYL	Альдозоредуктази (GRE1), сорбітодегідрогенази (SOR1), ксилулокінази (XKS1)	Ксилроза	72	0,37	37,6	[36]
BF3645	Ксилосоізомераз (XZ), целобіозофосфорилнази (FD-1), ксилулокінази (XKS1)	Глюкоза, ксилроза, целобіоза	96	0,44	48,6	[29]
CW9	Ксилосоізомераз (XZ)	Глюкоза, ксилроза	72	0,45	54	[26]

При використанні лігноцелюлози як субстрату для виробництва бутанолу виникає необхідність її попередньої обробки з метою руйнування щільної структури й опукрювання. Для цього використовують фізичні, хімічні та біологічні методи. У процесі попередньої обробки лігноцелюлозної сировини фізичними чи хімічними методами утворюється велика кількість токсичних сполук, які є інгібіторами мікробної ферментації [37]. При цьому дріжджі *S. cerevisiae* є стійкими до токсичної дії інгібіторів, що утворюються при попередній обробці лігноцелюлозної сировини парово [38].

Створено штамп *S. cerevisiae* D5A^{III}, в клітини якого введено ген ксилозоізомерази *Bacteroides thetaioamicron*. Ці сахароміцети здатні використовувати як субстрати для синтезу етанолу попередньо оброблену парово солому трипикале та макуху солодкого сорго. При вказаному способі обробки утворюються такі токсичні для клітин побічні продукти, як оцтова кислота, фурфурол та 5-гідроксиметилфурфурол. Клітини штаму D5A^{III} є стійкими до цих інгібіторів [39].

S. cerevisiae XUSEA синтезує рекомбінантну ксилоізомеразу, що опосередковує одностадійну реакцію ізомеризації, в якій ксилоза перетворюється в ксилулозу. Також вказаний штамп здатний до коферментації глюкози і ксилози. Показано, що при підвищенні температури культивування *S. cerevisiae* XUSEA на середовищі з гідролізатом міскантусу з 30 до 33°C швидкість споживання ксилози збільшується на 44%, а синтез етанолу — на 23%, що призводить до виходу етанолу 0,48 г/г цукрів [40].

Рекомбінантні клітини *S. cerevisiae* STXQ також здатні до коферментації глюкози і ксилози. При культивуванні цього штаму на середовищі з гідролізатом пустих залишків пальмових фруктів без процесу детоксикації для видалення інгібіторів спостерігали споживання цукрів на рівні 94%. При цьому вихід етанолу склав 0,42 г/г цукрів [41].

У рекомбінантних дріжджах при використанні пшаву КР-КДР спостерігається окисно-відновний дисбаланс, що призводить до накопичення кснїтолу та зменшення концентрації етанолу. Тому в клітині *S. cerevisiae* JX123_{дохЕ} був введений ген NADH-оксидази *Lactococcus lactis*. У результаті синтез побічного продукту кснїтолу при культивуванні цього штаму на середовищі з гідролізатом міскантусу зменшився на 48%, а вихід етанолу становив 0,43 г/г цукрів [4].

Гідролізати лігноцелюлозної сировини, крім ксилози, містять у великій кількості арабінозу. Тому з метою синтезу етанолу на лігноцелюлозних субстратах сконструйовано штамп *S. cerevisiae* 36a51.10.4. Ці дріжджові клітини містять гени *Lactobacillus plantarum*, що кодують ферменти утилізації арабінози, а також гени ксилозоізомерази. Показано здатність клітин штаму 36a51.10.4 до одночасного споживання глюкози і ксилози та до продукції етанолу у високій концентрації на лігноцелюлозних гідролізатах [5].

Узагальнену інформацію щодо можливості культивування рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* на середовищі із різними гідролізатами лігноцелюлозної сировини з метою отримання етанолу наведено у табл. 2.

Таблиця 2. Гідролізати лігноцелюлозної сировини як субстрати для синтезу етанолу модифікованими дріжджами *Saccharomyces cerevisiae*

Штам	Лігноцелюлозна сировина	Тривалість культивування, год	Концентрація етанолу, г/л	Джерело
DSA TM	Макуха солодного сорго	150	19,2	[39]
BADE ₁	Солома кукурудзи	48	26,1	[42]
STXQ	Пусті залишки пальмових фруктів	72	28,4	[41]
XUSEA	Міскагус	48	30,1	[40]
36aS1.10.4	Пусті залишки пальмових фруктів	72	50,3	[5]
	Солома пшениці	48	54,1	
IX123_poxE	Міскагус	48	55,5	[4]

Бутанол. Порівняно з етанолом бутанол має ряд переваг: вища температура кипіння, менша гіроскопічність, менша корозійна активність, більш високе осмотичне число. Також слід відзначити, що використання бензину, змішаного з бутанолом, призводить до зменшення викидів вихлопних газів [43].

Природними продуцентами бутанолу є бактерії роду *Clostridium*. Недоліком їх використання є низька швидкість росту, утворення спор, низька стійкість до бутанолу, утворення побічних продуктів, також ці бактерії є строгими анаеробами. Тому увагу дослідників привертають інші мікроорганізми, які широко використовуються в промислових масштабах, зокрема дріжджі *S. cerevisiae* (табл. 3). При конструюванні шляхів до продукції бутанолу рекомбінантних клітин *S. cerevisiae* найчастіше використовують дві стратегії: гетерологічна експресія генів *Clostridium* або поглинання амінокислот [44].

Таблиця 3. Генетично модифіковані штамми *Saccharomyces cerevisiae* — продуценти бутанолу

Штам	Шлях синтезу бутанолу	Тривалість культивування, год	Концентрація бутанолу, мг/л	Джерело
VSY10	Зворотне β-окислення (шлях ацетил-CoA)	74	130	[45]
COM	Синтез трионіну (треоніновий і піримідиновий)	96	835	[46]
W303-1A	Два паралельні шляхи (гетерологічний шлях експресії генів <i>Clostridium</i> і ендогенний за рахунок делеції гену алкогольдегідрогенази (<i>ADH1</i>))	312	2400	[6]

Видільним субстратом бутанольного шляху є ацетил-кофермент А (ацетил-CoA), а більшість проміжних продуктів пов'язана з коферментом А (CoA). Тому у штамі *S. cerevisiae* VSY10 збільшено синтез CoA за рахунок надекспресії гену пантотенаткінази (*coaA*) *Escherichia coli*. А шляхом делеції генів алкогольдегідрогенази (*ADH1-5*) і гліцерол-3-фосфатдегідрогенази (*GPD2*) вдалось збільшити доступність ацетальдегіду і NADH як рушійних факторів для шляху бутанолу [45].

