



ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ УКРАЇНИ

Цикл наукових праць
на здобуття щорічної премії Президента України для молодих вчених за
темою

Створення альтернативних біопалив з поновлювальної сировини

Київ, 2020



Автори циклу робіт

Тігунова Олена Олександрівна – кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу молекулярної біотехнології та геноміки Державної установи “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”



Василишин Роксолана Василівна - провідний інженер відділу молекулярної генетики та біотехнології Державної установи “Інститут біології клітини НАН України”.



ХІМАЧ Наталія Юріївна – кандидат хімічних наук, науковий співробітник відділу органічного та нафтохімічного синтезу Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України.





Метою даного циклу робіт було розроблення технології з виробництва рідких органічних продуктів і палива, в першу чергу, етанолу, бутанолу та метанолу із поновлювальних джерел сировини на основі біомаси.

Відповідно до поставленої мети було сформульовано наступні **завдання**:

Виділити та відселекціонувати вітчизняні штами-продуценти бутанолу. Визначити нуклеотидну послідовність гена 16S рРнк, та зареєструвати їх. Визначити здатність нових штамів до асиміляції лігноцелюлозної сировини та конвертування її до бутанолу.

Вивчити вплив підготовки субстрату на накопичення бутанолу штамми. Зменшити кількість відходів виробництва за використання “зворотньої барди”

Методами класичної селекції та метаболічної інженерії сконструювати штами-продуценти етанолу з підвищеним накопиченням цільового продукту за асиміляції ксилози.

Сконструювати модифіковані форми транспортера Hxt1 *O. polymorpha* та визначити вплив посилення експресії та делеції гена ріст дріжджів та накопичення етанолу.

Реалізувати процес синтезу метанолу конверсією синтез-газу за умов механохімічної активації мідь-цинк-алюмооксидного каталізатора

Сконструювати і змонтувати каталітичну установку з безградієнтним віброреактором для синтезу метанолу.

Результати представлені на вітчизняних та закордонних наукових з'їздах, конференціях та конгресах.

Загальна кількість публікацій авторів за тематикою циклу наукових праць – 88: 2 патенти України, 29 статті (в т.ч. 5 – у закордонних виданнях) та 57 тези доповідей.

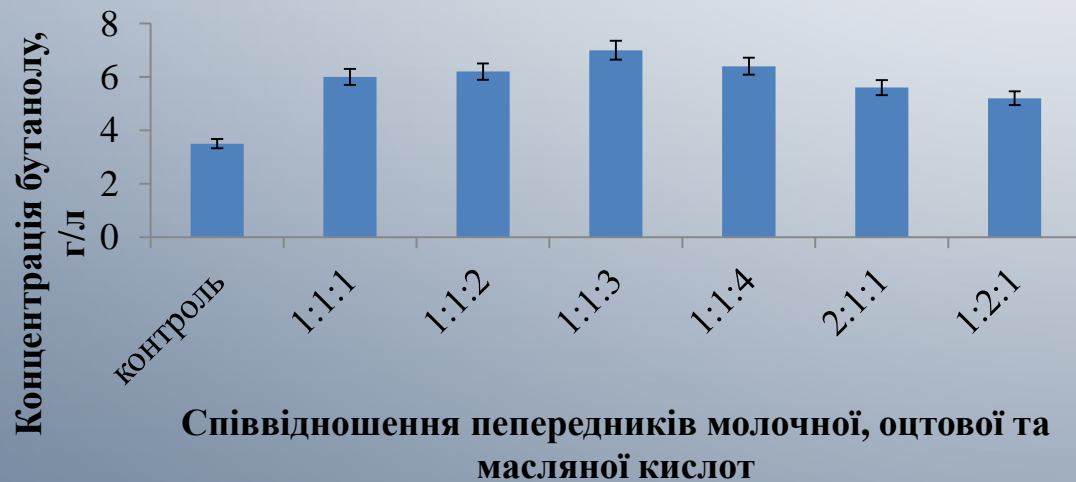
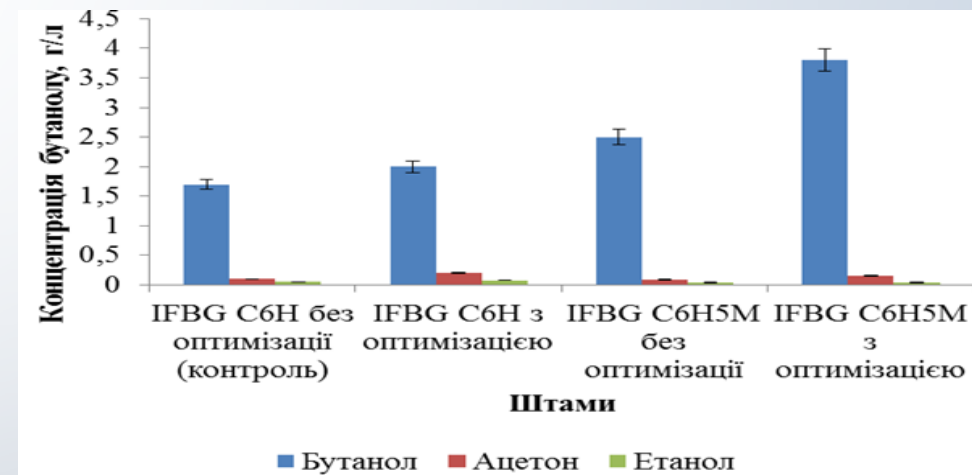
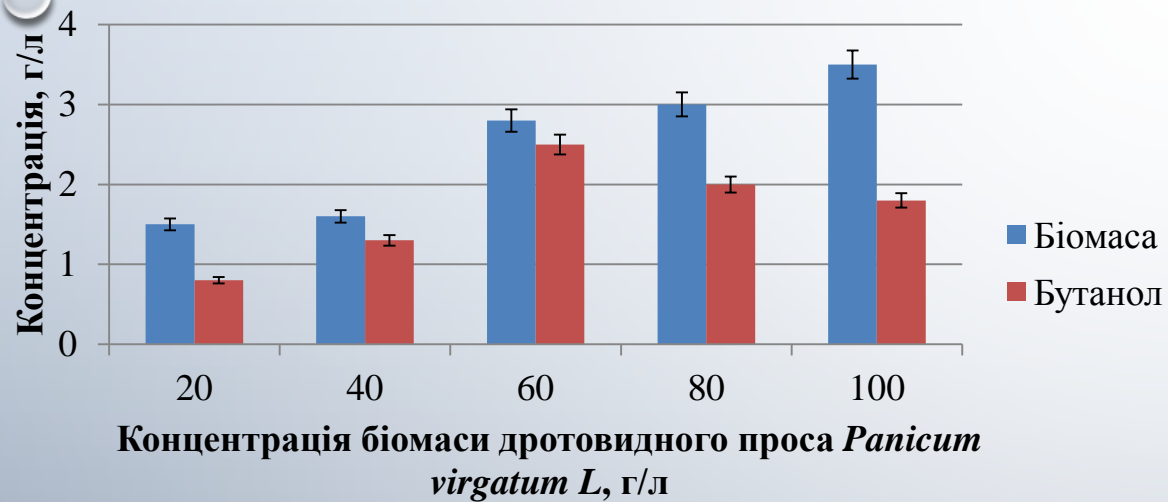


