

На правах рукописи

Скиба Екатерина Анатольевна

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ  
ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО  
СЫРЬЯ В ЦЕННЫЕ ПРОДУКТЫ**

1.5.6. – Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора технических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институте проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)

Научный

консультант: **Сакович Геннадий Викторович,**

академик Российской академии наук, доктор химических наук, профессор, научный руководитель ИПХЭТ СО РАН

Официальные

оппоненты: **Синицын Аркадий Пантелеймонович,**

доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Абрамова Ирина Михайловна,**

доктор технических наук, директор Всероссийского научно-исследовательского института пищевой биотехнологии – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи

**Волова Татьяна Григорьевна,**

доктор биологических наук, профессор, заведующая базовой кафедрой биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Ведущая Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

организация: Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится 28 февраля 2023 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» (125047, г. Москва, Миусская пл., 9) в конференц-зале (ауд.443).

С диссертацией можно ознакомиться в информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss.muctr.ru/>

Автореферат диссертации разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 99.0.027.03,  
кандидат технических наук, доцент



И.В. Шакир

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования**

Растительная биомасса возобновляется путём фотосинтеза в количестве около  $200 \times 10^9$  тонн в год в планетарном масштабе, при этом 1/3 растительных тканей представлены целлюлозой [Field, 1998]. Целлюлозосодержащее сырьё соответствует критериям ежегодной возобновляемости, массовости, экологичности, дешевизны, что делает его привлекательным для промышленной переработки в ценные продукты.

В данной работе выбрано два вида глобально распространенного целлюлозосодержащего сырья: массовый отход сельского хозяйства шелуха овса и биомасса многолетней быстрорастущей культуры семейства злаковых *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack, выращенной в Западной Сибири. В мировой практике мискантус признан одним из приоритетных видов целлюлозосодержащего сырья, в РФ это направление только начинает развиваться, в настоящее время имеется несколько сельхозпроизводителей мискантуса в Центральном ФО [<https://miscanthus.eco/>].

Элементарным звеном целлюлозы является глюкоза – универсальная молекула для биотехнологического синтеза широчайшего спектра веществ, что дополнительно повышает ценность целлюлозосодержащего сырья. При этом целлюлозосодержащее сырьё не конкурирует с пищевым производством, хорошо хранится, имеет относительно стабильный химический состав.

В то же время, проблемы многокомпонентности химического состава целлюлозосодержащего сырья, прочности связей между полимерами, образующими лигноцеллюлозную матрицу, устойчивости биомассы к технологическим воздействиям и относительно низкого содержания целлюлозы в неволокнистых культурах, до сих пор остаются нерешенными. В связи с объективными трудностями, нет однозначного лидера с точки зрения технологичности производства, и экономическая эффективность действующих производств в ряде случаев требует дотаций. Поэтому разработка новых эффективных технологических решений трансформации целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты крайне актуальна.

Из широчайшего спектра ценных продуктов промышленной биотехнологии в данной работе выбрано два: классический продукт – биоэтанол и новейший – бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ).

### **Степень разработанности**

Технология производства биоэтанола хорошо проработана на пищевых видах сырья, мощно представлена в гидролизном производстве (СССР), в то же время она остается наукоёмкой и непрерывно развивается в силу востребованности данного продукта в пищевых и технических целях. В настоящее время биоэтанол рассматривается не только как топливо или топливная добавка, но как универсальный растворитель, прекурсор для синтеза широкого круга химических веществ, сырьё для водородной энергетики. Для России является актуальным возрождение гидролизной промышленности, при

этом в данной работе впервые предлагается для этой цели вместо древесины использовать целлюлозосодержащее сырьё, полученное за один вегетационный период в местных условиях.

Технология производства БНЦ была обозначена в мировом сообществе в 1949 г., а экспоненциальное развитие получила уже в XXI веке в связи с уникальностью свойств БНЦ, таких как наноразмерность и наноукладка волокон, высокая степень полимеризации, высокая кристалличность, механическая прочность, эластичность и формуемость, проницаемость для газов и жидкостей, гидрофильность и высокая влагоудерживающая способность, а также биосовместимость, биodeградация, способность к клеточной адгезии и пролиферации. Благодаря вышеперечисленным свойствам БНЦ имеет множество различных областей применения, таких как пищевая индустрия, биомедицина, целлюлозно-бумажная промышленность, легкая промышленность, биотехнологическая промышленность, электроника, энергетика и другие. Благодаря созданию композиционных материалов на основе БНЦ спектр применения непрерывно расширяется. В России в настоящее время нет производства БНЦ.

#### **Цель и задачи исследований**

Цель работы – биотехнологическая трансформация легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья (шелухи овса и мискантуса) в ценные продукты: биоэтанол и бактериальную наноцеллюлозу, при этом предусмотрена переработка отходов, образующихся на всех ключевых технологических стадиях. Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать новые эффективные способы предварительной обработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия в одну и две стадии.

2. Исследовать ферментативный гидролиз продуктов химической предобработки целлюлозосодержащего сырья.

3. Разработать научные основы энергоэффективной технологии биоэтанола из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья, направленной на получение высокого выхода целевого продукта.

4. Разработать промышленную технологию биоэтанола, а именно:

– технологию получения;

– техническую документацию;

– реализовать масштабирование в условиях опытно-промышленного производства;

– провести технико-экономические расчёты производства;

– осуществить применение опытных образцов (в сторонних организациях).

5. Разработать научные основы технологии получения БНЦ из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья.

6. Разработать промышленную технологию БНЦ (аналогично п.4).

## Научная новизна работы

Впервые для последующей биотехнологической трансформации предложен способ предобработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья 4 %-ной азотной кислотой, характеризующийся:

а) технологичностью – осуществляется при атмосферном давлении в стандартном емкостном оборудовании с использованием простого, доступного реактива. Стабильность и воспроизводимость результатов подтверждена многократной апробацией в условиях опытно-промышленного производства;

б) высокой реакционной способностью к ферментативному гидролизу, при этом показано, что наличие до 12,5 % кислотонерастворимого лигнина в продуктах азотнокислой обработки не снижает эффективности ферментативного гидролиза;

в) унифицированностью – эффективно работает как для шелухи овса, так и для мискантуса;

г) экологичностью – используется разбавленный раствор, растворителем является вода, осуществляется замкнутый цикл производства;

д) экономичностью – используется дешёвый реагент, и один и тот же варочный раствор может быть использован десятикратно;

е) безотходностью – отработанный раствор нейтрализуется гидроксидом аммония с получением комбинированного лигногуминового удобрения с выходом 2,2 т на 1 т сырья.

Показаны высокая эффективность одностадийной обработки  $\text{HNO}_3$  для последующих ферментативного гидролиза и получения биоэтанола и двухстадийной обработки – для получения БНЦ.

Предложен эффективный способ ферментативного гидролиза продукта азотнокислой обработки шелухи овса, при этом жидкая фракция используется как основа питательных сред в микробиологическом синтезе, а твердый остаток – для получения аморфного диоксида кремния.

Научно обоснована и разработана технология получения биоэтанола, включающая предварительную обработку целлюлозосодержащего сырья разбавленным раствором азотной кислоты, совмещение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения, подпитку субстратом и ферментными препаратами, выделение и очистку биоэтанола. Выход биоэтанола из шелухи овса составил 18,1-20,2 дал/т, из мискантуса – 25-26 дал/т.

Установлено, что образцы биоэтанола, полученные по разработанной технологии характеризуются сверхнизкими концентрациями метанола – не более 0,008 об. % в биотаноле-сырце.

Научно обоснована и разработана технология получения БНЦ, включающая двухстадийную предварительную обработку целлюлозосодержащего сырья разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия; ферментативный гидролиз; стандартизацию питательной среды по глюкозе и экстрактивным веществам чёрного чая; биосинтез БНЦ с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12; выделение, очистку, стерилизацию и

упаковывание БНЦ. Выход БНЦ влажностью 99,0 % из 1 т шелухи овса составил 1,94 т.

Научно обосновано использование в качестве продуцента БНЦ симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12, доказана способность продуцента эффективно работать на сложных гидролизных средах в нестерильных условиях без добавок витаминов, минеральных солей и стимуляторов биосинтеза;

Впервые установлено, что независимо от вида сырья и способа его предварительной обработки, культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 способна синтезировать БНЦ со стандартными структурными характеристиками: степень кристалличности составляет 86-93 %, содержание алломорфа I-альфа – 96-98 %. Это уникальные характеристики, превышающие все известные мировые аналоги.

Установлено, что образцы БНЦ, синтезированные с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12 обладают гемостатической активностью в сухом и влажном состоянии, что для БНЦ обнаружено впервые.

#### **Теоретическая значимость работы**

Научная концепция заключается в разработке фундаментальных технологических основ комплексной переработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты микробиологического синтеза. Авторская предварительная обработка сырья разбавленным раствором азотной кислоты является безотходной и позволяет получить два продукта: качественный субстрат для последующего ферментативного гидролиза и комбинированное лигногуминовое удобрение. Предложена новая энергоэффективная технология получения технического биоэтанола и сформированы научные основы новой для России отрасли – производства БНЦ.

#### **Практическая значимость работы**

Экспериментально подтверждены и масштабированы в условиях опытно-промышленного производства ИПХЭТ СО РАН технологии переработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в биоэтанол и БНЦ. Новизна технических решений подтверждена 7 патентами РФ.

С привлечением математических приемов планирования и обработки экспериментальных данных оптимизирован состав мультиэнзимной композиции, что позволило увеличить выход редуцирующих веществ в 2,0 раза. Для определения оптимальной продолжительности стадии ферментативного гидролиза перед внесением дрожжей предложена математическая модель, достоверно описывающая процессы ферментативного гидролиза и его совмещения со спиртовым брожением и позволяющая точно решить поставленную задачу. Оптимизация состава питательной среды привела к повышению выхода биоэтанола на 8,4 %. Разработка эффективного метода фермент-субстратной подпитки позволила увеличить концентрацию биоэтанола в бражке в 2,1 раза – до 5,4 об. %.

Разработана техническая документация:

– технологические прописи химической предобработки (2 шт.),

ферментативного гидролиза (1 шт.) и биосинтеза биоэтанола (3 шт.), утвержденные директором ИПХЭТ СО РАН.

– программы и методики экспериментальных исследований БНЦ (13 шт.);

– технические условия на субстраты из плодовых оболочек овса и мискантуса для биосинтеза бактериальной целлюлозы (ТУ 17.11.14-237-10018691-2018, зарег. 29.10.2018 в ФБУ «Алтайский ЦСМ»); на ферментативные гидролизаты целлюлозы плодовых оболочек овса и мискантуса (ТУ 17.11.14-238-10018691-2018, зарег. 29.10.2018 в ФБУ «Алтайский ЦСМ»); на бактериальную наноцеллюлозу из плодовых оболочек овса и мискантуса (ТУ 17.11.14-244-10018691-2019, зарегистрирован в ФБУ «Алтайский ЦСМ» рег № 009212 от 20.06.2019 г.) и лабораторные технологические инструкции на получение субстрата и ферментативных гидролизатов;

– технологическая пропись и технологический регламент получения бактериальной целлюлозы из плодовых оболочек овса и мискантуса, утвержденные директором ИПХЭТ СО РАН.