Ключовий проміжний продукт ендогенного шляху синтезу бутанолу α-кето-бутират може бути синтезований шляхом катаболізму треоніну. Іншим способом

отримання α -кетобутирату є шлях від пірувату й ацетил-КоА через цитрамалат-синтазу. Використовуючи методи метаболічної інженерії, створено штамп *S. cerevisiae* COM, у клітинах якого оптимізовано синергічний шлях синтезу бутанолу — шлях ендogenousного треоніну, і введений шлях цитрамалату. При цьому синтез бутанолу збільшився в 7 разів порівняно з вихідним немодифікованим штамом дріждзів [46].

При дослідженні шляхів синтезу бутанолу рекомбінантним штамом *S. cerevisiae* W303-1A була висунута гіпотеза про те, що гліцерин перетворюється в гліоксимац, який далі конденсується з бутирил-КоА в 3-етилмалат. Після чого 3-етилмалат перетворюється в α -кетовалерат, а потім у бутанол. Використання α -кетовалерата як попередника в середовищі для культивування дріждзів призвело до збільшення концентрації бутанолу [6].

Ізобутанол. Цей спирт вважають біопаливом наступного покоління, який може замінити дизельне паливо. Нині проводяться дослідження використання ізобутанолу в суміші з дизельним паливом. При цьому спостерігають збільшення термічного ККД гальм на 3% та зменшення викидів продуктів горіння (оксиди азоту, чадний газ) на 60% [47].

Основні реакції для отримання ізобутанолу включають синтез 2-кетозовалерату, що є проміжним продуктом біосинтезу валіну в мітохондріях і його подальше перетворення в ізобутанол через шлях Ерліха в цитоплазмі. Тобто ізобутанол є побічним продуктом синтезу валіну в *S. cerevisiae*. Для збільшення синтезу ізобутанолу конструюють рекомбінантні штамми дріждзів (табл. 4), використовуючи при цьому такі шляхи: переміщення ферментів, що відповідають за продукцію ізобутанолу в один і той же внутрішньоклітинний компартмент; видалення конкурентного шляху для направлення потоку до побічних продуктів; усунення дисбалансу кофакторів [48].

Таблиця 4. Синтез ізобутанолу штамми *Saccharomyces cerevisiae*

Рекомбінантний штамп	Тривалість культивування, год	Вихід ізобутанолу, мг/г глюкози	Концентрація ізобутанолу, мг/л	Джерело
YTD306	120	6,6	143	[49]
JHY433	120	15	377	[30]
Isoy8	90	15	630	[31]
BSW205	24	16	1620	[7]
LWY23	96	39,55	2090	[8]

Рекомбінантний штамп *S. cerevisiae* Isoy8 модифікований таким чином, що в дріждзювих клітинах ферменти біосинтезу валіну функціонують не в мітохондріях, а в цитоплазмі. При цьому збільшення синтезу ізобутанолу спостерігалось при відсутності валіну і в середовищі культивування [49].

У клітині *S. cerevisiae* YTD306 введено гени декарбоксілази 2-кетокислот і алкогольдегідрогенази для посилення ендogenousної активності шляху Ерліха. Також введено ген *Lv2*, що каталізує першу стадію синтезу валіну і видалено ген піруватдекарбоксілази. В результаті був збільшений синтез ізобутанолу модифікованими клітинами в 13 разів [47].

Блокуючи шляхи біосинтезу 2,3-бутандіолу, пантотенату, лейцину і ізолейцину, дослідники оптимізували й збільшили метаболічний потік у бік синтезу ізобутанолу в *S. cerevisiae* LWY04. В клітинах штаму LWY19 збільшено синтез ізобутанолу за рахунок пригнічення реакцій поглинання пірувату й регенерації

NAD⁺ у шляхах біосинтезу етанолу та гліцерину. Синтез ізомасляної кислоти з ізобутиральдегіду також конкурує з продукцією ізобутанолу. Тому в *S. cerevisiae* LWY23 видалено ген *Adb*, що кодує синтез альдегіддегідрогенази, при цьому спостерігається зменшення синтезу ізомасляної кислоти на 80% та збільшення синтезу ізобутанолу на 40% [8].

Висновки

Отже, при конструюванні рекомбінантних клітин *S. cerevisiae* використовують різні підходи, щоб збільшити концентрацію і вихід цільового продукту, створити стійкі до дії інгібіторів штамп, а також розширити діапазон споживання субстрату. Перспективним є створення драйвжових продуцентів етанолу, що можуть використовувати лігноцелюлозну сировину. Оскільки природні штами *S. cerevisiae* не здатні до споживання ксилози, використовують кілька генетичних стратегій для конструювання сахароміцетів, які можна культивувати на середовищах з цим джерелом вуглецю. Ведуться роботи зі створення рекомбінантних *S. cerevisiae*, які здатні синтезувати бутанол, але, порівняно з бактеріальними системами експресії, гетерологічний синтез цього виду палива у сахароміцетів є дуже низьким. Оскільки ізобутанол може стати біопаливом наступного покоління, яке можна отримувати за допомогою мікроорганізмів, ведуться дослідження з генетичної модифікації *S. cerevisiae* з метою отримання високих концентрацій вказаного продукту.

Література

1. Alfonso A., Francesca N., Matrasia M., Craparo V., Naselli V., Mercurio V., Moschetti G. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to racemes of Grillo grape variety. *FEMS Microbiol Lett* 2020, 367(12): fnaa079. doi: 10.1093/femsle/fnaa079.
2. Pauley M., Maskell D. Mini-review: the role of *Saccharomyces cerevisiae* in the production of gin and vodka. *Beverages*. 2017, 3: 13. doi: 10.3390/beverages3010013.
3. Elshamoud M., Tan Z., Abu Hafsa S., Adesheye M., Grainer R., Urborn E., Cedillo Monroy J., Salem A. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. *J. Appl. Microbiol* 2020, 128: 658—674. doi: 10.1111/jam.14416.
4. Lee Y. G., Jin Y. S., Cha Y. L., Seo J. H. Bioethanol production from cellulosic hydrolyzates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol* 2017, 228: 355—361. doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.042.
5. Huzang S., Liu T., Peng B., Gang A. Enhanced ethanol production from industrial lignocellulose hydrolyzates by a hydrolyzate-cofermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioprocess Biosyst Eng* 2019, 42(5): 883—896. doi: 10.1007/s00449-019-02090-0.
6. Swaidah R., Ogunlabi O., Grant C. M., Ashe M. P. n-Butanol production in *S. cerevisiae*: coordinate use of endogenous and exogenous pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 2018, 102(22): 9857—9866. doi: 10.1007/s00253-018-9305-x.
7. Matsuda F., Ishii J., Kondo T., Ida K., Tamaka H., Kondo A. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance. *Microb. Cell* 2013, 12: 119. doi: 10.1186/1475-2875-12-119.
8. Weiss J., Brinsk M., Boles E. Improving isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by successively blocking competing metabolic pathways as well as ethanol and glycerol formation. *Biotechnol Biofuels* 2019, 12(1): 173. doi: 10.1186/s13068-019-1485-8.
9. Norouzi N., Fani M., Ziarani Z. K. The fall of oil age: a scenario planning approach over the last peak oil of human history by 2040. *J. Petrol. Sci. Eng* 2020, 188: 106827. doi: 10.1016/j.petrol.2019.106827.
10. Ko J. K., Lee J. H., Jung J. H., Lee S.-M. Recent advances and future directions in plant and yeast engineering to improve lignocellulosic biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev* 2020, 134: 110390. doi: 10.1016/j.rser.2020.110390.