Удосконалення технології біобутанолу з використанням нативних альтернативних субстратів та вітчизняних штамів-продуцентів

Штами-продуценти	Вихід ацетону, бутанолу та етанолу в г/л на різних джерелах вуглецю			
	Глюкоза	Ксилоза	Арабіноза	Целюлоза
<i>C. acetobutyricum</i> 824	5,7:10:1,1	0,2:1,9:0,2	0,2:1,9:0,2	0,1:2,4:0,2
<i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	1,7:5,1:4,59	0,89:2,7:2,4	0,89:2,6:2,4	1,4:4,2:3,78
<i>C. acetobutyricum</i> DSM 1731	0,5:11:2	-	-	-
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N 1-4	0,56:4,86:0,85	0,84:1,23:0,15	0,84:1,23:0,15	0,11:0,25:0,04
<i>C. acetobutyricum</i> IFBG C6H	0,7:8:0,05	0,019:1,9:-	0,02:1,5:0,01	0,013:1,1:0,01
<i>C. butylicum</i> IFBG C7P	0,2:6:0,03	0,015:1,3:0,02	0,018:0,8:-	0,02:1,3:-



ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМІВ ТА УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ БІОБУТАНОЛУ





СВІДОЦТВО ПРО ДЕПОНУВАННЯ ШТАМУ *CLOSTRIDIUM SP.* IFBG C6H 5M

СВІДОЦТВО
про первісне депонування штаму мікроорганізму в
Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології
НАН України

Кому видано: ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України.
(прізвище, ім'я, по батькові автора (авторів) і/або)

04124, м. Київ, вул. Осиповського, 2а. Автори: Шульга С.М., Тігунова О.О.
повна назва організації-депозитора та її адреса

Цим підтверджується, що штамп мікроорганізму: _____
(назва і позначення)

Clostridium sp. IFBG C6H 5M
(номер, синонім тощо), надане штаму мікроорганізму депозитором)

первісно депонований в:

Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України
(повна назва Депозитарію)

Регстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм:

Clostridium sp. IMB B-7570

Супроводжувальна документація від депозитора одержана:

Паспорт, заключення про дослідження патогенності штаму, договір 46-2016
(паспорт, довідка про не патогенність тощо)

Дата первісного депонування: 2 серпня 2016 року

Заступник директора Інституту мікробіології і вірусології НАН України _____ Іутинська Г.О.
М.П.

Адреса: 01143, Київ, вул. Заболотного, 154
www.imv.kiev.ua

2 серпня 2016 року
Голова Т.М. Golovach@imv.net

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ІХБГ НАН України
академік НАН України

« » грудня 2019 р.
Я.Б. Блюм



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ННЦ «ІМЕСГ»
академік НААН України

« » грудня 2019 р.
В.В. Адамчук

АКТ

про використання результатів науково-дослідної роботи

Ми, що підписалися нижче, склали цей акт в тому, що за результатами виконання Інститутом харчової біотехнології та геноміки НАН України науково-дослідної роботи «Удосконалення технології отримання біобутанолу на основі біомаси ріпаку з використанням вітчизняних штамів-продуцентів бактерій» отримано бутанол за використання рослинних субстратів агропромислового виробництва.

Національний науковий центр «Інститут механізації та електрифікації сільського господарства» вважає, що отримані результати комплексного дослідження мають високий методологічний та теоретичний рівень, практичну значимість, є актуальними, науково обґрунтованими та можуть бути використані при розробленні відповідної технології та обладнання для виробництва бутанолу на основі використання рослинної сировини, а також при подальшому спільному використанні розробленого технологічного обладнання. Ефективність застосування одержаного бутанолу буде визначатися на основі виробничих випробувань мобільної сільськогосподарської техніки шляхом порівняльного аналізу відповідних техніко-експлуатаційних показників.