Выполнены технико-экономические расчёты. При производительности завода 10 000 дал/сутки (или 3 028 160 дал /год) биоэтанола с учётом продажи попутной продукции (комбинированного лигногуминового удобрения и углекислого газа), цена 1 л биоэтанола из шелухи овса составит 62,2 руб., из мискантуса – 53,8 руб. При производительности завода 50 т/год цена 1 кг БНЦ из шелухи овса составит 657 руб. (влажность БНЦ 99 %).

Возможность применения биоэтанола из шелухи овса и мискантуса для каталитической дегидратации в этилен подтверждена актами испытания, применения и внедрения, утвержденными директором Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН.

Возможность применения БНЦ в качестве гемостатика подтверждена актами испытания и внедрения, утвержденным директором ФГБУ ГНЦ Минздрава РФ.

Возможность применения БНЦ в хирургии подтверждена актами испытания, утвержденными ректором ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава РФ.

### **Связь работы с научными программами**

Работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ ИПХЭТ СО РАН: проект V.40.2.1 «Разработка физико-химических основ технологии получения полупродуктов и биотоплив из недревесного растительного сырья», 2010-2012; проект V.47.1.2 «Фундаментальные исследования химических и биотехнологических процессов получения новых материалов и компонентов топлив из недревесного сырья», 2013-2016; совместный интеграционный проект № 11 фундаментальных исследований ИПХЭТ СО РАН и ИХ Коми НЦ УрО РАН «Химическая, механохимическая и ферментативная деструкция целлюлозосодержащего сырья для получения ценных продуктов», 2013-2014; Проект № 5 Программы РАН 3 «Химическое обогащение возобновляемого «концентрированного» целлюлозосодержащего сырья в различных средах в реакторах под давлением», 2012-2014;

технологический проект «Технологическое оборудование для комплексной переработки растительного сырья в целлюлозосодержащие продукты и исходные компоненты для химического синтеза и биотопливо», 2014-2015; Базовый проект «Фундаментальные технологические основы биорефайнинга возобновляемого недревесного сырья», 2017-2020; проект ФНИ № 15 «Фундаментальные основы получения этилена из мискантуса» II.1 Комплексной программы фундаментальных исследований СО РАН «Междисциплинарные интеграционные исследования» на 2018-2020 гг.», блок № 15.3 «Разработка упрощенной технологии получения биоэтанола из мискантуса для синтеза этилена»; базовый проект «Фундаментальные основы создания интегрированной технологии переработки легковозобновляемого непищевого растительного сырья в востребованные экономикой РФ продукты», 2021-2023. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-48-220983 р\_а «Создание установки получения серии востребованных продуктов из недревесного растительного сырья», гранта РНФ 17-19-01054 «Фундаментальные инженерные аспекты технологии получения бактериальной наноцеллюлозы из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья», 2017-2021 гг., гранта РНФ 22-13-00107 «Фундаментальные подходы к переработке технической культуры мискантус в ценные материалы и биопродукты для снижения углеродного следа», 2022-2024 гг.

**На защиту выносятся следующие основные положения:**

1. Высокоэффективный способ предобработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья 4 %-ной азотной кислотой с получением двух продуктов: субстрата для последующей биотехнологической трансформации и комбинированного лигногуминового удобрения.

2. Промышленная технология получения безметанольного биоэтанола из шелухи овса и мискантуса.

3. Технология получения высококачественной БНЦ из шелухи овса и мискантуса с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12.

**Личный вклад автора**

Диссертационная работа представляет собой обобщение результатов теоретических и экспериментальных исследований, которые были выполнены в период с 2010 г. по 2022 г. автором непосредственно и в сотрудничестве с коллегами. Личный вклад автора включает постановку целей и задач исследований; разработку методологии проведения исследований; планирование и участие в проведении экспериментов; анализ полученных экспериментальных данных и их сопоставление с мировыми данными; подготовку научных отчетов и рукописей; обобщение результатов, формулировку выводов. Под руководством автора защищено три диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

**Апробация результатов**

Результаты работы докладывались и обсуждались на всероссийских и международных конференциях, форумах, конгрессах: «Технологии и

оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности» (Бийск, 2011-2021), «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2012, 2014, 2017, 2020), «Химия биологически активных веществ (Саратов, 2012), «Биокаталитические технологии и технологии возобновляемых ресурсов в интересах рационального природопользования» (Кемерово, 2012), «Достижения и перспективы развития биотехнологии» (Саранск, 2012), «Молодежь и наука на Севере» (Сыктывкар, 2013), «Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов» (Москва, 2012), «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015, 2018-2020), «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар, 2015, 2019), «Биотехнология и общество в XXI веке» (Барнаул, 2015), «Перспективы развития химических и биологических технологий в XXI веке» (Саранск, 2015), «Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке» (Санкт-Петербург, 2015), «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2015), «Структура и физико-химические свойства целлюлоз и нанокompозитов на их основе» (Петрозаводск, 2016), «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (Уфа, 2016), «От биопродуктов к биоэкономике» (Барнаул, 2017), «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 2019), «Новые каталитические процессы глубокой переработки углеводородного сырья и биомассы» (Красноярск, 2019), «Альтернативные источники сырья и топлива» (Минск, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021), «Химия и химическая технология переработки растительного сырья» (Минск, 2018), «Catalysis for Renewable Sources: fuel, energy, chemicals» (Lund, Sweden, 2013), «Chemical Reactors» (London, United Kingdom, 2016; Ghent, Belgium, 2018), «International Symposium on Bacterial Nano-Cellulose» (Porto, Portugal, 2019).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано более 150 работ, в том числе 72 статьи – в журналах из списка ВАК, из них 48 – в журналах, индексируемых международными базами Web of Science и Scopus, из которых 19 – Q1 и Q2; 7 патентов РФ.

### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы из 1118 наименования, 9 приложений. Общий объем диссертации составляет 492 страницы, включает 71 рисунок и 57 таблиц.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обоснована актуальность темы исследования, цель и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость.

**В первой главе** проанализированы и обобщены сведения о перспективных направлениях переработки целлюлозосодержащего сырья в продукты микробиологического синтеза, приведены классификация и химический состав целлюлозосодержащего сырья, обоснован выбор в качестве модели для исследования шелухи овса и биомассы мискантуса. Рассмотрены

существующие методы предварительной обработки целлюлозосодержащего сырья и нерешенные проблемы. Рассмотрены преимущества ферментативного гидролиза. Рассмотрена технология биоэтанола, при этом особое внимание уделено перспективам развития биоэтанола второго поколения, повышению эффективности технологии и преодолению проблемы низкой концентрации биоэтанола в бражке. Проанализирован существующий уровень науки и техники в технологии БНЦ, выявлены узкие места и направления преодоления объективно существующих проблем масштабирования, связанных с природой продуцентов БНЦ.

**Во второй главе** представлена характеристика используемого в работе сырья, ферментных препаратов, микроорганизмов-продуцентов биоэтанола, БНЦ, кормового белка, описаны аналитические методы. При проведении исследований использовались общепринятые, стандартные методы исследований; для новаторского биотехнологического продукта БНЦ был уточнен и разработан ряд методик (подготовки образцов к РЭМ, испытаний на растяжение сухих и влажных образцов, определения степени полимеризации, лиофильной сушки образцов).

Шелуха овса предоставлена ЗАО «Бийский элеватор». Мискантус (*Miscanthus sacchariflorus (Maxim.) Hack*) сорта «Сорановский» выращен в Западной Сибири (г. Новосибирск, г. Бийск).

Предобработка проводилась на опытном производстве при атмосферном давлении при температуре 90-96 °С. Использовалось стандартное емкостное оборудование объёмом 250 л, все оборудование и обвязка изготовлены из нержавеющей стали. Разовая загрузка целлюлозосодержащего сырья составляла 10 кг. Продолжительность предобработки составила 3-14 ч. На сырьё воздействовали разбавленными (4 мас. %) растворами азотной кислоты или гидроксида натрия в одну или две стадии:

1) субстрат 1 получен обработкой сырья 4 %-ным раствором азотной кислоты в одну стадию;

2) субстрат 2 получен обработкой сырья раствором 4 %-ного гидроксида натрия в одну стадию;

3) субстрат 3 получен в две стадии: путём обработки субстрата 1 раствором 4 %-ного гидроксида натрия;

4) субстрат 4 получен в две стадии: путём обработки субстрата 2 раствором 4 %-ной азотной кислоты.

Полученные субстраты промывали водой до нейтральной реакции, для получения субстратов 3 и 4 были использованы промытые субстраты 1 и 2 соответственно. Далее субстраты отжимали на вакуум-филт্রে и во влажном виде использовали в качестве субстратов для ферментативного гидролиза.

Для определения реакционной способности к ферментативному гидролизу субстраты гидролизовали в колбах Эрленмейера объёмом 250 мл при концентрации субстрата 33,3 г/л в 0,1 М ацетатном буфере (pH 4,6±0,2), при температуре (46±1) °С в течение 72 ч при непрерывном перемешивании (150

об/мин). Ферментные препараты вносились в избытке: «Целлолюкс-А» 40 мг/г субстрата, «Брюзайм ВGX» 200 мг/г субстрата.

В работе использованы микроорганизмы, приобретенные в ВКПМ: продуценты этанола *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693, Y-3137, Y-3136; продуценты БНЦ симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 и штаммы *Komagataeibacter xylinus* B-12428, B-12429, B-12431; продуценты комового белка *Pachysolen tannophilus* Y-1532, *Pichia stipitis* Y-3263, *Debariomyces castellii* Y-968.

В третьей главе представлена разработка и исследование процессов химической предварительной обработки и ферментативного гидролиза предобработанного целлюлозосодержащего сырья.

#### Предварительная химическая обработка сырья

Все четыре вида предварительной химической обработки позволяют примерно в два раза по сравнению с исходным сырьём повысить содержание целлюлозы (от 44,9 % в шелухе овса до 76,8-94,2 % в субстратах из неё и от 50,3 % в мискантусе до 79,2-95,8 % в субстратах из него) и снизить содержание нецеллюлозных компонентов, то есть являются эффективными (табл. 1).