11. Xin F., Chen T., Jiang Y., Dong W., Zhang W., Zhang M., Wu H., Ma J., Jiang M. Strategies for improved isopropanol-butanol production by a *Clostridium* strain from glucose and hemicellulose through consolidated bioprocessing. *Biotechnol. Biofuels*. 2017, 10. doi: 10.1186/s13068-017-0805-1.
12. Rodruamees N., Lertwattanasakul N., Hirata K., Supravosai, Limtonz S., Kosaka T., Yamada M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 90: 1573—1586. doi: 10.1007/s00253-011-3218-2.
13. Kostas E. T., White D. A., Du C., Cook D. J. Selection of yeast strains for bioethanol production from UK seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 2016, 28: 1427—1441. doi: 10.1007/s10811-015-0633-2.
14. Anusukaree C., Damnongsawad A., Kruatrachue M., Pookhitiyook P., Boonchird C., Kaneko Y., Harashima S. Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Genet.* 2009, 50: 301-310. doi: 10.1007/BF03195688.
15. Lima J., Mishra S., Zhao H. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: new tools and their applications. *Metab. Eng.* 2018, 50: 85—108. doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.011.
16. Azhar S. H. M., Abdulla R., Jambo S. A., Marbawi H., Gansau J. A., Faik A. A. M., Rodrigues K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. *Biochem. Biophys. Rep.* 2017, 10: 52—61. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.03.003.
17. Parapoulis M., Vasileiadis A., Afendra A. S., Hatziloukas E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol.* 2020, 6(1): 1. doi: 10.3934/microbiol.2020001.
18. Li H., Shen Y., Wu M., Hou J., Jiao C., Li Z., Liu X., Bao X. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production. *Bioresour. Bioprocess.* 2016, 3(1): 51. doi: 10.1186/s40643-016-0126-4.
19. Cheng C., Tang R. Q., Xiong L., Hector R. E., Bai F. W., Zhao X. Q. Association of improved oxidative stress tolerance and alleviation of glucose repression with superior xylose-utilization capability by a natural isolate of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*. 2018, 11(1): 1—19. doi: 10.1186/s13068-018-1018-y.
20. Hoang P. T. N., Ko J. K., Gong G., Um Y., Lee S. M. Genomic and phenotypic characterization of a refactored xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain for lignocellulosic biofuel production. *Biotechnol. Biofuels*. 2018, 11: 268. doi: 10.1186/s13068-018-1269-7.
21. Denoska M. M., Dietz H., Li Y., Foulquis-Moreno M.R., Muttari S., Deprez S., Abt T. D., Bonini B. M., Lidza G., Dumortier F., Varghaeta A., Boles E., Thevelein J. M. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol. Biofuels*. 2013, 6: 89. doi: 10.1186/1754-6834-6-89.
22. Li Y. C., Xie C. Y., Yang B. X., Tang Y. Q., Wu B., Sun Z. Y., Xia, Z. Y. Comparative transcriptome analysis of recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains with different xylose utilization pathways. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019, 189: 1007—1019. doi: 10.1007/s12010-019-03060-8.
23. Nim Y., Wu L., Shen Y., Zhao J., Zhang J., Yi Y., Bao X. Coexpression of β -xylosidase and xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of saccharification and fermentation from xylo-oligosaccharides. *Cellulose*. 2019, 26: 7923-7937. doi: 10.1007/s10370-019-02650-3.
24. Katahira S., Muramoto N., Moriya S., Nagura R., Tada N., Yasutani N., Tekuhira K. Screening and evolution of a novel protist xylose isomerase from the termite *Reticulitermes speratus* for efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*. 2017, 10: 203. doi: 10.1186/s13068-017-0890-1.
25. Wang C., Zhao J., Qin C., Wang S., Shen Y., Du B., Bao X. Coutilization of d-glucose, d-xylose, and l-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae* by coexpressing the metabolic pathways and evolutionary engineering. *BioMed Res. Int.* 2017: 5318232. doi: 10.1155/2017/5318232.
26. Zhang M., Fan W. J., Wang J. Y., Cao L. M. Optimized xylose isomerase uptake and expression level in *Saccharomyces cerevisiae* for improving ethanol production. *Appl. Environ. Biotechnol.* 2018, 3(1): 47—52. doi: 10.26789/AEB.2018.01.007.
27. Li S., Du J., Sun J., Galaska J. M., Glass N. L., Cate J. H., Yang X., Zhao H. Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a β -

glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biocyst.* 2010, 6(11): 2129—2132. doi: 10.1039/c0mb00063a

28. Sadie C. J., Rose S. H., Den Haan R., Van Zyl W. H. Coexpression of a cellobiose phosphorylase and lactose permease enables intracellular cellobiose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 90(4): 1373—1380. doi: 10.1007/s00253-011-3164-z

29. Aeling K. A., Salmon K. A., Laplaza J. M., Li L., Headman J. R., Hutagalung A. H., Picataggio S. Co-fermentation of xylose and cellobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.* 2012, 39(11): 1597—1604. doi: 10.1007/s10295-012-1169-y

30. Li Y. C., Mitromasa K., Gou Z. X., Gou M., Tang Y. Q., Li G. Y., Kida K. Xylose fermentation efficiency and inhibitor tolerance of the recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain NAPX37. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100(3): 1531—1542. doi: 10.1007/s00253-015-7167-z

31. Hector R. E., Dias B. S., Cotta M. A., Mariens J. A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. *Biotechnol. Biofuels.* 2013, 6(1): 84. doi: 10.1186/1754-6834-6-84