Виконавці

від ІХБГ НАН України:

_____ О.О. Тігунова

_____ С.М. Шульга

_____ Г.С. Андріяш

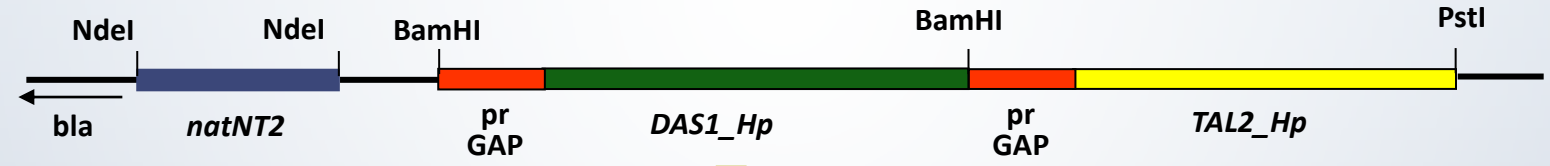
від ННЦ «ІМЕСГ»:

Завідувач відділу мобільних енергетичних засобів та біоенергетики

_____ В.М. Третяк



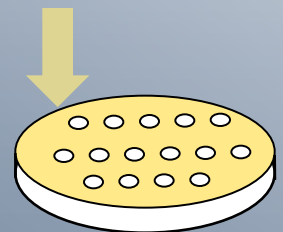
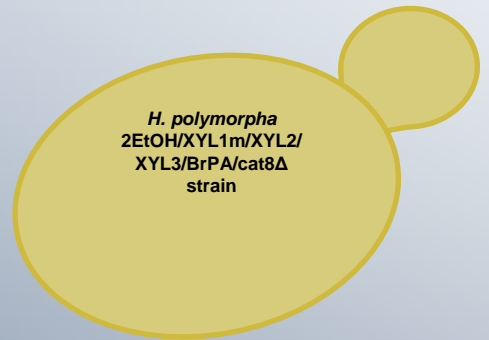
Надекспресія генів, що кодують пероксисомні транскетолазу Das1 і трансальдолазу Tal2 у найкращого з наявних продуцентів етанолу



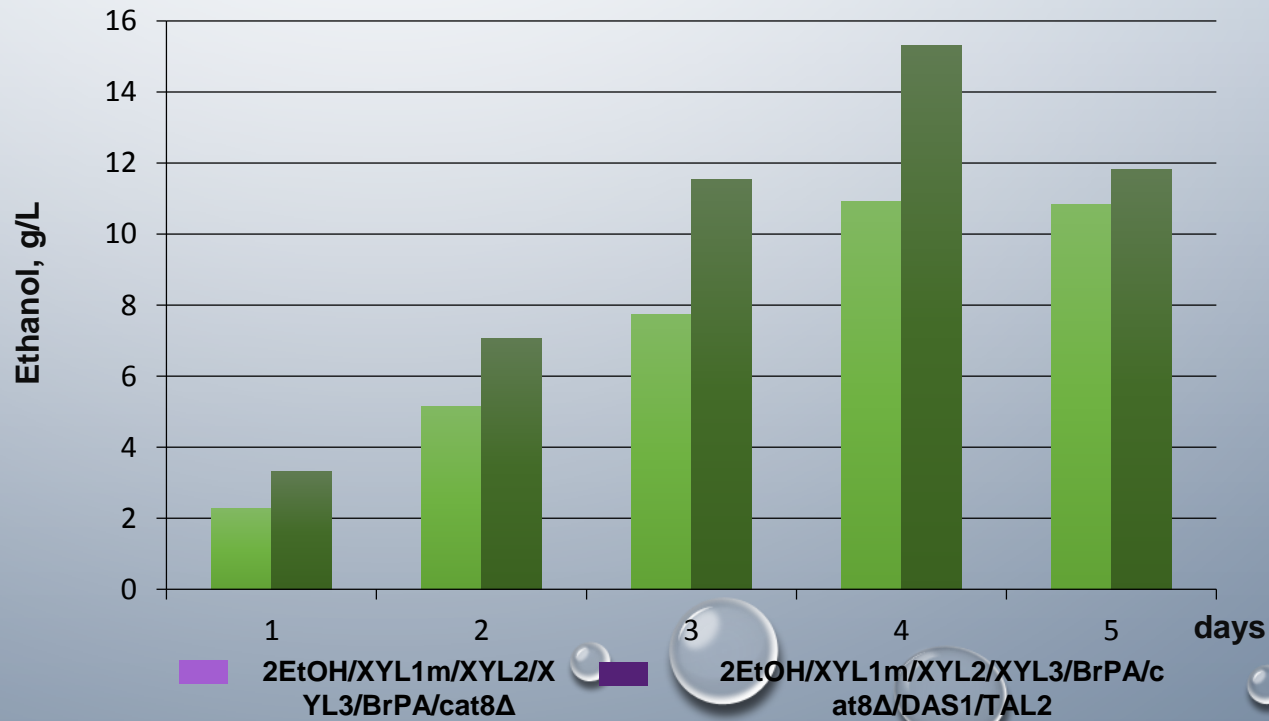
pUC57/DAS1/TAL2/natNT2 (NTC^R)(~8,8 kb)



Electroporation



YPD+NTC





Посилення експресії модифікованих форм транспортерів Hxt1 *O. polymorpha*, Gal2 та Hxt7 *S. cerevisiae* у рекомбінантному штамі *O. polymorpha*

Hxt1 (N358A)

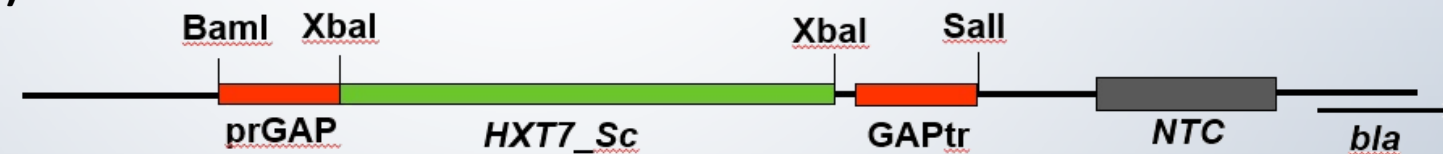
N Asn(AAC)→A Ala(GCC)

K (AAA, AAG)→R Arg (AGA, AGG)