**Таблица 1 – Химический состав сырья и субстратов из него**

Показатели	Сырьё	Субстраты			
		1	2	3	4
<b>Шелуха овса</b>					
Массовая доля (м.д.) целлюлозы, %	44,9±0,2	76,8±0,3	83,4±0,3	94,2±0,3	89,7±0,3
М.д. пентозанов, %	31,4±0,1	8,8±0,1	10,1±0,1	3,8±0,1	9,4±0,1
М.д. кислотонерастворимого лигнина, %	18,8±0,1	9,1±0,1	5,4±0,1	0,8±0,1	0,5±0,1
М.д. золы, %	4,9±0,05	5,3±0,05	1,1±0,05	1,2±0,05	0,4±0,05
Сумма гидролизуемых веществ, %	76,3±0,3	85,6±0,3	93,5±0,3	97,8±0,3	99,1±0,3
Выход из 100 кг сырья, %	100	36,2±0,1	38,3±0,1	23,0±0,1	30,6±0,1
<b>Мискантус</b>					
М.д. целлюлозы, %	50,3±0,2	79,2±0,3	86,5±0,3	95,8±0,3	92,6±0,3
М.д. пентозанов, %	22,7±0,1	7,0±0,1	9,4±0,1	2,5±0,1	6,4±0,1
М.д. кислотонерастворимого лигнина, %	21,4±0,1	9,6±0,1	3,8±0,1	1,5±0,1	0,6±0,1
М.д. золы, %	5,6±0,05	4,2±0,05	0,3±0,05	0,2±0,05	0,4±0,05
Сумма гидролизуемых веществ, %	72,3±0,3	86,2±0,3	96,0±0,3	98,3±0,3	98,0±0,3
Выход из 100 кг сырья, %	100	37,7±0,1	39,0±0,1	24,6±0,1	33,4±0,1

По содержанию целлюлозы и по содержанию гидролизуемых компонентов субстраты для обоих видов сырья можно расположить в ряд: 3>4>2>1. Отметим, что субстрат 1 характеризуется высоким остаточным содержанием лигнина: 9,1 % для шелухи овса и 9,6 % для мискантуса, а субстрат 2 – высоким остаточным содержанием гемицеллюлоз: 10,1 % для шелухи овса и 9,4 % для мискантуса и, что обусловлено особенностями воздействия на сырьё азотной кислоты и гидроксида натрия соответственно. Выходы четырех субстратов коррелируют с их химическим составом: 2>1>4>3, то есть чем чище субстрат, тем ниже его выход, что логично.

Закономерно, что и выход субстратов, и массовая доля в них целлюлозы и лигнина при использовании в качестве сырья мискантуса выше, чем при использовании в качестве сырья шелухи овса и объясняется исходным химическим составом сырья: в нативном мискантуса доля этих компонентов была выше, чем в нативной шелухе овса. Также и массовая доля пентозанов в субстратах: так как в нативной шелухе овса её больше, чем в нативном мискантуса, то и в полученных субстратах из шелухи овса пентозанов больше, чем в субстратах из мискантуса.

Можно сделать вывод о воспроизводимости результатов всех четырех способов предобработки на разных видах сырья и прогнозировать успешность их использования на других видах сырья.

*Реакционная способность к ферментативному гидролизу полученных субстратов*

Концентрация редуцирующих веществ (РВ) и выход РВ от массы субстрата в гидролизате повышается по сравнению с нативным сырьём в 5,4-6,2 раз для шелухи овса и в 6,5-7,3 раза для мискантуса (табл.2), небольшое преимущество мискантуса можно объяснить большей м.д. целлюлозы в нативном мискантуса. Отметим, что несмотря на высокое содержание в субстратах 1 лигнина, они хорошо гидролизировались для обоих видов сырья.

**Таблица 2 – Результаты ферментативного гидролиза субстратов**

Показатели	Сырьё	Субстраты			
		1	2	3	4
<b>Шелуха овса</b>					
Концентрация РВ, г/л	4,5±0,1	29,5±0,2	30,9±0,2	27,5±0,2	30,8±0,2
Выход РВ от массы субстрата, %	12,2±0,3	79,7±0,3	83,4±0,3	74,3±0,3	83,2±0,3
Концентрация ксилозы, г/л	0,1±0,05	2,0±0,1	4,4±0,1	0,3±0,1	0,9±0,1
Выход ксилозы от м.д. пентозанов в субстрате, %	1,0±0,3	79,3±0,3	71,5±0,3	44,0±0,3	38,2±0,3
<b>Мискантус</b>					
Концентрация РВ, г/л	4,1±0,1	29,8±0,2	29,6±0,2	26,7±0,2	30,0±0,2
Выход РВ от массы субстрата, %	11,1±0,3	79,0±0,3	81,2±0,3	72,1±0,3	81,0±0,3
Концентрация ксилозы, г/л	0,10±0,05	1,0±0,1	1,7±0,1	0,2±0,1	0,8±0,1
Выход ксилозы от м.д. пентозанов в субстрате, %	1,4±0,3	62,3±0,3	77,9±0,3	34,5±0,3	36,7±0,3

Вклад ксилозы в общий состав РВ в гидролизатах из шелухи овса составляет 9,0-15,7 %, из мискантуса – 0,8-5,7 %, что объясняется природой сырья: в нативной шелухе овса м.д. пентозанов высока – 31-35 %. Для обоих видов сырья наибольшая концентрация ксилозы (4,4 г/л для шелухи овса и 1,7 г/л для мискантуса) обнаружена в гидролизатах субстратов 2, что объясняется способом их получения. Использование в предобработке азотной кислоты позволяет получить преимущественно глюкозные гидролизаты из обоих видов сырья. Таким образом, для обоих видов сырья все четыре вида предобработки сырья являются эффективными для последующего ферментативного гидролиза.

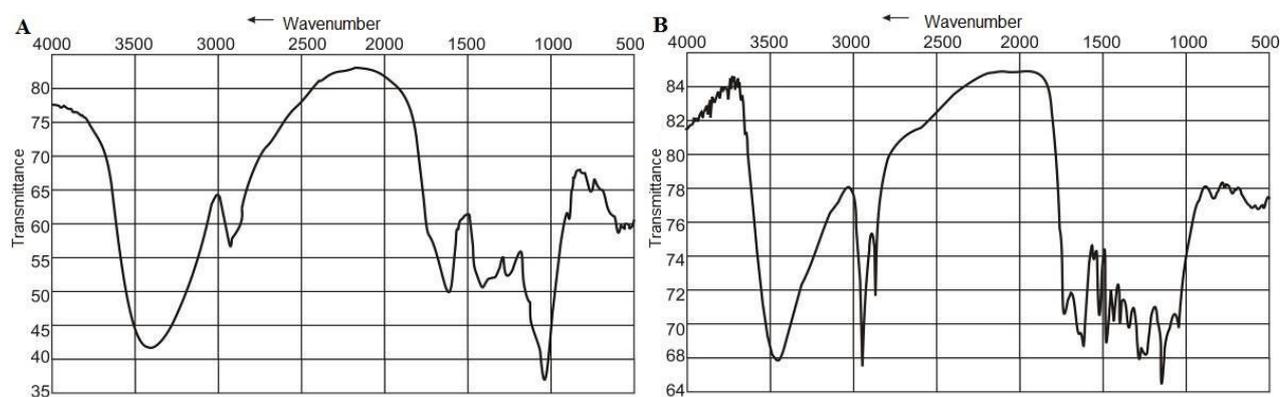
### *Азотнокислая обработка целлюлозосодержащего сырья*

Азотнокислая обработка впервые в мире предложена для предобработки целлюлозосодержащего сырья для последующих ферментативного гидролиза и конверсии гидролизатов в ценные продукты микробиологического синтеза. Детально она была изучена на примере шелухи овса.

Исследована зависимость эффективности азотнокислой обработки от концентрации  $\text{HNO}_3$  в диапазоне от 2 до 6 мас. %. Показано, что выход продукта азотнокислой обработки (ПАО) падает от 71 % для 2 %-ного раствора до 43 % для 6 %-ного раствора. При этом содержание целлюлозы меняется в обратной зависимости и повышается от 54,0 % для 2 %-ного раствора до 74,3 % для 6 %-ного раствора. Концентрация раствора 2 % позволяет увеличить выход РВ всего лишь в 2,4 раза по сравнению с нативным сырьем и, таким образом, является недостаточной, концентрация раствора 6 % позволяет увеличить выход РВ в 5,6 раз, но является избыточной, так как падает выход ПАО. Рационально использовать 4 % раствор: при этом выход ПАО от массы сырья составляет 36 %, а выход РВ от массы субстрата повышается в 6,0 раз по сравнению с нативным сырьём.

Установлено, что критической точкой в азотнокислой обработке сырья является промывка полученных субстратов. Она должна осуществляться до получения бесцветных промывных вод нейтральной реакции. Ингибитор был выделен из промывных вод ПАО шелухи овса. Наличие ингибитора в ПАО в количестве всего  $0,019 \pm 0,01$  мас. % от массы субстрата снижает эффективность ферментативного гидролиза на 27 %.

На рис.1 представлены ИК-спектры ингибитора, выделенного в результате промывки ПАО. Химическая природа ингибитора сложна. В ИК-спектрах ингибитора и нитрованного лигнина надежно идентифицируется полоса поглощения валентных колебаний связей О–Н спиртового и фенольного характера с максимумом поглощения при  $3500 \text{ см}^{-1}$ . В спектрах лигнинов наблюдается интенсивная полоса колебаний карбонильной группы ( $\text{C}=\text{O}$ ) около  $1700 \text{ см}^{-1}$ , обусловленная как наличием карбонильных групп в структуре лигнина, так и присутствием в нем ацетилированных спиртовых фрагментов.



**Рис. 1 – ИК-спектры: а – ингибитора, выделенного из ПАО шелухи овса; б – нитрованного лигнина**

При 1600 см<sup>-1</sup> регистрируется явно выраженная полоса поглощения валентных колебаний двойных связей углерод–углерод (C=C), относящихся как к связям в ароматическом кольце лигнина, так и к алифатическим фрагментам C=C. Наблюдаемое изменение интенсивностей пиков в обоих спектрах свидетельствует о деструкционных и конденсационных процессах во время нитрования и окисления лигнина. Таким образом, качественно ИК-спектр ингибитора сопоставим с ИК-спектром нитрованного лигнина, продукты деструкции лигнина являются основной составной частью ингибитора. Установлена возможность рециклизации раствора азотной кислоты. Без укрепления варочный раствор может быть использован пятикратно. При постепенном укреплении концентрации азотной кислоты до 5,6 %, варочный раствор может быть использован десятикратно. При этом м.д. лигнина в субстратах I-X не возрастает, а выход РВ от м.д. гидролизуемых компонентов субстратов I-X составляет 95-99 %.

#### *Рострегулирующая активность отработанного раствора азотной кислоты*

Исследована рострегулирующая активность раствора азотной кислоты после обработки им мискантуса на примере семян гороха. Установлено, что отработанный раствор азотной кислоты при степенях разведения от 1:100 до 1:10 000 действует как стимулятор роста семян гороха посевного: наблюдается повышение энергии прорастания и всхожести на 2-6 % по сравнению с контролем (водой) и стимулируется рост корней на 21-29 %, то есть, проявляется ауксиноподобное ростстимулирующее действие. Таким образом, отработанный раствор азотной кислоты является комбинированным лигногуминовым удобрением, его выход составляет 2,2 т на 1 т сырья.