32. Klimacek M., Kiri E., Kráňalac S., Longas K., Novy V., Nidetzky B. Stepwise metabolic adaption from pure metabolization to balanced anaerobic growth on xylose explored for recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 2014, 13(1): 37. doi: 10.1186/1475-2875-13-37

33. Goncalves D. L., Matsushika A., Beltra B., Goshima T., Bon E. P., Stambok B.U. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzyme Microb. Technol.* 2014, 63: 13-20. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.05.003

34. Peng B., Huang S., Liu T., Gong A. Bacterial xylose isomerases from the mammal gut Bacteroidetes cluster function in *Saccharomyces cerevisiae* for effective xylose fermentation. *Microb. Cell Fact.* 2015, 14: 70. doi: 10.1186/s12934-015-0253-1

35. Qi X., Zha J., Liu G. G., Zhang W., Li B. Z., Yuan Y. J. Heterologous xylose isomerase pathway and evolutionary engineering improve xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 2015, 6: 1165. doi: 10.3389/fmicb.2015.01165

36. Kouishi J., Fukuda A., Mutaguchi K., Uemura T. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes. *Biotechnol. Lett.* 2015, 37(8): 1623—1630. doi: 10.1007/s10529-015-1840-2

37. Сапогова О. И., Папорт Т. П., Сапоговский С. О. Лизосомальные сахаразы из сапролеги для ферментации биомассы крахмалом. *Научное сообщество ВШНТ.* 2019, 25(1): 16—32. doi: 10.24263/2225-2924-2019-25-1-4

38. Almeida J., Modig T., Petersson A., Hahn-Hagerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund M. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007, 82: 340—349. doi: 10.1002/jctb.1676

39. Smith J., van Rensburg E., Gorgens J. F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. *BMC Biotechnol.* 2014, 14: 41. doi: 10.1186/1472-6750-14-41

40. Tran P. H. N., Ko J. K., Gong G., Um Y., Lee S. M. Improved simultaneous co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery. *Biotechnol. Biofuels.* 2010, 13: 12. doi: 10.1186/13068-019-1641-2

41. Liu T., Huang S., Gong A. Recombinant diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain development for rapid glucose and xylose co-fermentation. *Fermentation.* 2016, 4(3): 59. doi: 10.3390/fermentation4030059

42. Zhang M. M., Xiong L., Tang Y. J., Mahmood M. A., Zhao Z. K., Bai F. W., Zhao X. Q. Enhanced acetic acid stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating expression of the de novo purine biosynthesis genes. *Biotechnol. Biofuels.* 2019, 12: 116. doi: 10.1186/s13068-019-1456-1

43. Nawab S., Wani N., Ma X., Huo Y. X. Genetic engineering of non-native hosts for 1-butanol production and its challenges: a review. *Microb. Cell Fact.* 2020, 19: 79. doi: 10.1186/s12934-020-01337-w

44. Azambuja S. P. H., Goldbeck R. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: perspectives, strategies and challenges. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2020, 36: 48. doi: 10.1007/s11274-020-02828-z

45. Schadeberg V., Boles E. n-Butanol production in *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the availability of coenzyme A and cytosolic acetyl-CoA. *Biotechnol. Biofuels*. 2016, 9: 44. doi: 10.1186/s13068-016-0456-7.
46. Shi S., Si T., Liu Z., Zhang H., Ang E. L., Zhao H. Metabolic engineering of a synergistic pathway for n-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 2016, 6: 25675. doi: 10.1038/srep25675.
47. Ashok B., Nanthagopal K., Saravanan B., Anad K., Patel D., Sudarshan B., Ramasamy R. A. Study on isobutanol and *Calophyllum inophyllum* biodiesel as a partial replacement in CI engine applications. *Fuel*. 2019, 235: 984—994. doi: 10.1016/j.fuel.2018.08.087.
48. Kuroda K., Ueda M. Cellular and molecular engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biobutanol production. *FEBS Microbiol. Lett.* 2016, 363 (3): fmv247. doi: 10.1093/femsl/fmv247.
49. Kondo T., Teruka H., Ishii J., Matsuda F., Ogino C., Kondo A. Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 2012, 159(1—2): 32—37. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.01.022.
50. Park S. H., Kim S., Hahn J. S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98(21): 9139—9147. doi: 10.1007/s00253-014-6081-0.
51. Birt D., Weber C., Lorenzen W. Cytosolic re-localization and optimization of valine synthesis and catabolism enables increased isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*. 2012, 5: 65. doi: 10.1186/1754-6834-5-65.



Министерство образования Республики Беларусь

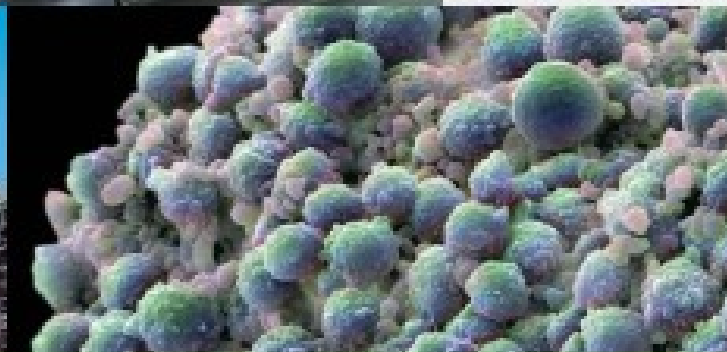
Учреждение образования «БЕЛОРУССКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»



Международная научно-техническая конференция
молодых ученых

«Инновационные материалы и технологии – 2020»

г. Минск, Республика Беларусь
09-10 января 2020 г.



International Scientific and Technical Conference of Young Scientists “Innovation Materials and Technologies”

January 09-10, 2020
Minsk, Republic of Belarus

СИНТЕЗ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДРОЖЖАМИ РОДА *SACCHAROMYCES*

В настоящее время активно развивается использование наночастиц в различных областях: частности в медицине, физике, химии, биологии и электронике. Наночастицы имеют лучшие физико-химические свойства, по сравнению с обычными металлами. Получение наночастиц традиционно осуществляют с помощью химических и физических методов, которые имеют существенные недостатки, а именно – использование токсичных веществ и большую энергозатратность. Поэтому, целесообразно создание альтернативных экономически дешевых и безопасных методов такого синтеза.

Альтернативой для физических и химических методов получения наночастиц служат биологические методы, предусматривающие использование вирусов, бактерий, дрожжей, водорослей, грибов и растений. Наиболее привлекательным источником для биогенного синтеза являются микроорганизмы, которые способны продуцировать наночастицы как внеклеточно, так и внутриклеточно. Однако, внеклеточный синтез более простой и не требует дополнительной стадии очистки полученных соединений.