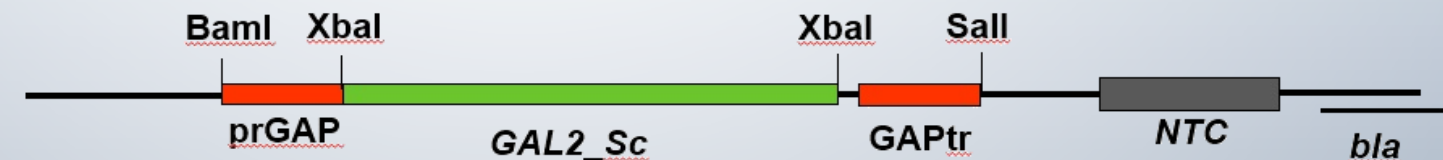
Hxt7 (N370S)

N Asn(AAC)--- S Ser(AGC)



Gal2 (N376F)

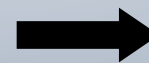
N Asn(AAC)--- F Phe(TTC)c



pUC19_NTC_GAP_HXT1_N358A_K_Op

pUC19_NTC_GAP_N370S_Hxt7_Sc

pUC19_NTC_GAP_N376F_Gal2_Sc

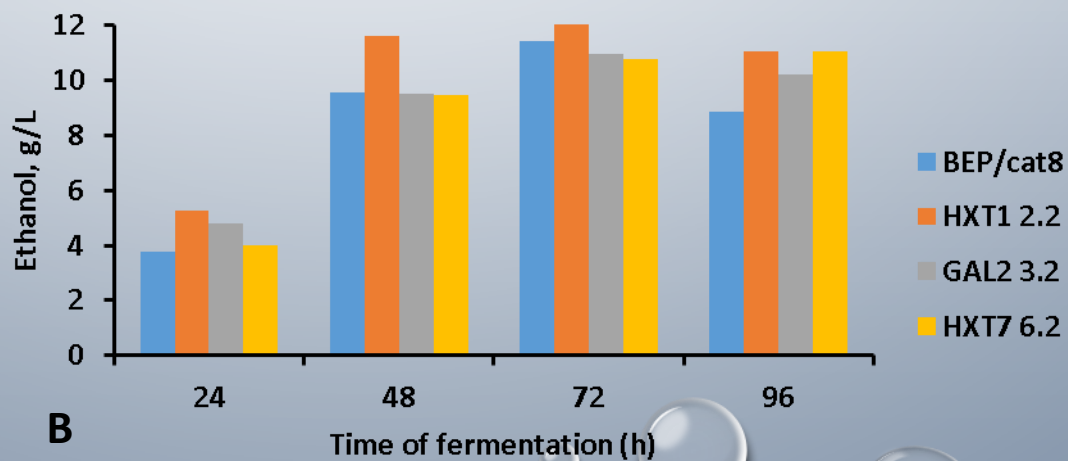
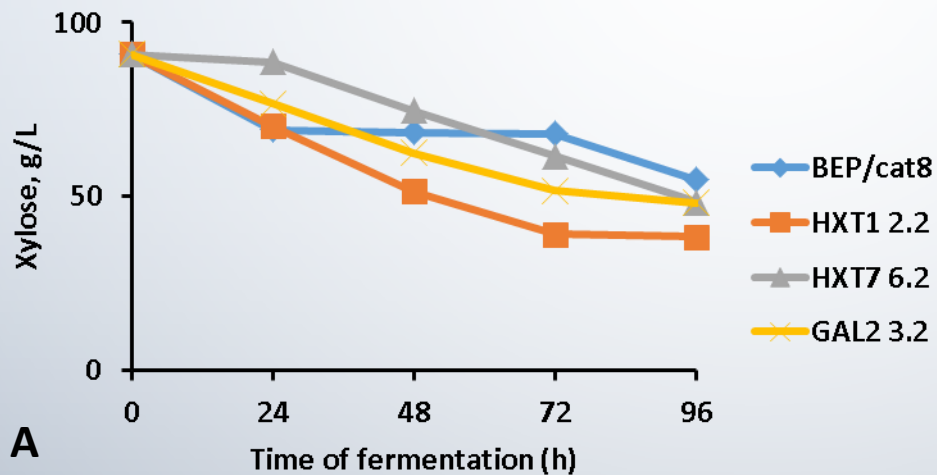