#### *Соответствие азотнокислого способа мировым критериям*

**Таблица 3 – Критерии идеальной предобработки и соответствие им азотнокислого способа**

№	Идеальная предобработка [Gaurav 2017; Zabed 2019]	Азотнокислая предобработка
1	Повышение реакционной способности к ферментативному гидролизу	да (в 6,5-7,3 раза)
2	Малые потери целлюлозы и гемицеллюлоз	нет (34-40 %) да (88-90 %)
3	Отсутствие ингибиторов	да (нитрованный лигнин не ингибитор)
4	Низкие расходы энергии	да (атмосферное давление, 94–96°C)
5	Высокий выход субстрата	нет (36-38 %)
6	Низкие побочные продукты	да (побочный продукт является удобрением)
7	Низкое потребление химических веществ	да (10 кратная рециркуляция)

В табл. 3 приведены критерии так называемой идеальной предобработки, при этом разработчики критериев подчеркивают, что идеальной предобработки

не существует. Азотнокислый способ соответствует 5,5 критериям из 7,0, что позволяет утверждать, что это новый эффективный способ предобработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья, который успешно может быть внедрён в промышленности.

#### *Кинетика ферментативного гидролиза при различных концентрациях субстрата*

Установлено, что кинетика процессов ферментативного гидролиза ПАО шелухи овса и мискантуса может быть описана математической моделью, полученной по модифицированному уравнению Михаэлиса-Ментен. На основе экспериментальных данных определены основные константы, характеризующие кинетику процесса ферментативного гидролиза обоих субстратов. Рассчитаны значения равновесных концентраций РВ для двух ПАО в зависимости от их начальной концентрации. Показано, что начальная скорость процесса гидролиза ПАО шелухи овса выше на 1 г/(л•ч), чем для ПАО мискантуса независимо от концентрации субстрата в диапазоне от 33,3 до 120,0 г/л. Выход РВ существенно зависит от начальной концентрации субстратов. Для обоих ПАО при увеличении начальной концентрации субстрата с 33,3 г/л до 120,0 г/л наблюдается снижение выхода РВ в 1,5-2,0 раза, что обусловлено субстратным ингибированием. При низких начальных концентрациях выход РВ сопоставим для обоих продуктов. При повышении начальной концентрации субстрата до 120,0 г/л выход РВ из ПАО мискантуса превышает примерно на 20 % аналогичный показатель ПАО шелухи овса.

#### *Оптимизация состава мультиэнзимной композиции*

С целью повышения эффективности ферментативного гидролиза ПАО шелухи овса проведена оптимизация состава мультиэнзимной композиции (МЭК). Исследовались композиции, состоящие из промышленных ферментных препаратов «Целлолюкс-А», «Брюзайм ВГХ» и «Ультрафло Коре». Применено симплекс-центроидное планирование опытов для трехкомпонентного состава МЭК. В результате решения задачи оптимизации методом приведенного градиента найдено, что максимальная конечная концентрация РВ достигается при следующих активностях ферментных препаратов: для «Целлолюкс-А»: целлюлазная активность – 36 ед. ЦлС/г, ксиланазная – 14 ед. КС/г, β-глюканазная – 27 ед. β-ГКС/г; для «Ультрафло Коре»: целлюлазная активность – 38 ед. ЦлС/г, β-глюканазная – 87 ед. β-ГКС/г; «Брюзайм ВГХ» не требуется. Найденное соотношение позволило повысить концентрацию РВ □ в 2 раза.

#### *Исследование неорганических компонентов шелухи овса и продуктов ее химической и ферментативной трансформации*

В результате озоления воздушно-сухих навесок образцов шелухи овса, ПАО и твердого остатка, остающегося после ферментативного гидролиза ПАО, получено три образца золы с выходом 4,93 %; 5,35 % и 58,16 % от навесок вышеуказанных образцов соответственно.

Установлено, что основным веществом в образцах золы является диоксид кремния, состояние (кристаллическое или аморфное) и содержание которого (83–98%) зависят от условий извлечения. Наиболее чистым является аморфный кремнезем в остатке, образующемся после ферментативного гидролиза.

Показана возможность полного использования органических и минеральных компонентов при ферментативном гидролизе: жидкая фракция используется как основа питательных сред в микробиологическом синтезе, а твердый остаток – для получения аморфного диоксида кремния с выходом 17,4 кг из 1 т шелухи овса.

**В четвёртой главе** исследована и разработана технология получения биоэтанола из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья

*Спиртовое брожение в зависимости от способа предварительной химической обработки сырья*

Начальная концентрация субстратов составляла 60 г/л. По выходу РВ в результате ферментативного гидролиза субстраты в порядке убывания можно расположить в ряд: 4≥1>2>3 для обоих видов сырья (табл.4) . Это хорошо коррелирует с тестовым ферментативным гидролизом (табл. 2).

**Таблица 4 – Спиртовое брожение в зависимости от способа предварительной химической обработки двух видов сырья**

Показатели	Субстраты			
	1	2	3	4
<b>Шелуха овса</b>				
Выход на стадии предварительной химической обработки, %	36,2±0,2	38,3±0,2	23,0±0,1	30,6±0,2
Концентрация РВ, г/л	48,8±0,2	45,4±0,2	41,6±0,2	50,0±0,2
Выход РВ, % от массы субстрата	73,2±0,3	68,1±0,3	62,5±0,3	75,0±0,3
Концентрация остаточных РВ, г/л	7,7±0,2	9,0±0,2	3,2±0,2	6,1±0,2
Крепость бражки, об. %	2,1±0,1	1,8±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1
Выход биоэтанола %, от концентрации РВ	66,5±0,3	61,2±0,3	88,9±0,3	74,1±0,3
Выход биоэтанола, % от массы субстрата	48,7±2,3	41,9±2,3	55,8±2,3	55,8±2,3
Выход биоэтанола из 1 т сырья, дал	17,6±0,8	16,1±0,9	12,8±0,5	17,1±0,7
<b>Мискантус</b>				
Выход на стадии предварительной химической обработки, %	37,7±0,2	39,0±0,2	24,6±0,1	33,4±0,2
Концентрация РВ, г/л	43,6±0,2	43,7±0,2	39,8±0,2	49,5±0,2
Выход РВ, % от массы субстрата	65,5±0,3	65,5±0,3	59,7±0,3	74,2±0,3
Концентрация остаточных РВ, г/л	6,7±0,2	7,8 ±0,2	2,1±0,2	5,2±0,2
Крепость бражки, об. %	1,8±0,1	1,6±0,1	1,6±0,1	1,9±0,1
Выход биоэтанола %, от концентрации РВ	58,8±0,3	57,1±0,3	61,5±0,3	59,4±0,3
Выход биоэтанола, % от массы субстрата	41,8±2,3	37,2±2,3	37,2±2,3	44,2±2,3
Выход биоэтанола из 1 т сырья, дал	15,8±0,9	14,6±0,9	9,2±0,6	14,7±0,8

По выходу биоэтанола на стадии брожения (от концентрации РВ) субстраты в порядке убывания можно расположить в ряд: 3>4>1>2. Это вполне

закономерно, так как субстраты 3 и 4 получены двухстадийно и являются химически чистыми, поэтому в них нет технологически вредных веществ.

Решающее значение для выхода биоэтанола имеют не ферментативный гидролиз и спиртовое брожение, а стадия предварительной обработки. Именно она определяет и экономичность процесса, и поведение субстратов в процессах ферментативного гидролиза и спиртового брожения. С её учётом по выходу биоэтанола субстраты в порядке убывания можно расположить в ряд: 1>4>2>3. То есть, наиболее эффективным способом предобработки сырья следует считать одностадийную азотнокислую обработку.

Выход биоэтанола из субстратов, полученных из шелухи овса выше, чем выход биоэтанола из субстратов, полученных из мискантуса на 10-26 %, что объясняется природой сырья.

Качественные показатели биоэтанола-сырца приведены в табл. 5. По сравнению со спиртом-сырцом из пищевого сырья в опытных образцах больше альдегидов (в 1,7-23,7 раз) и эфиров (в 1,1-5,0 раз), но меньше сивушных масел (в 1,2-6,6 раз) и метанола (в 16,3-43,3 раз). Парадоксально низкое содержание метанола обусловлено способом получения биоэтанола. Можно констатировать, что именно ферментативный гидролиз позволяет получить из технического сырья биоэтанол с отсутствием в его составе маркера технического спирта – метанола. В мировой литературе приводится только доля метанола в очищенных образцах биоэтанола – она находится на одном уровне с долей метанола в представленных в данной работе образцах биоэтанола-сырца [Habe, 2013].

Одностадийные способы подготовки субстратов 1 и 2 приводят к увеличению содержания примесей в биоэтаноле по сравнению с двухстадийными, что косвенно свидетельствует о низкой доброкачественности питательных сред на их основе. Зависимости количества содержания примесей в биоэтаноле от вида сырья не выявлено.

**Таблица 5 – Качественные показатели биоэтанола-сырца в зависимости от способа предварительной химической обработки двух видов сырья**

Показатель, в пересчете на безводный спирт	Субстраты			
	1	2	3	4
<b>Шелуха овса</b>				
Массовая концентрация альдегидов, мг/дм <sup>3</sup>	3800±200	7100±500	500±200	2600±700
Массовая концентрация эфиров, мг/дм <sup>3</sup>	1000±200	2100±200	600±200	750±100
Массовая концентрация сивушного масла, мг/дм <sup>3</sup>	1700±100	2700±500	2500±500	3100±500
Содержание метанола, об. %	0,005± 0,001	0,006± 0,001	0,003± 0,001	0,003± 0,001
<b>Мискантус</b>				
Массовая концентрация альдегидов, мг/дм <sup>3</sup>	1500±200	1500±300	1000±300	1500±300
Массовая концентрация эфиров, мг/дм <sup>3</sup>	800±200	3300±200	900±100	700±100
Массовая концентрация сивушного масла, мг/дм <sup>3</sup>	2600±100	4600±500	2500±500	2800±500
Содержание метанола, об. %	0,008± 0,001	0,008± 0,001	0,007± 0,001	0,007± 0,001

### *Совмещение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения*

После совмещения биокаталитических стадий по выходу биоэтанола субстраты в порядке убывания можно расположить в ряд: 1>2>4>3 для обоих видов сырья. Совмещение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения для одностадийно полученных субстратов 1 и 2 приводит к повышению выхода биоэтанола на 16,7-18,8 %, для двухстадийно полученных субстратов 3 и 4 – на 4,2-6,2 %; к снижению содержания примесей в биоэтаноле на 30-50 % (табл. 6); к сокращению продолжительности процесса в целом в 1,5 раза; к исключению стадии фильтрации или сепарирования гидролизата, в результате чего упрощается задача масштабирования.

**Таблица 6 – Содержание примесей в опытных образцах биоэтанола-сырца при совмещении биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения (субстрат 1)**

Показатель, в пересчете на безводный спирт	Шелуха овса	Мискантус
Массовая концентрация альдегидов, мг/дм <sup>3</sup>	2600±200	1000±200
Массовая концентрация эфиров, мг/дм <sup>3</sup>	650±100	500±100
Массовая концентрация сивушного масла, мг/дм <sup>3</sup>	1200±200	2400±200
Содержание метанола, об. %	0,002±0,001	0,002±0,001

### *Отбор штаммов сахаромыцетов для получения биоэтанола*

При совмещении биокаталитических стадий на субстрате 1 из шелухи овса биоэтанол получен с использованием *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693, Y-3136 и Y-3137. Получены концентрации бражек 2,2 г/л, 2,4 г/л и 2,1 г/л соответственно. Выбран Y-1693 в силу его устойчивости к неблагоприятным гидролизным средам, перспективный Y-3136 будет исследован дополнительно.