В настоящее время существует проблема нехватки эффективных противомикробных средств, поскольку патогены быстро адаптируются к действию антибиотиков. Так, были созданы противомикробные средства на основе наночастиц серебра (Ag), которые являются перспективными для профилактики и лечения бактериальных и грибковых инфекций. Наночастицы негативно влияют на микроорганизмы путем разрушения клеточной мембраны, инактивации ферментов, вмешательством в систему транспорта электронов и т.д. Поэтому, токсическое действие наночастиц Ag (10 и 80 нм), покрытых цитратом для отрицательного поверхностного заряда или полиэтиленгликолем для положительного поверхностного заряда было исследовано на *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. Оценка токсичности обнаружила, что действие наночастиц Ag зависит от размера и поверхностного заряда. Наночастицы размером 10 нм более сильнодействующие, чем те, которые имеют размер 80 нм, и в той же категории размеров положительно заряженные частицы имели большее ингибирующее действие, чем отрицательно заряженные [1].

Для микробного синтеза наночастиц перспективным является использование дрожжей рода *Saccharomyces*, которые менее чувствительны к действию токсичных наночастиц и способны к восстановлению ионов серебра и стабилизации коллоидных частиц в среде. Так, биосинтез наночастиц серебра (AgNP) осуществляли с помощью бесклеточного супернатанта *S. boulardii* с добавлением AgNO₃ в концентрации 10 мМ. Полученные наночастицы обладали способностью подавлять грамположительные и грамотрицательные бактерии. Наибольшие зоны задержки роста с концентрацией 150 мкг/мл биогенных AgNP наблюдались у *Pseudomonas aeruginosa* – 29 мм и *Staphylococcus pyogenes* – 29 мм по сравнению с коммерческими наночастицами той же концентрации (*P. aeruginosa* – 15 мм, *S. aureus* – 16 мм) [2]. Также было исследовано антимикробное действие AgNP, полученных с помощью *S. cerevisiae* PTCC 5052, на чувствительные и резистентные к флуконазолу штаммы *Candida albicans*. Установлено, что минимальная ингибирующая концентрация AgNP против чувствительных к флуконазолу и устойчивых штаммов *C. albicans* лежит в диапазоне значений 2-4 мкг / мл [3].

Микробный синтез наночастиц является перспективным по сравнению с традиционными методами. Однако, наночастицы могут негативно влиять на биопроцесс, поскольку являются полидисперсными и обладают различными поверхностными зарядами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kasemets K., Kaosaar S., Vija H., Fascio U., Mantecca P. Toxicity of differently sized and charged silver nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741: a nano-bio interaction perspective. *Nanotoxicology*, (just-accepted). 2019, 1-40. doi: 10.1080/17435390.2019.1621401.
2. Sahib F.H., Aldujaili N.H., Alrufae M.M. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces boulardii* and study their biological activities. *Eur. J. Pharm. Med. Res.* 2017, 4(9), 65-74.
3. Niknejad F., Nabili M., Ghazvini R.D., Moazeni M. Green synthesis of silver nanoparticles: advantages of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Curr. Med. Mycol.* 2015, 1(3), 17. doi: 10.18869/acadpub.cmm.1.3.17.

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА АПТЕЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**



**Матеріали
IV Міжнародної науково-практичної
дистанційної конференції**

**СУЧАСНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ
ЕКСТЕМПОРАЛЬНИХ АЛОПАТИЧНИХ,
ГОМЕОПАТИЧНИХ ТА КОСМЕТИЧНИХ
ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
(20 березня 2020 року)**

ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ

ХАРКІВ 2020

УДК 579.61

**МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ САХАРОМЦЕТІВ ДЛЯ
ОТРИМАННЯ АНТИТРОМБІНУ*****Поталенко В.В.*****Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна**

Утворення тромбів може призвести до зупинки кровоточу, що призводить до летального наслідку. В організмі є кілька механізмів контролю та регулювання згортання крові, зокрема пряма інактивація активованих факторів згортання сериною протеазою. У крові присутні різні інгібітори сериної протеази, і їх кількість сягає 10% від загального білка плазми. Серед них є плазмовий глікопротеїн антитромбін, що є важливим фізіологічним контролером різних факторів згортання крові. Інактивація тромбіну в природних фізіологічних умовах проходить повільно, але швидкість утворення комплексу сильно зростає за рахунок активності кофактора гепарину. Зважаючи на те, що антитромбін є одним з основних природних інгібіторів згортання крові, набутий або спадковий дефіцит цього білка призводить до надмірної генерації тромбіну. Так, антитромбін широко застосовується у світі для лікування венозного тромбозу та легеневої емболії з набутою або успадкованою пониженою активністю цього глікопротеїну. Тому, в таких випадках є необхідним введення в організм чистого антитромбіну.

Антитромбін отримують шляхом фракціонування плазми донорної крові. Використання препаратів крові має недоліки, оскільки існує ризик вірусної інфекції, яку неможливо повністю виключити за допомогою сучасних методик. Тому нині актуальним є розробка технологій отримання антитромбіну з використанням технологій генної інженерії. На сьогодні антитромбін можна отримувати за допомогою рекомбінантних дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), бактерій (*Escherichia coli*), клітин комах (*Sporoptera frugiperda*), а також перещеплених клітин вищих еукаріот. Використання рекомбінантних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* в якості продуцента для отримання рекомбінантних білків має ряд переваг, зокрема швидкий ріст, а також наявність посттрансляційних модифікацій синтезуємих білків. Так, Mallu зі співавтор. (2016) був створений рекомбінантний штамп *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, за допомогою якого в ході 84 годин культивування було отримано 312 мг/л антитромбіну на суміші галактози та рафінози. В свою чергу, модифікований штамп *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (Mallu зі співавтор., 2015) синтезував 38,97 мг/мл антитромбіну на середовищі з рафінозою та глутаміновою кислотою.

Отже, використання рекомбінантних штамів *Saccharomyces cerevisiae* в якості продуцентів антитромбіну є досить перспективним, оскільки дозволяє отримати препарат за відносно короткий термін з використанням недорогих ресурсів.

Міністерство освіти і науки України
Інститут модернізації змісту освіти
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Національна академія наук України
Інститут клітинної біотехнології та генетичної інженерії

БИОТЕХНОЛОГИЯ XXI СТОЛЕТЬЯ



Матеріали

XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції
«Біотехнологія XXI століття» присвяченої 135-річчю від дня народження
Олександра Володимировича Палладіва
(для студентів, аспірантів і молодих вчених)

20 травня 2020 року



Київ-2020

БІОСИНТЕЗ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИМИ ДРІЖДЖАМИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Потопенко В.В., Скроцька О.І.