O. polymorpha
BEP/cat8

Kurylenko et al., Microb Cel Fact. 2014
Ruchala et al., Microb Cel Fact. 2017

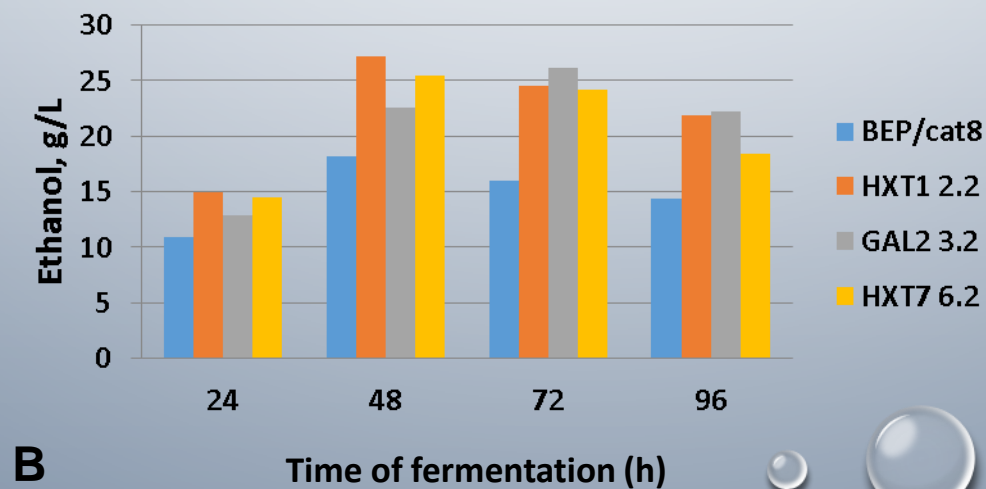
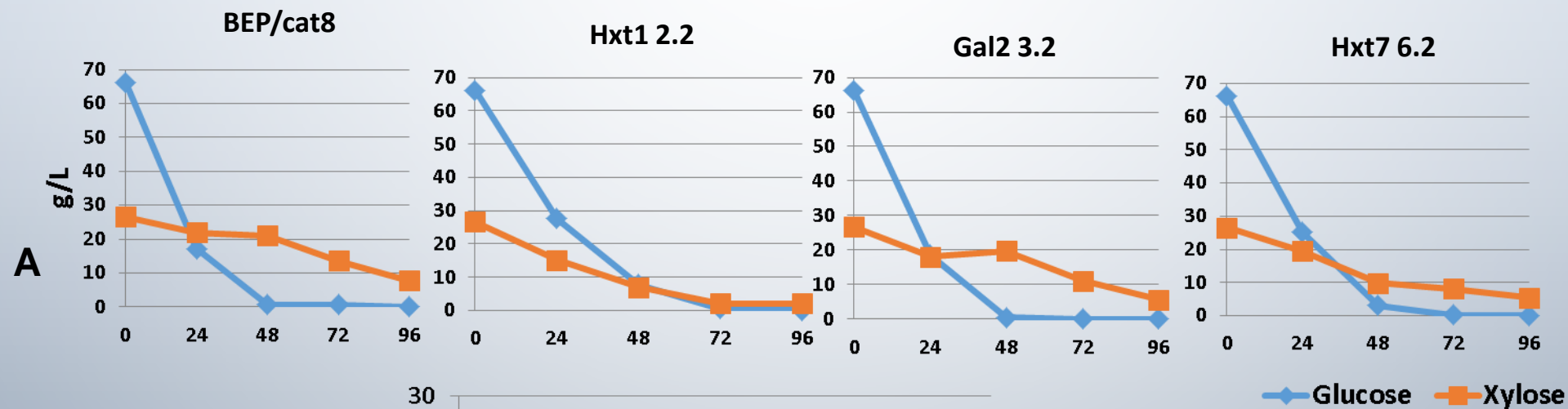


Споживання ксилози (А) та продукція етанолу (В) отриманими рекомбінантними штамми *O. polymorpha* з модифікованими формами транспортерів Gal2 і Hxt7 *S. cerevisiae* та Hxt1 *O. polymorpha*

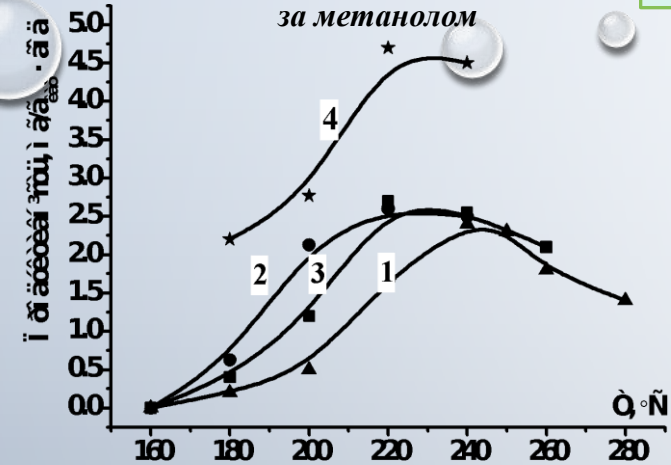




Споживання ксилози та глюкози (А) і продукція етанолу (В) отриманими рекомбінантними штамми *O. polymorpha* з модифікованими формами транспортерів Gal2 і Hxt7 *S. cerevisiae* та Hxt1 *O. polymorpha*