### *Оптимизация продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза перед совмещением ее со спиртовым брожением*

Продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза варьировалась от 8 ч до 48 ч (опыты 1-5); опыт 6 (72 ч) представлял собой последовательное проведение стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения и являлся контрольным опытом (табл. 7).

По результатам получения биоэтанола с варьированием времени совмещения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения построена математическая модель (подробности в диссертации). Сравнение результатов математического моделирования с экспериментальными данными представлено на рис. 3, на котором наблюдается хорошая сходимость результатов. Графическое представление выхода биоэтанола, рассчитанного по модели, при совмещении двух процессов представлено на рис. 4.

**Таблица 7 – Зависимость степени конверсии субстрата от продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза**

Номер опыта	1	2	3	4	5	6
Продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза ( $t_0$ ), ч	8±0,5	15±0,5	24±0,5	39±0,5	48±0,5	72±0,5
Концентрация редуцирующих веществ в момент внесения дрожжей, г/л	17,0±0,2	24,6±0,2	29,1±0,2	32,5±0,2	34,3±0,2	34,8±0,2
Степень гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз субстрата в момент внесения дрожжей, %	27,6±0,2	40,0±0,2	47,3±0,2	52,8±0,2	55,7±0,2	56,6±0,2
Концентрация остаточных редуцирующих веществ после брожения, г/л	9,0±0,2	7,7±0,2	5,7±0,2	5,7±0,2	5,8±0,2	9,0±0,2
Крепость бражки, % об.	0,9±0,1	1,3±0,1	1,9±0,1	1,8±0,1	1,7±0,1	1,4±0,1
Выход биоэтанола от массы целлюлозы в субстрате, %	24,9±0,2	35,9±0,2	52,5±0,2	49,7±0,2	47,0±0,2	38,7±0,2
Выход биоэтанола, дал/т шелухи овса	5,2	7,5	11,0	10,4	9,8	8,7

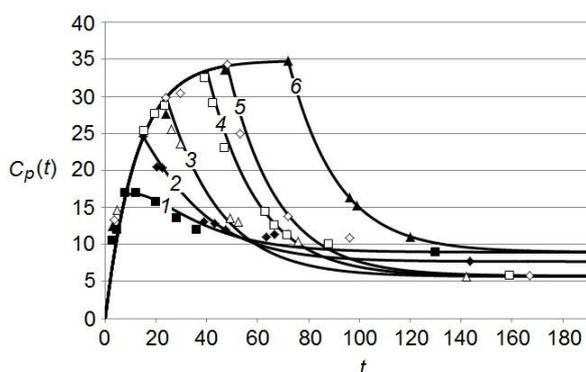


Рис. 3 Зависимости концентрации редуцирующих веществ ( $C_p(t)$ , г/л) от продолжительности процесса ( $t$ , ч)  
 1)  $t_0=8$  ч; 2)  $t_0=15$  ч; 3)  $t_0=24$  ч; 4)  $t_0=39$  ч; 5)  $t_0=48$  ч; 6)  $t_0=72$  ч; точки – экспериментальные данные; линии – теоретические

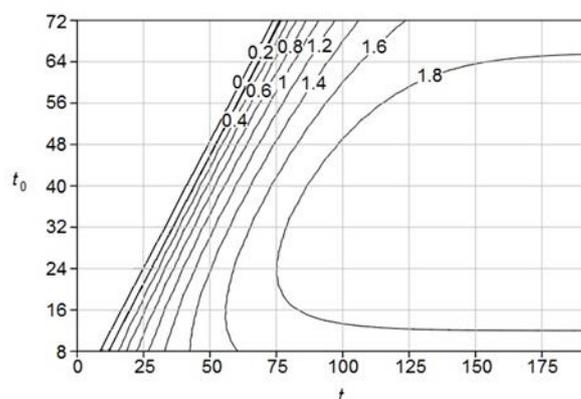


Рис. 4 Зависимость концентрации биоэтанола (% об.), рассчитанной по модели, от общей продолжительности процесса ( $t$ , ч) и времени внесения дрожжей ( $t_0$ , ч)

В качестве параметра оптимизации при совмещении процессов ферментативного гидролиза со сбраживанием рассматривался минимум общей продолжительности процессов, при котором выход биоэтанола от массы субстрата составляет не менее 45 %. Решение задачи оптимизации выполнялось методом обобщенного приведенного градиента. Минимальная продолжительность совместного проведения двух процессов, при котором достигается требуемый выход биоэтанола составляет 72 ч, что обеспечивается внесением дрожжей через 24 ч от начала ферментативного гидролиза.

*Оптимизация состава питательной среды на основе ферментативного гидролизата стимуляторами биосинтеза этанола*

Применено ортогональное центральное композиционное планирование. Согласно плану полного трехфакторного эксперимента, исследовалось влияние на выход биоэтанола таких факторов, как концентрации сульфата аммония (нижняя и верхняя границы 0 г/л и 4 г/л), монофосфата калия (0 г/л и 4 г/л) и дрожжевого экстракта (0 г/л и 20 г/л). После реализации плана был установлен нелинейный характер функции отклика, для уточнения вида искомой функции были проведены дополнительные эксперименты. Выход биоэтанола в опытах варьировал от 59,3 % до 88,9 %.

Адекватность выражения, полученного методом наименьших квадратов, была подтверждена по критерию Фишера при уровне значимости 0,05. Доверительный интервал для выхода биоэтанола составил  $\pm 0,05$ . В результате решения задачи оптимизации установлено, что для достижения максимального выхода и концентрации биоэтанола необходимо обеспечить следующие начальные концентрации: сульфата аммония – 1,82 г/л; монофосфата калия – 0,98 г/л, дрожжевого экстракта – 6,47 г/л. При указанных концентрациях выход биоэтанола составила 89,9 %, что выше выхода биоэтанола на нативном гидролизате на 8,4 %.

*Применение метода фермент-субстратной подпитки при получении биоэтанола*

Проведено 3 серии опытов с применением фермент-субстратной подпитки до концентрации субстрата 90 г/л, 120 г/л и 150 г/л по сухим веществам в сравнении с опытом без подпитки при концентрации субстрата 60 г/л (табл. 8). Субстрат – ПАО шелухи овса. Опыты проводились в ферментере объемом 11 л. Начальная концентрация субстрата во всех опытах составила 60 г/л, одновременно с субстратом вносилась мультиэнзимная композиция, рассчитанная на порцию субстрата. Подпитка (30 г/л субстрата) осуществлялась через 4 ч от начала ферментативного гидролиза, или от предыдущей подпитки. Дрожжи вносились спустя 16 ч после внесения последней порции субстрата.

**Таблица 8 – Фермент-субстратная подпитка (опыты 2-4) и контрольный опыт (1, без подпитки)**

Опыт	Общая концентрация субстрата (г/л)	Концентрация редуцирующих веществ и глюкозы в момент внесения дрожжей (г/л)	Общая продолжительность процесса, ч	Остаточная концентрация редуцирующих веществ, глюкозы (г/л)	Концентрация биоэтанола (% об.)	Выход биоэтанола (%)
1	60	40,0 / 23,1	112	4,7 / 0,3	2,4	68,3
2	90	55,5 / 39,0	116	3,9 / 0,0	3,4	64,5
3	120	70,5 / 46,5	120	7,4 / 0,3	4,0	56,9
4	150	83,0 / 58,9	128	8,3 / 0,3	5,1	58,0

Выход биоэтанола с повышением концентрации субстрата от 60 г/л до 90 г/л падает на 3,8 %, до 120-150 г/л – снижается еще на 7,6-6,5 %. Это объясняется явлением субстратного ингибирования, трудностью массопереноса целлюлолитических ферментов в высоковязкой суспензии субстрата, необратимой адсорбцией ферментов на поверхности субстрата, ингибирующим эффектом образующихся сахаров.

Сравнивая опыт 4 при наибольшей загрузке субстрата с опытом 1 без фермент-субстратной подпитки, можно заключить, что в результате повышения концентрации субстрата в 2,5 раза было достигнуто повышение концентрации биоэтанола в 2,1 раза, но при этом выход биоэтанола снизился на 10,3 %. Несмотря на работу с вязкой и в тоже время рыхлой реакционной массой, достигнуты рабочие режимы перемешивания и преодолены ограничения массо- и теплопереноса. Подпитка позволила повысить концентрацию субстрата при использовании исходного оборудования. Таким образом, найден компромисс между повышением концентрации биоэтанола в бражке (при повышении концентрации субстрата) и снижением его выхода.

#### *Переработка отходов производства биоэтанола*

После биосинтеза биоэтанола с помощью сахаромикетов остаются неутилизованными пентозы, особенно много их остается в субстратах 2, что объясняется особенностями химизма щелочной делигнификации целлюлозосодержащего сырья. Барда, полученная при переработке субстратов 2 из шелухи овса и мискантуса, была использована для получения биомассы кормовых дрожжей.

Установлено, что *Pichia stipitis* Y-3263 хорошо наращивает биомассу на барде из шелухи овса: эффективность конверсии РВ составляет ~91%, эффективность конверсии ксилозы ~43%, общая численность клеток 365 млн. КОЕ/мл. Для продуцентов *Pachysolen tannophilus* Y-1532 и *Debariomyces castellii* Y-968 эффективность биосинтеза биомассы дрожжей снижается на 10-12 %. Мискантусные среды оказались биологически недоброкачественными: численность клеток на них снижается в 2-18 раз, по сравнению со средами из шелухи овса, они не рекомендуются для биосинтеза на них биомассы кормовых дрожжей.

#### *Разработка промышленной технологии получения биоэтанола*

Научно обоснована и разработана технология получения биоэтанола, включающая предварительную обработку целлюлозосодержащего сырья разбавленным раствором азотной кислоты, совмещение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения, подпитку субстратом и ферментными препаратами, выделение и очистку биоэтанола.

Разработана техническая документация: технологические прописи химической предобработки (2 шт), ферментативного гидролиза (1 шт.) и биосинтеза биоэтанола (3 шт.), утвержденные директором ИПХЭТ СО РАН.

### Масштабирование получения биоэтанола

В реализованной технологической линии в условиях опытно-промышленного производства ИПХЭТ СО РАН в емкостном оборудовании от 250 л до 63 л масштабированы основные операции трансформации целлюлозосодержащего сырья в биоэтанол с сохранением на каждой технологической стадии выходов полупродуктов, полученных при лабораторных исследованиях.

Из шелухи овса биоэтанол был получен после её предобработки способами 1 и 2 без подпитки и с подпиткой; из мискантуса биоэтанол получен после его обработки способом 1 в условиях фермент-субстратной подпитки (табл. 9).