*Національний університет харчових технологій
вул. Володимирська, 68, Київ, 01033, potapenko.lega@ukr.net*

В останні роки у світі збільшується цікавість до біополімерів, які отримуються з відновлювальної сировини. Одним з найбільш перспективних полімерів на біологічній основі є полімолочна кислота, яка широко використовується в якості пакувального матеріалу.

Дана кислота в основному отримується за рахунок ферментації мономеру – молочної кислоти. Природними продуцентами молочної кислоти є молочнокислі бактерії. Однак, вони володіють певним недоліком, зокрема, є чутливими до високим концентрацій кислот в позивному середовищі. Тому, отримання молочної кислоти в промислових масштабах вимагає нейтралізації під час ферментації та подальше виділення молочної кислоти з отриманої солі лактату. В свою чергу дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* володіють високою кислотостійкістю, тому вони є перспективною альтернативою для виробництва молочної кислоти. Тому, вченими було генетично модифіковано сахароміцети з метою отримання молочної кислоти. Так, Yamada зі співавт. створили штам YPH499/dPdA3-34/DLDH/1-18, шляхом введення в *S. cerevisiae* гена D-лактатдегідрогенази (D-LDH) та генів, що кодують гліколітичні ферменти (PFK1, HXT7), які були виділені з *Leuconostoc mesenteroides*. В результаті за допомогою штаму YPH499/dPdA3-34/DLDH/1-18 на середовищі з глюкозою було отримано 60,3 г/л молочної кислоти [1]. Також Baek зі співавт. виділили ген лактатдегідрогенази (LdhA) з *L. mesenteroides* ATCC 8293 та ввели в клітини сахароміцетів, після чого здійснили видалення гену піруватдекарбоксілази (PDC1) та генів, що беруть участь у синтезі етанолу (ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5) та гліцерину (GPD1, GPD2). В результаті за допомогою сконструйованого штаму JHY5730 було отримано 82,6 г/л молочної кислоти [2].

Отже, здійснюючи біосинтез молочної кислоти генетично модифікованими дріжджами *S. cerevisiae* вирішується проблема загибелі продуцента під час ферментації, оскільки за рахунок виділення кислоти знижується рН середовища, а сахароміцети добре витримують такі умови. Також можна уникнути використання нейтралізуючого реагенту, такого як карбонат кальцію і подальшого складного процесу виділення молочної кислоти з солі лактату, що в подальшому знижує вартість самого виробництва молочної кислоти.

1. Yamada R. Enhanced D-lactic acid production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* following optimization of the global metabolic pathway / R. Yamada, K. Wakita, R. Mitsui, H. Ogino // *Biotechnol. Bioeng.* – 2017. – V. 114, № 9. – P. 2075-2084.

2. Baek S.H. Improvement of D-lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* under acidic conditions by evolutionary and rational metabolic engineering / S.H. Baek, E.Y. Kwon, S.J. Bae et al. // *Biotechnol. J.* – 2017. – V. 12, № 10. – 1700015.

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ



*Кафедра технологій
фармацевтичних
препаратів*

*Кафедра біофізики та
інформаційних
технологій*



Науково-практична Internet-конференція

**НАУКОВО-ПРАКТИЧНІ ЗАСАДИ
ЗАГАЛЬНОІНЖЕНЕРНОЇ ПІДГОТОВКИ
ФАХІВЦІВ ФАРМАЦІЇ**

Збірник наукових праць

24 жовтня 2019 р.

м. Харків

ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ СПЛУК З ВИКОРИСТАННЯМ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Потапенко В.В., Скроцька О.І.

Кафедра біотехнології і мікробіології

Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна

potapenko.leva@ukr.net

Традиційні сфери використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* – це хлібопечення, виноробство та пивоваріння, виробництво спирту, виготовлення квасу та отримання кормового білку. Проте, нині, з розвитком методів генної інженерії, їх стали використовувати як експресійну платформу для отримання практично цінних рекомбінантних сполук. На відміну від бактерій, клітини дріжджів синтезують рекомбінантні сполуки вищих еукаріот, які за структурою повністю відповідають природнім аналогам. Тому ці мікроорганізми використовують для конструювання продуцентів фармацевтичних білків, ферментів та інших речовин.

Так, білок гірудин, який міститься у слинних залозах п'явок, є антикоагулянтом та запобігає утворенню тромбів. Проте його важко виділити у чистому вигляді, тому ведуться роботи по конструюванню рекомбінантних продуцентів гірудину. Так, нещодавно було створено рекомбінантний штам *S. cerevisiae*, що продукує 62,1 мг/л гірудину [1].

Глутатіон є сильним антиоксидантом, він приймає участь у зв'язуванні вільних радикалів, відновленні пероксиду водню та інших пероксидів, що запобігає розвитку вільнорадикальних процесів. Тому, ведуться роботи щодо створення рекомбінантних продуцентів глутатіону. Зокрема, Kobayashi зі співавт. модифікували *S. cerevisiae* та отримали штам, що синтезує глутатіон у концентрації 160 мг/л [2].

Одним із поновлювальних та економічно вигідних джерел вуглецю та енергії є лігноцелюлозні матеріали. Це основні компоненти органічних відходів сільськогосподарського та лісового господарств, целюлозно-паперової, деревообробної та

харчової промисловості, а також побутових відходів. Тому ведуться роботи по конструюванню сахароміцетів, що здатні збродажувати лігноцелюлозну сировину. Нещодавно створені рекомбінантні сахароміцети, які синтезують етанол на лігноцелюлозних субстратах: *S. cerevisiae* HSGIBX – 19,4 г/л етанолу [3], *S. cerevisiae* H1 та H2 [4], *S. cerevisiae* ADE17_mZRE [5].

Враховуючи те, що речовини, які можна отримати з використанням генетично модифікованих клітин *S. cerevisiae* мають практичну цінність у різних галузях, створення нових напродуцентів різних сполук, а також удосконалення технологій виділення та очищення цільового продукту є актуальним завданням сьогодення.