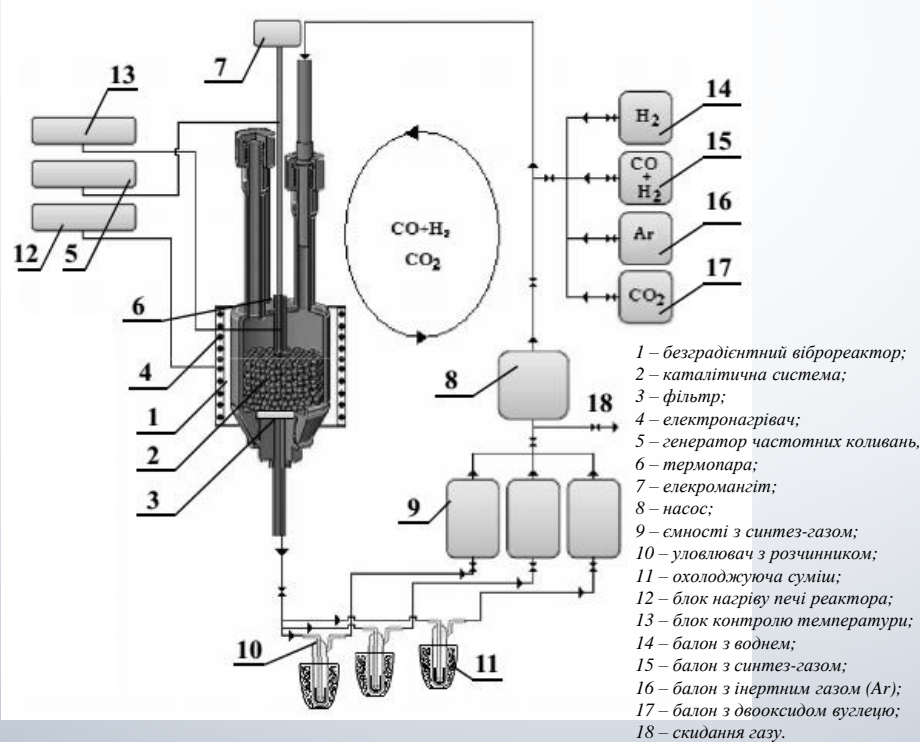


Температурна залежність продуктивності каталізатора за метанолом

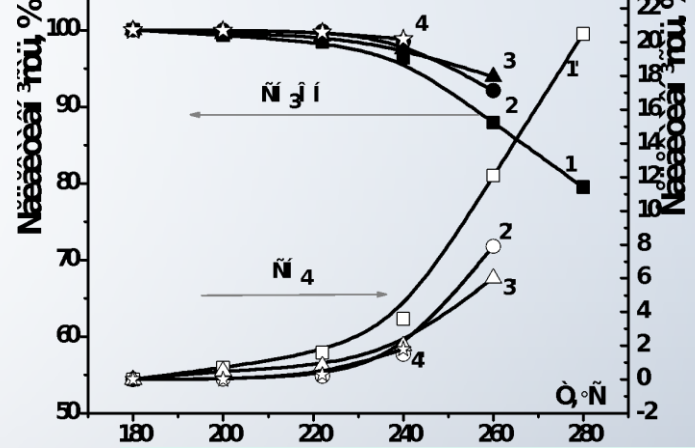


1 – промисловий каталізатор у стаціонарному шарі; 2–4 – механоактивований каталізатор у віброреакторі ($f = 5$ Гц): нанесений на кульки з однорідною гладкою (2) і неоднорідною (3) поверхню; нанесений на кульки з однорідною поверхню у присутності добавки каталізатора (4)

Принципова схема лабораторної установки для дослідження конверсії синтез-газу

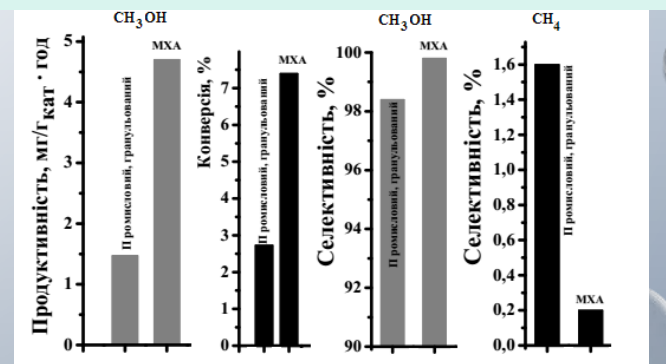


Температурна залежність селективності за продуктами реакції

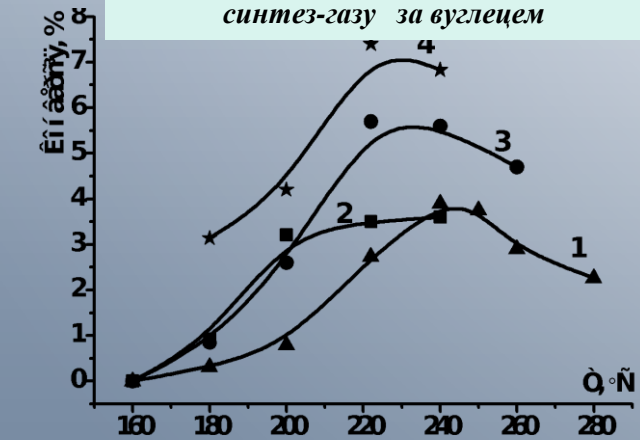


1 – промисловий каталізатор у стаціонарному шарі;
 2–4 – механоактивований каталізатор у віброреакторі ($f = 5$ Гц): нанесений на кульки з однорідною гладкою (2) і неоднорідною (3) поверхню; нанесений на кульки з однорідною поверхню у присутності добавки каталізатора

Активність каталізатора механохімічноактивованого та гранульованого при температурі процесу 220 °C.

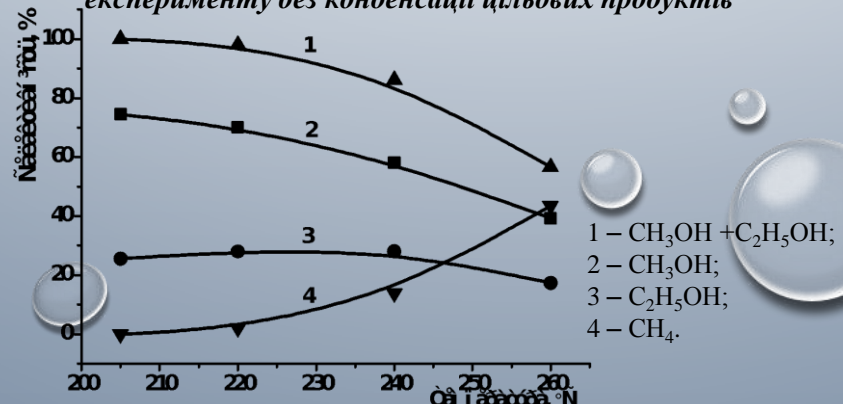


Температурна залежність конверсії синтез-газу за вуглецем

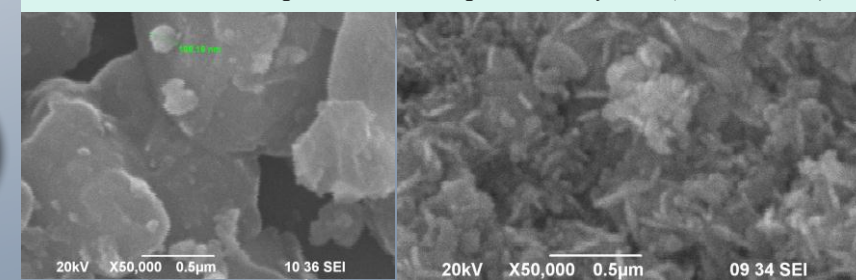


1 – промисловий каталізатор у стаціонарному шарі; 2–4 – механоактивований каталізатор у віброреакторі ($f = 5$ Гц): нанесений на кульки з однорідною гладкою (2) і неоднорідною (3) поверхню; нанесений на кульки з однорідною поверхню у присутності 0,1 % добавки каталізатора