**Таблица 9 – Получение биоэтанола в 63-л реакторе**

Показатель	Шелуха овса			Мискантус, HNO <sub>3</sub>	
	NaOH	HNO <sub>3</sub>	HNO <sub>3</sub>	1	2
Концентрация субстрата, г/л	60±0,1	60±0,1	150±0,1	100±0,1	100±0,1
Фермент-субстратная подпитка	нет	нет	60→90→ 120→150	80→100	80→100
Крепость бражки, об. %	2,2±0,1	2,4±0,1	5,4±0,1	4,80±0,1	5,00±0,1
Концентрация остаточных РВ, г/л	8,9±0,1	5,0±0,1	7,1±0,1	7,3±0,1	7,9±0,1
Выход биоэтанола, % от массы субстрата	51,2±2,3	55,8±2,3	50,0±0,5	66,7±1,4	69,5±1,4
Выход биоэтанола из 1 т сырья, дал	19,6±0,9	20,2±0,8	18,1±0,4	25,0±0,5	26,0±0,5
Примечание: 1 – биосинтез без добавок, 2 – с внесением питательного раствора					

При сравнении с данными табл. 3 масштабирование (с совмещением биокаталитических стадий) позволило повысить выход из шелухи овса: из субстрата 1 – на 2,6 дал/т, из субстрата 2 – на 3,5 дал/т, что свидетельствует об успешном масштабировании получения биоэтанола. Выход биоэтанола для двух одностадийных способов различается на 3 %, что несущественно. Применение HNO<sub>3</sub> для предобработки сырья снизило содержание сивушных спиртов и альдегидов в биоэтаноле-сырце в ~10 раз по сравнению с применением NaOH (общее содержание примесей составило 0,49 % против 3,66 %) и исключило его загрязнение Na-ионами (~0,6 мкг/л).

Несмотря на снижение выхода биоэтанола на 10,4 % для субстрата 1 из шелухи овса, использование фермент-субстратной подпитки позволило повысить концентрацию бражки с 2,4 об. % до 5,4 об. %, то есть на 125 %, что является прорывным результатом при работе с высоковязкими суспензиями, к которым относится суспензия из шелухи овса.

Полученные выходы биоэтанола; 20,2 дал на 1 т шелухи овса при использовании субстрата 1 и 19,6 дал на 1 т шелухи овса при использовании субстрата 2 превышают выход гидролизного спирта из древесины – 17 дал/т [Холькин, 1989] на 15-18 % и в 3,5-5,6 раз превышают мировой аналог – 5,7 дал на 1 т шелухи овса [Chaud, 2012].

Выход биоэтанола из продукта азотнокислой обработки мискантуса без внесения питательного раствора в среду составил 25 дал/т, с внесением

питательного раствора – 26 дал/т, что соответствует ведущему мировому результату [Zhang, 2018].

Добавление питательного раствора привело к снижению общего содержания примесей в биоэтаноле-сырце на 20 % (до 0,64 %) за счет снижения альдегидо-эфирной фракции в ~1,8 раза; при этом содержание сивушных масел увеличивается в 1,2 раза, что объясняется внесением азотистых веществ, которые стимулируют биосинтез сивушных масел.

#### *Применение биоэтанола для каталитической конверсии в этилен*

Полученные в условиях опытно-промышленного производства образцы биоэтанола (табл.8) были переданы в Институт катализа им. Г.К. Борескова (г. Новосибирск) для исследования возможности их применения в процессе каталитической дегидратации в этилен. Согласно полученным в ИК СО РАН результатам, прогнозируемый выход этилена в условиях производства в трубчатом реакторе составит ~55-67 кг на 1 т шелухи овса, ~110-115 кг на 1 т мискантуса. При этом наличие в биоэтаноле-ректификате примесей сивушных масел в количестве менее 1 г/л приводит к повышению выхода этилена ~5 % и улучшению его качества. Установлено, что при щелочной делигнификации остаточные ионы натрия переходят в биоэтанол (~0,6 мкг/л) и снижают выход этилена на 24-36 %, поэтому для последующей трансформации в этилен рекомендовано целлюлозосодержащее сырьё подвергать азотнокислой обработке. На проведенную работу получены акты испытания, применения и внедрения.

#### *Технико-экономическая оценка от внедрения разработанной технологии биоэтанола в промышленном производстве*

Рассчитана проектная производственная калькуляция себестоимости биоэтанола. При производительности завода 10 000 дал/сутки (или 3 028 160 дал/год) биоэтанола с учётом продажи попутной продукции (комбинированного лигногуминового удобрения и углекислого газа), цена 1 л биоэтанола из шелухи овса составит 62,2 руб., из мискантуса – 53,8 руб., что соответствует мировому уровню.

**В пятой главе** исследована и разработана технология получения БНЦ из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья.

#### *Условия биосинтеза БНЦ продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12*

Условия биосинтеза были исследованы на полусинтетической глюкозной среде с добавлением экстракта чёрного чая. Установлено, что симбиотическая культура не нуждается в поддержании рН среды, а дозировка инокулята должна составлять 10 %. Концентрация глюкозы в питательной среде, обеспечивающая наибольший выход БНЦ, составляет 20-25 г/л; температура 24-27 °С; соотношение объёма питательной среды к объёму воздуха 1:10, содержание экстрактивных веществ черного чая в питательной среде в пределах 1,6-4,8 г/л

(что соответствует норме закладки сухого чёрного чая 5-15 г/л). При исследованиях биосинтеза БНЦ на гидролизных средах соблюдались выявленные оптимальные условия.

*Особенности биосинтеза БНЦ в зависимости от способа предварительной химической обработки и вида сырья*

Особенности биосинтеза БНЦ в зависимости от способа предварительной химической обработки на примере шелухи овса проиллюстрированы на рис.5, для мискантуса зависимости носят похожий характер и не приводятся. В результате исследования процесса биосинтеза БНЦ на ферментативных гидролизатах шелухи овса и мискантуса с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 установлено следующее:

1) количество клеток микроорганизмов в питательных средах в порядке убывания можно расположить в ряды: 3>4>2 >1 для обоих видов сырья. Количество уксуснокислых бактерий является маркером биосинтеза БНЦ, таким образом, самыми биологически доброкачественными являются среды, полученные из субстратов 3 для обоих видов сырья, поэтому можно прогнозировать на них высокие выходы БНЦ;

2) исходное значение рН на питательных средах находилось в диапазоне 4,0-4,5, а в процессе снижалось до уровня 3,0-3,7, что свидетельствует о накоплении органических кислот в процессе метаболизма *Medusomyces gisevii* Sa-12;

3) утилизация РВ на питательных средах ферментативных гидролизатов происходила в два периода. В первый период быстрая утилизация РВ связана с увеличением количества клеток в питательной среде. Во второй период РВ медленно расходовались на метаболические процессы. Наибольшее количество неутилизованных РВ наблюдается для культуральной среды из субстратов 2, что связано с высоким содержанием в ней ксилозы и обусловлено способом предварительной химической обработки. Ксилоза может медленно использоваться продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12;

4) по выходу БНЦ питательные среды можно расположить в порядке убывания в ряды: 3>4>2>1 для обоих видов сырья. Через 14 сут. для шелухи овса крайние значения выхода БНЦ в представленном ряду составили 10,0 % и 3,6 %; для мискантуса – 6,4 % и 5,0 % соответственно. При дальнейшем продолжении культивирования с 14 до 24 сут. на средах, полученных двустадийной обработкой (3 и 4) выход сохраняется, а на средах, полученных одностадийной обработкой (1 и 2) снижается для обоих видов сырья. Снижение составляет от 45 % (для ПОО), до 78 % (для мискантуса) что указывает на процессы деструкции, которые обусловлены ингибиторами, оставшимися в питательной среде после энзиматического гидролиза субстратов, полученных одностадийно. Максимальный выход БНЦ достигнут на среде из субстрата 3 шелухи овса и соответствует выходу БНЦ на синтетической питательной среде – 10 % от концентрации РВ в среде, при этом выход на мискантусной среде на 36 % ниже – 6,4 %.

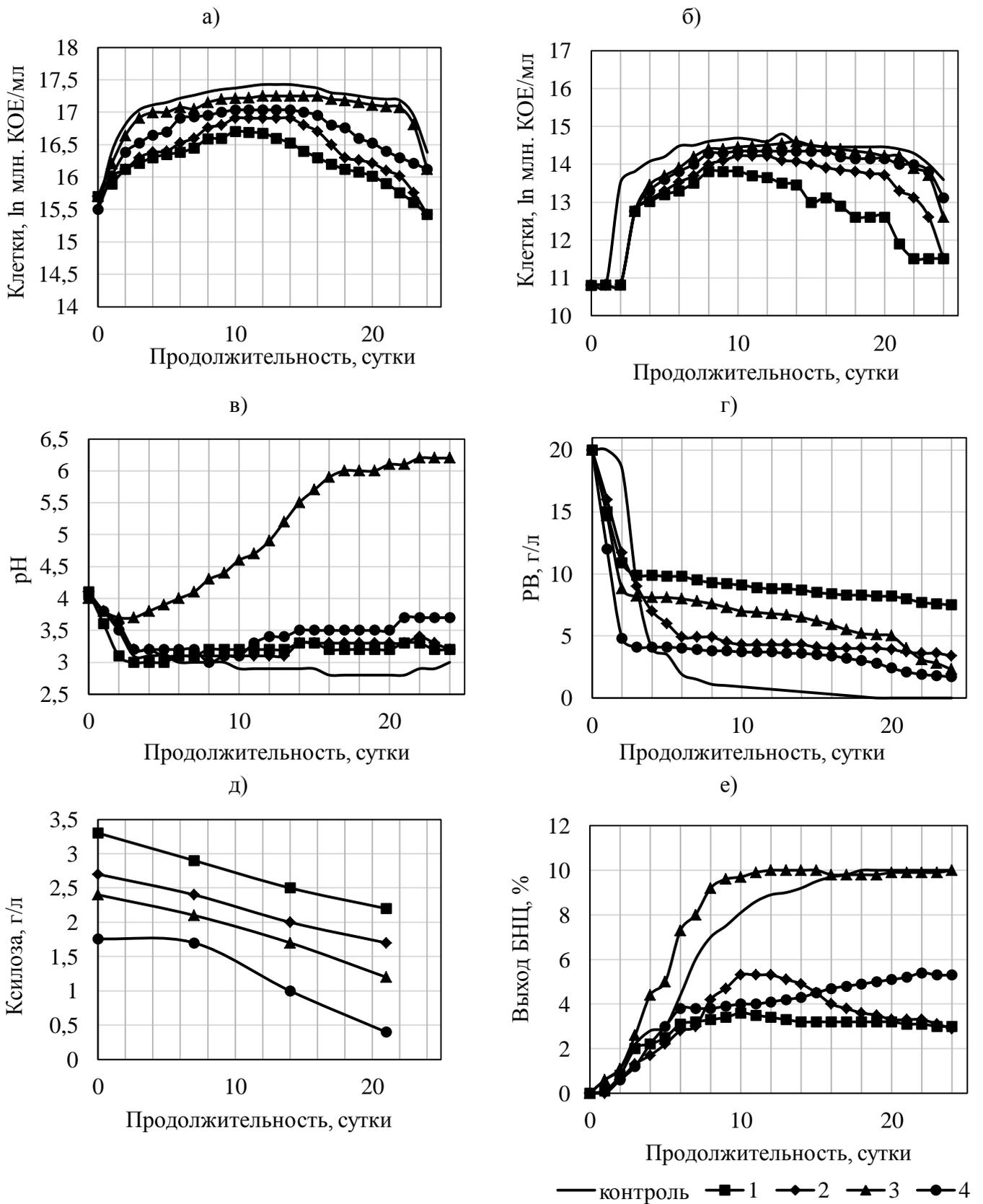


Рис. 5 Биосинтез БНЦ на средах ферментативных гидролизатов шелухи овса  
 а) количество дрожжей; б) количество уксуснокислых бактерий; в) активная кислотность; г) концентрация глюкозы; д) концентрация ксилозы; е) выход БНЦ