Використана література:

1. Zhang J., Lan N. Hiradin variants production by genetic engineered microbial factory. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2018, 34 (2): 261-280. doi: 10.1080/02648725.2018.1506898.
2. Kobayashi J., Sasaki D., Bamba T. et al. Sustainable production of glutathione from lignocellulose-derived sugars using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 103 (3): 1243-1254. doi: 10.1007/s00253-018-9493-4.
3. Niu Y., Wu L., Shen Y. et al. Coexpression of β -xylosidase and xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of saccharification and fermentation from xylo-oligosaccharides. *Cellulose*. 2019, 26 (13-14): 7923-7937. doi: 10.1007/s10570-019-02650-3.
4. Stafa A., Zumar B., Franklin A. et al. Novel approach in the construction of bioethanol-producing *Saccharomyces cerevisiae* hybrids. *Food Technol. Biotechnol.* 2019, 57 (1): 5-16. doi: 10.17113/ftb.57.01.19.5685.
5. Zhang M.M., Xiong L., Tang Y.J. et al. Enhanced acetic acid stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating expression of the de novo purine biosynthesis genes. *Biotechnol. Biofuels*. 2019, 12: 116. doi: 10.1186/s13068-019-1456-1.

Міністерство охорони здоров'я України
Міністерство освіти і науки України
Національний фармацевтичний університет



Кафедра технологій
фармацевтичних
препаратів



Кафедра біофізики та
інформаційних
технологій



СЕРТИФІКАТ

№ 102
від 24.10.2019 р.

Потапенко Валерія Віталіївна

учасник науково-практичної internet-конференції

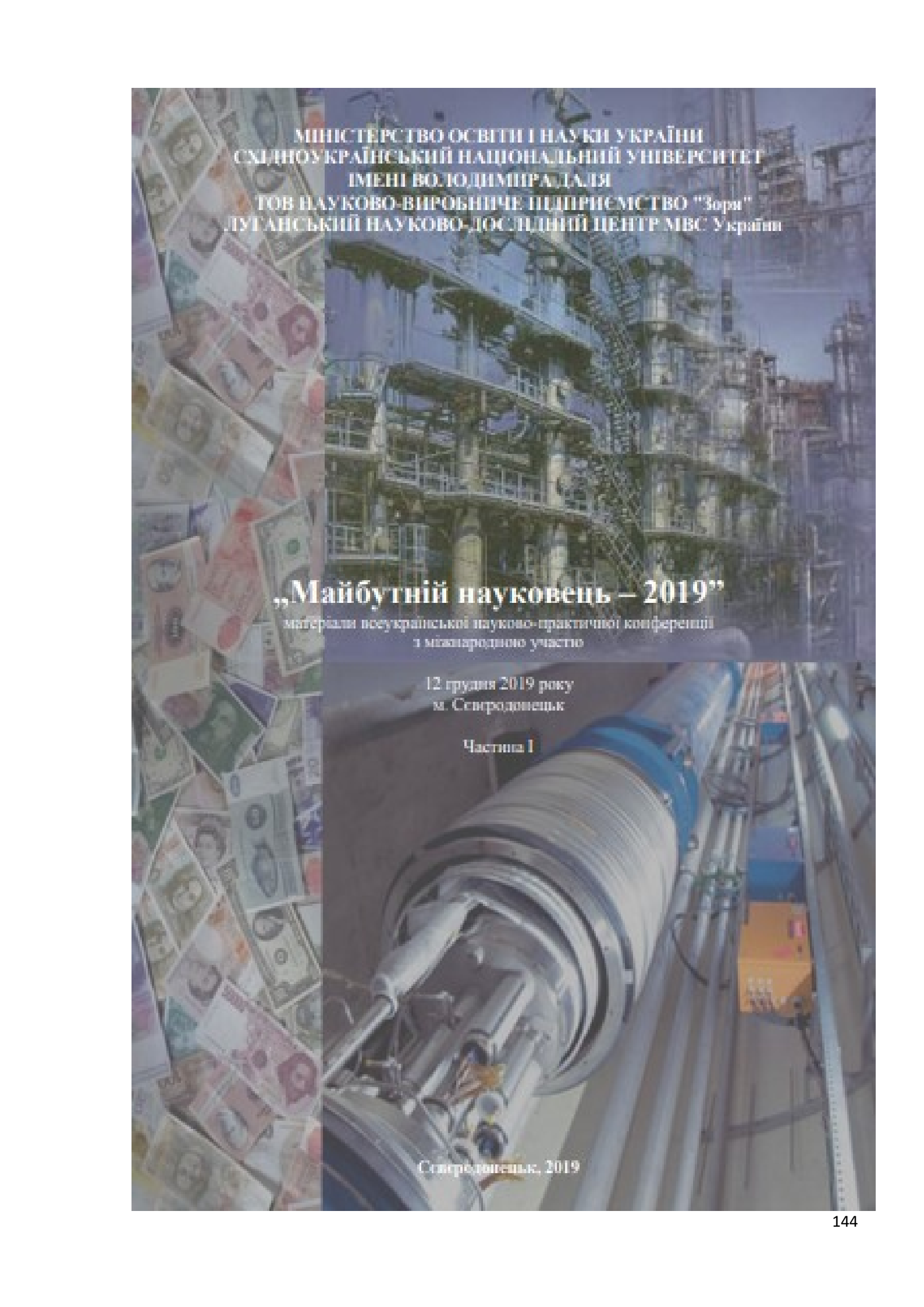
**НАУКОВО-ПРАКТИЧНІ ЗАСАДИ ЗАГАЛЬНОІНЖЕНЕРНОЇ
ПІДГОТОВКИ ФАХІВЦІВ ФАРМАЦІЇ**

Регстраційне посвідчення № 272 УкрНІТЕС від 09 серпня 2018 р.

Ректор
Національного фармацевтичного університету
доктор фармацевтичних наук, професор



А.А. Котвіцька



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СХІДНОУКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВОЛОДИМИРА ДАЛЯ
ТОВ НАУКОВО-ВИРОБНИЧЕ ПІДПРИЄМСТВО "Зорі"
ЛУГАНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ЦЕНТР МВС України

„Майбутній науковець – 2019”

матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції
з міжнародною участю

12 грудня 2019 року
м. Сєвєродонецьк

Частина I

Сєвєродонецьк, 2019

СИНТЕЗ БІОЕТАНОЛУ ДРІЖДЖАМИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* НА ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНИХ СУБСТРАТАХ

Поташенко В.В., ПБ-1-1М

Скорошля О.І., доц., к.б.н.

Національний університет харчових технологій

Для промислового виробництва біоетанолу можна використовувати дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, які мають ряд переваг: здатність до швидкого споживання глюкози, стійкість до дії інгібіторів та інших умов процесу культивування, що можуть негативно впливати на ріст сахароміцетів. Враховуючи, що економічне виробництво біоетанолу вимагає ефективного використання більш поширених та дешевих джерел вуглецю, то за допомогою інтенсивних досліджень та генної інженерії було створено штами *S. cerevisiae*, що можуть збирати пентози, зокрема ксилітозу, в результаті чого збільшується утворення етанолу. В свою чергу лігноцелюлозна сировина, особливо сільськогосподарські та лісові підходи, широко досліджуються вченими в якості перспективного джерела для виробництва біопалива.