Температурна залежність селективності мідь-цинк-алюмооксидного каталізатора в умовах здійснення експерименту без конденсації цільових продуктів



Електронні мікрофотознімки каталізатора СМ-У, нанесеного на поверхню скляно-керамічних кульок (метод СЕМ)

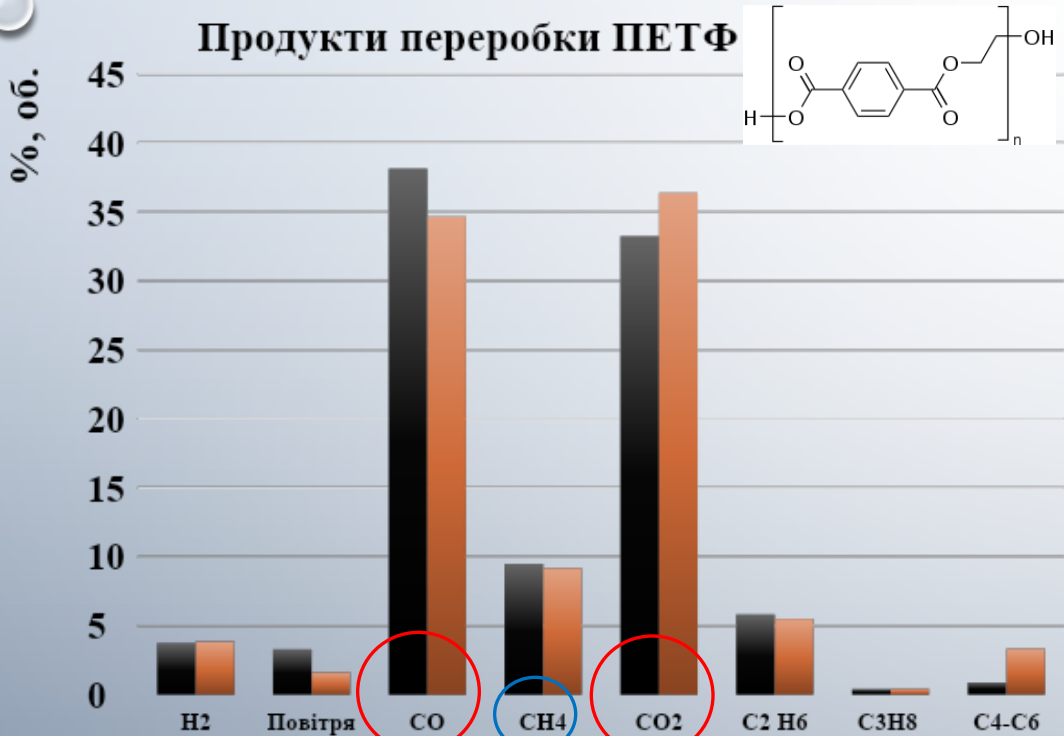


до реакції

після реакції

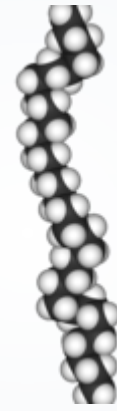


Цикл робіт по терморозкладу ПЕТФ відходів (порізана пляшка)

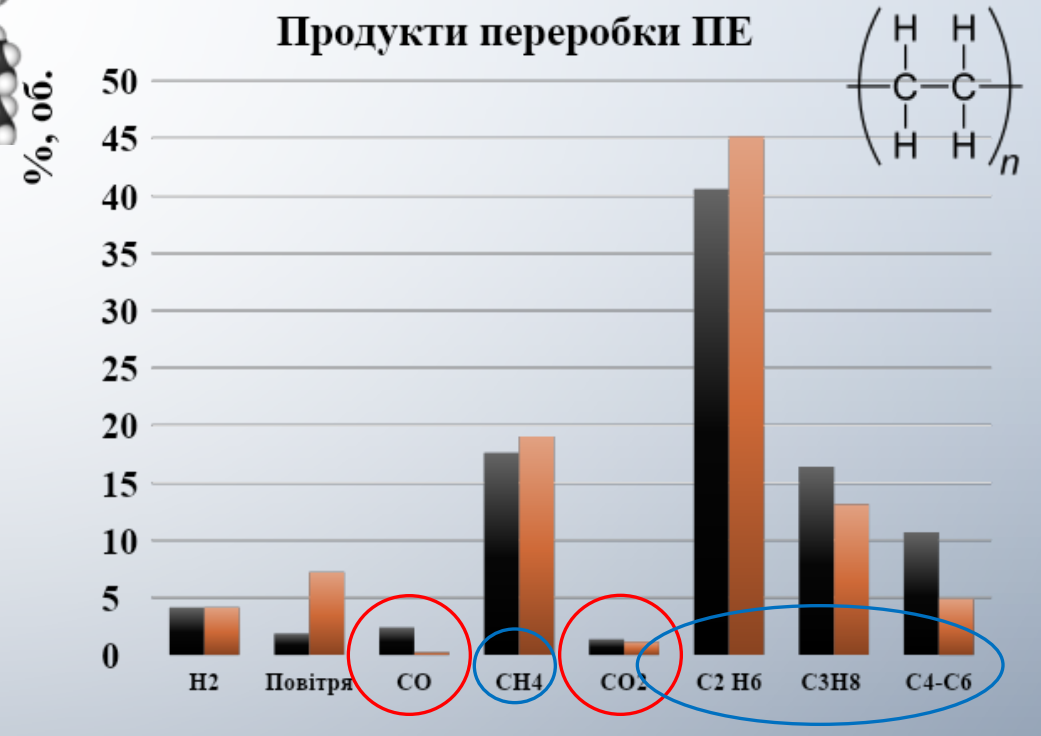


Отримано продуктів:

Залишок в реакторі, зола 8,0 %
смолисті речовини на вугіллі та фільтрі – 26,25 %
гази в пробоприймачі – 65,75 %



Цикл робіт по терморозкладу ПЕ відходів (поліетиленові пакети)



Отримано продуктів:

Залишок в реакторі, зола (наповнювач, залишки фарби) 2,53%
смолисті речовини на вугіллі та фільтрі – 35,07%
гази в пробоприймачі – 62,40 %



ВИСНОВКИ

Виділено та селекціоновано нові вітчизняні штами-продуценти бутанолу. Визначено нуклеотидну послідовність гена 16S рРНК штаму IFBG С6Н та проведено його філогенетичний аналіз. Послідовність гена 16S рРНК штаму ІМВ В-7407 (IFBG С6Н) зареєстровано в базі даних GenBank (реєстраційний номер KU682660).