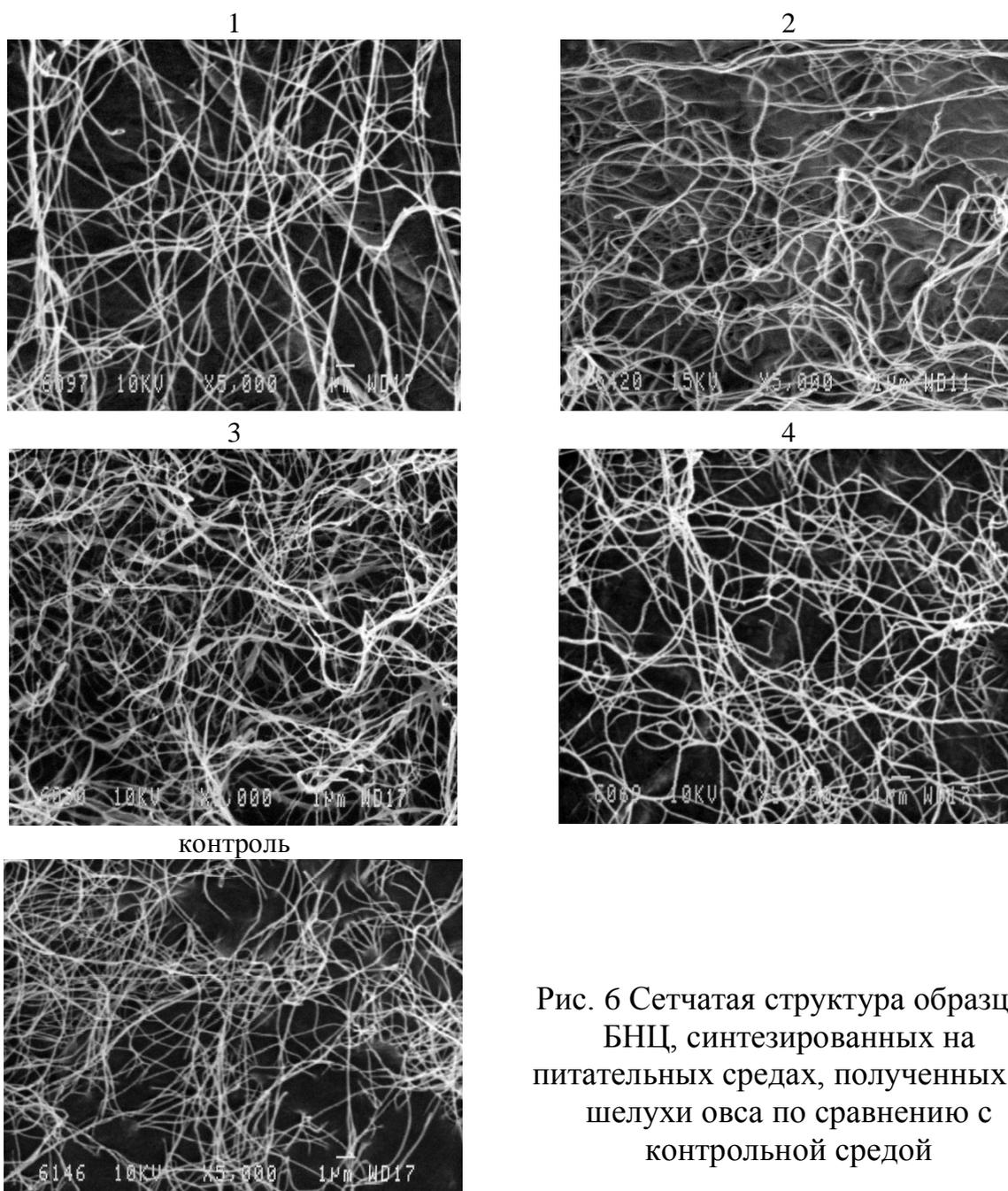


Рис. 6 Сетчатая структура образцов БНЦ, синтезированных на питательных средах, полученных из шелухи овса по сравнению с контрольной средой

Полученные выходы БНЦ относительно невысоки: лучший результат 10 % на субстрате 3 из шелухи овса, что значительно меньше, чем описанные в литературе [Hong, 2012; Yang, 2013; Chen, 2013; Cavka, 2013; Tsouko, 2015; Guo, 2016; Jahan, 2017; Dubey, 2018; Hussain, 2019]. В значительной степени это связано с используемым продуцентом – симбиотической культурой *Medusomyces gisevii* Sa-12, очевидно, что часть субстрата расходуется нецелевым образом, на метаболизм не синтезирующих БНЦ микроорганизмов, входящих в состав консорциума. Однако, это оправданные расходы, так как достигается эксклюзивное качество БНЦ, о чем пойдет речь далее. В тоже время, полученные нами результаты находятся примерно на одном уровне с результатами, приведёнными в таких работах, как [Gomes, 2013; Cheng, 2017; Kuo, 2017]. Наконец, достигнутые результаты превышают результаты,

представленные в работах [Goelzer, 2009; Carreira, 2011, Fan, 2016], несмотря на использование в приведенных работах индивидуальных штаммов.

#### *Характеристики образцов БНЦ*

Исследования методом ИК-спектроскопии показали (спектры не приводятся), что все полученные образцы БНЦ являются химически чистой целлюлозой.

Наноразмерность БЦ и особенности её 3D-архитектуры в виде неупорядоченных переплетений позволяют идентифицировать, что представленная целлюлоза имеет бактериальное происхождение [Gama, 2016]. Для опытных образцов БНЦ визуализация представлена на рис. 6. Изменения сырья и способа его химической предобработки не вызывает изменений структуры БНЦ.

**Таблица 10 – Основные физико-химические характеристики образцов БНЦ, полученных на средах из шелухи овса**

Характеристика	Конт- роль	1	2	3	4
Выход БЦ, % от концентрации РВ в среде	10,0	3,6	5,3	10,0	4,0
Выход БЦ, % от массы сырья	–	1,00	1,63	1,64	0,98
Концентрации алломорфов целлюлозы и степень кристалличности, определенные методом РСА					
I $\alpha$ - алломорф, %	100	100	100,0	100,0	93,6
I $\beta$ - алломорф, %	–	–	–	–	6,4
Степень кристалличности, %	86	90	88	93	89
Степень полимеризации в зависимости от продолжительности биосинтеза БНЦ					
7 суток	2600	1090	1430	1760	2010
14 суток	2200	970	910	1450	1520
21 сутки	2000	750	730	1090	1380
Прочностные характеристики					
Прочность при разрыве, МПа	33,16	56,7	10,7	26,2	45,3
Условный предел текучести, МПа	5,6	4,7	2,8	3,7	4,4
Относительное удлинение при максимальной нагрузке, %	1,5	1,6	2,2	1,7	1,7
Относительное удлинение при пределе текучести, %	0,6	0,7	0,9	0,7	0,8
Толщина образца, мкм	20	20	20	50	30
Модуль Юнга, МПа	933	671	311	529	550
Сводные данные термогравиметрического анализа					
Изменение массы образца на первой стадии, %;	2,8	1,5	3,1	2,0	1,8
Изменение массы образца на второй стадии (в диапазоне разложения образца), %;	59,8	67,5	78,4	71,9	63,4
Температура начала разложения, °С	307,1	332,4	333,9	329,3	330,7
Изменение массы образца на третьей стадии, %	11,1	6,7	9,3	10,2	15,7
Остаток, %	26,3	24,3	9,2	15,9	19,1

Исследования БНЦ методом рентгеноструктурного анализа (табл. 10, 11) показало, что образцы БНЦ, полученные как на синтетической питательной среде, так и на различных ферментативных гидролизатах шелухи овса и мискантуса, имеют высокую степень кристалличности – от 86 % до 93 %, что является подтверждением целесообразности использования именно ферментативной технологии гидролиза целлюлозосодержащего сырья. В мировой литературе приводятся значения от 46,0% до 95,6 %, при этом при переходе на гидролизные среды степень кристалличности снижается [Velásquez-Riaño, 2017]. В опытных образцах БНЦ преобладает низкосимметричный метастабильный алломорф целлюлозы I-альфа, ее содержание составляет от 93,6 % до 100 %, что превышает опубликованные данные: от 64 % [Gama, 2016; Keshk, 2014] до 90 % [Campano, 2016]. Впервые установлен факт биосинтеза высококристаллической БНЦ с преобладанием алломорфа целлюлозы I-альфа независимо от состава питательной среды.

**Таблица 11 – Основные физико-химические характеристики образцов БНЦ, полученных на средах из мискантуса**

Характеристика	Контр оль	1	2	3	4
Выход БЦ, % от концентрации РВ в среде	10,0	5,0	5,1	6,4	6,3
Выход БЦ, % от массы сырья	–	1,43	1,52	1,09	1,70
Концентрации алломорфов целлюлозы и степень кристалличности, определенные методом РСА					
Iα - алломорф, %	100,0	100,0	99,0	100,0	100,0
Iβ - алломорф, %	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
Степень кристалличности, %	86	86	88	94	85
Степень полимеризации в зависимости от продолжительности биосинтеза БНЦ					
7 суток	2600	1520	1200	1550	1800
14 суток	2200	1400	1100	1470	1550
21 сутки	2000	1120	1000	1150	1450
Прочностные характеристики					
Прочность при разрыве, МПа	33,16	24,0	21,5	29,8	25,4
Условный предел текучести, МПа	5,6	4,7	3,0	4,0	3,0
Относительное удлинение при максимальной нагрузке, %	1,5	2,4	1,2	1,8	1,8
Относительное удлинение при пределе текучести, %	0,6	1,0	0,4	0,8	0,5
Толщина образца, мкм	20	40	30	50	50
Модуль Юнга, МПа	933	490	750	510	640
Сводные данные термогравиметрического анализа					
Изменение массы образца на первой стадии, %;	2,8	1,8	3,0	3,3	2,6
Изменение массы образца на второй стадии (в диапазоне разложения образца), %;	59,8	71,8	68,9	66,9	74,3
Температура начала разложения, °С	307,1	340,8	328,4	317,6	347,3
Изменение массы образца на третьей стадии, %	11,1	7,6	8,4	8,0	6,7
Остаток, %	26,3	18,8	19,7	21,8	16,4

В порядке убывания степени полимеризации образцов БНЦ можно построить ряд: контроль>4>3>2>1. Следует отметить, что степень полимеризации образцов БНЦ, полученных из субстратов, предобработанных одностадийно в 1,2-2,0 раза ниже, чем из субстратов, предобработанных двухстадийно. Для всех образцов после 7 суток культивирования наблюдается снижение степени полимеризации и через 21 сутки биосинтеза степень полимеризации снижается в 1,5-2,0 раза по сравнению со своим максимальным значением (в контроле в 1,3 раза), что связано с длительным биосинтезом.