Спільна ферментація ксилітози і глюкози є складним завданням, оскільки дріжджі можуть використовувати ксилітозу тільки після повного споживання глюкози. Це пов'язано з тим, що ксилітоза споживається клітинами сахароміцетів через системи поглинання глюкози, в результаті чого глюкоза пригнічує поглинання ксилітози. Для вирішення цієї проблеми в *S. cerevisiae* було введено ген ксилітозоізомераз (XI) та сконструйовано 9 штамі, серед яких максимальний синтез етанолу спостерігали у *S. cerevisiae* CW9 (54 г/л) [1]. Для ефективного використання лігноцелюлозних підходів дріжджами в якості субстрату важливим є повне і швидке споживання цукрів, що здійснюється шляхом біоконверсії ксилітану та целюлози. Тому, для пришвидшення споживання субстрату та утворення біоетанолу, гени β -ксилідази (*xyl3A*) та ксилітозоізомераз (*Xy-xyIA*), виділені з *Penicillium oxalicum* були експресовані у *S. cerevisiae* BSPX042, що дало змогу за 48 годин отримати 19,4 г/л етанолу [2].

Під час попередньої обробки лігноцелюлозних субстратів утворюється ряд токсичних сполук (оцтова кислота, фурфурол, мурашина кислота, 5-гідроксиметил-2-фурфурол), які інгібують ріст продуцента. Zhang та співавт. створили резистентні до дії інгібіторів штами. За наявності у середовищі 5 г/л оцтової кислоти максимальна концентрація етанолу спостерігалась у *S. cerevisiae* BADE1 (42,5 г/л). Також було проведено культивування дріжджів з внесенням суміші інгібіторів (6,5 г/л оцтової кислоти, 0,8 г/л фурфуролу, 0,5 г/л мурашиної кислоти, 0,6 г/л 5-гідроксиметилфурфуролу) – найвищий синтез етанолу продукували клітини *S. cerevisiae* BADE17 (41,74 г/л) [3].

Оскільки потреба в біопаливі постійно збільшується, а його виробництво з поновлюваних джерел енергії є актуальним, то використання рекомбінантних клітин *S. cerevisiae* є перспективним підходом для його отримання.

Список використаних джерел:

1. Zhang M., Fan W.J., Wang J.Y., Cao L.M. Optimized xylose isomerase uptake and expression level in *Saccharomyces cerevisiae* for improving ethanol production. *Appl. Environ. Biotechnol.* 2018, 3(1), 47-52.
2. Niu Y., Wu L., Shen Y., Zhao J., Zhang J., Yi Y., Bao X. Coexpression of β -xylosidase and xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of saccharification and fermentation from xyloligosaccharides. *Cellulose*. 2019, 26(13-14), 7923-7937.
3. Zhang M. M., Xiong L., Tang Y.J., Mehmood M.A., Zhao Z.K., Bai F.W., Zhao, X.Q. Enhanced acetic acid stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating expression of the de novo purine biosynthesis genes. *Biotechnol. Biofuels*. 2019, 12(1), 116.

86

**International scientific conference
of young scientist and students**

**"Youth scientific achievements
to the 21st century nutrition
problem solution"**

April 2–3, 2020

Part 1

Kyiv, NUFT, 2020

33. Рекombінантні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* як продуценти біоетанолу

Валерія Потапенко, Оксана Скропська

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Етанол є найбільш часто використовуваним біопаливом у всьому світі. На сьогодні у промисловості джерелом для отримання біоетанолу є цукрові харчові культури. Проте, кількість сільськогосподарських угідь обмежена, а вирощування культур потребує великих площ та конкурує з використанням цієї сировини в якості корму для тварин. Тому використання лігноцелюлозної сировини для отримання біоетанолу є досить перспективним, за умови ефективного перетворення глюкози та ксилози в цільовий продукт. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* використовуються як продуцент етанолу, завдяки стійкості до дії інгібіторів та інших умов культивування, здатності до утворення великої кількості етанолу. Однак, сазароміцети не здатні споживати ксилозу, яка у значних кількостях (30-40%) входить до складу лігноцелюлозних гідролізатів. *S. cerevisiae* перетворює ксилозу в ксилулозу за допомогою двох ферментів, які використовують різні кофактори, що призводить до окислювально-відновного стану і, отже, запобігає споживанню ксилози.

Для вирішення цієї проблеми зазначай в клітині дріждзів вводять гени, продукти експресії яких формують шлях ксилулоізомерази (XI), або шлях ксилузоредуктази/ксилітдегідрогенази (XR/XDH). Через шлях XI ксилоза безпосередньо перетворюється в ксилулозу, і для неї не потрібно ніякого кофактора, що призводить до утворення високих концентрацій етанолу. З іншого боку, шлях XR/XDH забезпечує більш високі метаболічні потоки, ніж шлях XI, однак, він призводить до накопичення ксиліту через дисбаланс кофакторів. Тому, для унеможливлення появи дисбалансу доцільна утилізація L-арабінози шляхом експресії генів, що кодують ізомеразу L-арабінози (araA), L-рибулокіназу (araB) і L-рибулозо-5-фосфат-4-епімеразу (araD). Так, гени шляху арабінози (araA, araB і araD) *Lactobacillus plantarum* та ксилулоізомерази (XI) інтегрували в геном *S. cerevisiae* 36aS1.10.4. За допомогою сконструйованого рекombінантного штаму вдалось отримати 54,1 г/л етанолу на гідролізаті пшеничної соломи [1]. Також, задля зменшення накопичення ксиліту з *Lactococcus lactis* був виділений ген, що кодує водоутворюючу NADH-оксидазу (EC 1.6.99.3). Вказаний ген експресували у *S. cerevisiae* JK123_poxE. Даний штам дріждзів продукував 55,5 г/л етанолу на гідролізаті міскантуса та володів значним утворенням ксиліту [2].

Таким чином, в останні роки ведуться роботи щодо створення рекombінантних штамів *S. cerevisiae*, які були б здатні до ефективного споживання ксилози, оскільки для продуктивного використання лігноцелюлозних субстратів дуже важливе повне і швидке споживання усіх цукрів дріжджами.

Література

1. Huang S., Liu T., Peng B., Geng, A. (2019). Enhanced ethanol production from industrial lignocellulose hydrolysates by a hydrolysate-cofermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain, *Bioprocess Biocyst. Eng.*, 42(5), 883-896.
2. Lee Y.G., Jin Y.S., Cha Y.L., Seo J.H. (2017). Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresour. Technol.*, 228, 355-361.