Показано, що використання культуральної рідини після культивування на нехарчовій сировині як додатку до ензиматичного середовища, збільшує накопичення бутанолу на 25% для штаму IFBG С6Н та на 35% для штаму IFBG С7Р.

Розроблено технологію бутанолу з використанням поновлювальної рослинної сировини (біомаси). Показано, що вітчизняні штами-продуценти асимілюють сік та багасу сорго, біомасу ріпаку, дротовидного проса, сорго. Проведено оптимізацію умов культивування (рН, температура, швидкість перемішування, відсотковий склад мікро- та макроелементів, використання попередників синтезу, концентрації біомаси у ензиматичного середовищі, іммобілізація культури на різних носіях) штамів-продуцентів за використання лігноцелюлозної сировини. Так за використання біомаси сорго як субстрату, штами-продуценти накопичували бутанолу 5 г/л.

Ефективність технології отриманого бутанолу за використання рослинних субстратів буде остаточно визначатись на основі виробничих випробувань мобільної сільськогосподарської техніки Національного наукового центру «Інституту механізації та електрифікації сільського господарства».

Було здійснено посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* в геномі штаму 2EthOH-/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/ Δ cat8, отриманого методами метаболічної інженерії та класичної селекції, який характеризувався підвищеною продукцією етанолу з ксилози.

Отриманий рекомбінантний штам 2EthOH-/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/ Δ cat8/*DAS1*/*TAL2* накопичував етанолу в 1,3 раза більше у порівнянні з батьківським штамом. Максимальний титр утвореного етанолу досягав 16 г/л, що є найкращим результатом серед усіх рекомбінантних штамів *O. polymorpha*.

Сконструйовано модифіковані форми транспортера Hxt1 *O. polymorpha* із заміною залишків лізину на N-кінці білка (заміна сайтів убіквітинування) та заміною аспарагіну на аланін в положенні 358; Отримано штами дріжджів *O. polymorpha* з посиленням експресії гена *HXT1*, що кодує нативну форму або модифіковані форми транспортера Hxt1 та досліджено вплив посилення експресії та делеції гена *HXT1* на ріст дріжджів *O. polymorpha*.

Проведено аналіз отриманих штамів на швидкість та ефективність одночасного споживання обох субстратів. Проаналізувавши клітинну локалізацію гібридного білка Hxt1-GFP за допомогою флуоресцентної мікроскопії встановлено, що мутагенез Hxt1 призвів до покращення одночасного використання обох цукрів під час ферментації в отриманих рекомбінантних штамів, що обумовлено збільшенням тривалості локалізації цього білка в мембрані.



Сконструйовано штами дріждів *O. polymorpha* з модифікованим геном *HXT7 S. cerevisiae* в положенні 370 шляхом заміни аспарагіну на фенілаланін та з модифікованим геном *GAL2 S. cerevisiae* в положенні 376 шляхом заміни аспарагіну на серин та досліджено вплив здійснених модифікацій транспортерів Hxt1, Hxt7 та Gal2 на ефективність споживання ксилози та глюкози дріжджами *O. polymorpha*. Встановлено, що введення модифікованих транспортерів Hxt1 *O. polymorpha* в геном покращеного продуцента етанолу з ксилози обумовлює одночасне споживання обидвох цукрів в умовах високотемпературної алкогольної ферментації. Продуктивність досягає $27,56 \pm 0,127$ г/л етанолу на другу добу ферментації, в порівнянні з найкращим отриманим продуцентом, рівень продукції етанолу якого становить $18,23 \pm 0,096$ г/л.

Реалізовано процес синтезу метанолу конверсією синтез-газу за умов механохімічної активації мідь-цинк-алюмооксидного каталізатора. З'ясовано вплив механохімічної активації каталізатора на структуру й морфологію його поверхні, механізм та закономірності перебігу реакції гідрогенізації оксидів вуглецю у широкому діапазоні температур за атмосферного тиску. Показано, що перебіг каталітичної реакції в умовах механічного навантаження *in situ* є альтернативою реалізації процесу за підвищеного тиску.

Сконструйовано і змонтовано каталітичну установку з безградієнтним віброреактором для синтезу метанолу із синтез-газу в стаціонарно-циркуляційному режимі. Вперше на створеній установці досліджено вплив механічного навантаження на стан та реакційну здатність мідь-цинк-алюмооксидного каталізатора синтезу метанолу в діапазоні температур 160–260 С за атмосферного тиску.

Показано, що здійснення механохімічної активації каталізатора до початку каталітичного процесу знижує температуру ініціювання реакції та максимальної активності каталізатора на 20-30 °С та підвищує його продуктивність на 50% у порівнянні з гранульованим каталізатором. Зниження оптимальної температури перебігу процесу сприяє запобіганню спікання каталізатора та, тим самим, подовженню терміну використання каталітичного контакту без регенерації.

Встановлено, що загальна продуктивність каталітичної системи становить $4,5 \text{ мг СН}_3\text{ОН} \cdot (\text{гкат} \cdot \text{год})^{-1}$, що в 2-3 рази перевищує відповідні дані для гранульованого каталізатора у статичному режимі.