Модуль Юнга образцов (таблицы 10, 11) варьирует от 933 МПа до 311 МПа, то есть отличается в 3 раза. В порядке уменьшения модуля Юнга образцы из шелухи овса можно расположить в ряд: контроль>1>4>3>2, а из мискантуса: контроль>2>4>3>1. В мировой литературе приведены как более высокие, так и более низкие значения данного показателя: 15-138 ГПа [Campano, 2016]; 10-17 МПа [Abol-Fotouh, 2020].

Известно, что тем выше термостабильность образца, тем образец чище [Pacheco, 2017]. Термостабильность тем выше, чем выше температура начала разложения. Температуры начала разложения образцов варьируют от 307,1 °С до 347,3 °С, это очень близкие значения (таблицы 10, 11).

Таким образом, исследование зависимости физико-химических свойств БНЦ от способа предварительной химической обработки шелухи овса и мискантуса показало, что способ предварительной химической обработки и вид сырья оказывают влияние на выход БНЦ, а также на степень полимеризации и модуль Юнга образцов БНЦ, но не оказывает влияния на термостабильность, степень кристалличности и содержание алломорфа Ia.

Именно структурные характеристики (степень кристалличности и содержание алломорфа Ia) являются её базовыми характеристиками. Установленную способность симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 синтезировать БНЦ со стандартными структурными характеристиками независимо от состава среды можно назвать «самостандартизацией». Практическое применение её очевидно: открывается реальная возможность стабильной, устойчивой работы симбиотической культуры в условиях реального производства.

#### *Скрининг индивидуальных штаммов-продуцентов БНЦ на гидролизных средах*

Протестированы штаммы *Komagataeibacter xylinus* В-12428, В-12429, В-12431, биосинтез проведен на средах субстратов 3 (являющихся биологически доброкачественными), полученных из шелухи овса и мискантуса. В качестве контрольной среды использована классическая среда Хестрина-Шремма.

Установлено, что на 10-е сутки культивирования для штамма В-12429 выход БНЦ на контрольной среде составил 1,7 %, на гидролизных средах – 2,5 %, а для штамма В-12431 выход БНЦ на контрольной среде составил 1,5 %, на гидролизной среде из мискантуса – 2,7 %; из шелухи овса – 3,5 %. То есть, при переходе от синтетической среды к гидролизной, выход БНЦ для индивидуальных штаммов увеличивается в 1,5-2,3 раза, чего не наблюдалось

для *Medusomyces gisevii* Sa-12. Однако, по сравнению с симбиотической культурой, выход БНЦ на гидролизных средах для индивидуальных штаммов уменьшается в 1,8-4,0 раза.

#### *Разработка промышленной технологии получения БНЦ*

Научно обоснована и разработана технология получения БНЦ, включающая двухстадийную предварительную обработку целлюлозосодержащего сырья разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия; ферментативный гидролиз; стандартизацию питательной среды по глюкозе и экстрактивным веществам чёрного чая; биосинтез БНЦ с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12; выделение, очистку, стерилизацию и упаковывание БНЦ.

Разработана техническая документация, отражающая технологические решения, найденные в ходе исследований:

- программы и методики экспериментальных исследований (13 шт.),
- технические условия, зарегистрированные в ФБУ «Алтайский ЦСМ» (3 шт.) и лабораторные технологические инструкции (2 шт.);
- технологическая пропись и технологический регламент получения бактериальной целлюлозы из шелухи овса и мискантуса, утвержденные директором ИПХЭТ СО РАН.

#### *Получение БНЦ в условиях опытно-промышленного производства*

В реализованной технологической линии в условиях опытно-промышленного производства ИПХЭТ СО РАН в емкостном оборудовании от 250л до 63 л масштабированы основные операции трансформации шелухи овса в БНЦ с сохранением на каждой технологической стадии выходов полупродуктов, полученных при лабораторных исследованиях. В итоге получен оптимистичный выход: 1,94 т БНЦ влажностью 99,0 % из 1 т шелухи овса. Это свидетельствует об успешных инженерных решениях на каждой технологической стадии производства БНЦ из шелухи овса.

#### *Технико-экономическая оценка от внедрения разработанной технологии БНЦ в промышленном производстве*

Рассчитана проектная производственная калькуляция себестоимости БНЦ. При производительности завода 50 т/год цена 1кг БНЦ влажностью 99 % составит 657 руб.

#### *Применение бактериальной наноцеллюлозы в ветеринарии и медицине*

В ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ установлено, что лиофильно высушенные образцы БНЦ обладают высокой гемостатической активностью: по сравнению с контролем (марлевым тампоном) время остановки кровотечения сокращалось в 1,8 раз до (35±8) с; масса кровопотери снижалась в 7 раз до (0,527±0,162) г.

Получен пат. РФ № 2624242. На проведенную работу получены акты испытаний и внедрения.

В ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава РФ показано успешное применение БНЦ в абдоминальной хирургии на собаках и свиньях; в регенерации и заживлении ран мягких тканей верхних и нижних конечностей различного генеза (атеросклеротические, диабетические, воспалительные, послеоперационные) на пациентах отделений гнойной и сосудистой хирургии КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Барнаул. Установлено, что БНЦ влажность 99 % обладает самостоятельной гемостатической активностью. Показана высокая эффективность БНЦ в регенерации и заживлении ран мягких тканей верхних и нижних конечностей различного генеза по сравнению с традиционными повязками на основе 1% хлоргексидина и мази «Левомеколь». На проведенные исследования получены акты испытаний.

### **Основные результаты и выводы**

1. Впервые разработан способ предварительной обработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья с помощью разбавленного раствора азотной кислоты. Способ реализуется в стандартном емкостном оборудовании при атмосферном давлении и температуре 92-96 °С и позволяет получить два продукта: легкогидролизуемый субстрат для ферментативного гидролиза с выходом □360 кг из 1 т шелухи овса или □380 кг из 1 т мискантуса и комбинированное лигногуминовое удобрение с выходом 2,2 т из 1 т сырья. Установлено, что наличие кислотонерастворимого лигнина в концентрации до 12,5 % не снижает реакцию способность к ферментативному гидролизу: выход РВ составляет □80 % от массы субстрата. Целесообразно использовать 4 %-ную азотную кислоту (мас.), при этом варочный раствор может быть использован десятикратно. Особенностью способа является его безотходность.

2. Исследован ферментативный гидролиз продуктов химической предобработки целлюлозосодержащего сырья:

– установлено, что при увеличении начальной концентрации субстрата с 33,3 г/л до 120,0 г/л наблюдается снижение выхода РВ в 1,5-2,0 раза; при высоких концентрациях субстрата выход РВ для мискантуса на 20 % выше, чем для шелухи овса;

– с применением метода симплекс-центричного планирования выявлено оптимальное соотношение ферментных препаратов «Целлолюкс-А» и «Ультрафло Коре», позволяющее повысить выход РВ в ~ 2 раза;

– исследованы неорганические компоненты шелухи овса и продуктов ее химической и ферментативной трансформации. Установлено, что основным веществом в образцах золы является диоксид кремния, состояние (кристаллическое или аморфное) и содержание которого (83-98 %) зависят от условий извлечения. Показано, что твердый остаток, остающийся после ферментативного гидролиза может быть превращен в аморфный диоксид кремния с выходом 17,4 кг из 1 т шелухи овса.

3. Разработаны научные основы энергоэффективной технологии биоэтанола из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья, высокий выход целевого продукта обеспечивается за счёт:

- одностадийной обработки сырья разбавленным раствором азотной кислоты;

- совмещения биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения, что обеспечивает повышение выхода биоэтанола на 16,8-18,8 % для одностадийных способов, снижение содержания примесей в биоэтаноле на 30-50 %, сокращение продолжительности процесса в 1,5 раза, исключение стадий фильтрации или центрифугирования гидролизата. Впервые для определения продолжительности ферментативного гидролиза перед совмещением ее со спиртовым брожением предложена математическая модель, достоверно описывающая процесс. Установлено, что стадия ферментативного гидролиза должна проводиться 24 ч, что обеспечивает гидролиз на 84 % от максимально возможных редуцирующих веществ;

- использования для брожения штаммов сахаромицетов ВКПМ У-1693 и У-3136;

- оптимизации состава питательной среды стимуляторами биосинтеза этанола, в результате чего выход биоэтанола повышен на 8,4 %.

- применения фермент-субстратной подпитки, в результате чего достигнуто повышение концентрации биоэтанола в 2,3 раза – до 5,4 об %;

4. Разработана нормативная документация на технологию получения биоэтанола, технология масштабирована в условиях опытно-промышленного производства. Выход биоэтанола из шелухи овса составил 18,1-20,2 дал/т, из мискантуса – 25-26 дал/т, что соответствует ведущему мировому уровню.

Проведена технико-экономическая оценка разработанной технологии. При производительности завода 10 000 дал/сутки (или 3 028 160 дал /год) биоэтанола с учётом продажи попутной продукции (комбинированного лигногуминового удобрения и углекислого газа), цена 1 л биоэтанола из шелухи овса составит 62,2 руб., из мискантуса – 53,8 руб.

Полученный по разработанной технологии биоэтанол успешно применен для каталитической дегидратации в этилен в ИК им. Г.К. Борескова. Установлено, что предпочтительным способом получения биоэтанола для последующей трансформации в этилен является одностадийная обработка азотной кислотой. Выход этилена составил 55-67 кг/т из шелухи овса и 110-115 кг/т мискантуса.

5. Разработаны научные основы технологии получения БНЦ из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья.

- найдены технологические режимы предварительной обработки сырья, позволяющие получить высококачественный субстрат, ферментативный гидролиз которого позволяет получить биологически доброкачественную среду, не требующую дополнительных технологических обработок (детоксификации, нейтрализации кислот и т.п.) – двухстадийная обработка разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия;

– научно обосновано использование в качестве продуцента симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12, доказана способность продуцента эффективно работать на сложных гидролизных средах в нестерильных условиях без добавок витаминов, минеральных солей и стимуляторов биосинтеза, что выгодно отличает симбиотическую культуру от индивидуальных штаммов *Komagataeibacter xylinus*;

– впервые установлено, что независимо от вида сырья и способа его предварительной обработки, культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 способна синтезировать БНЦ со стандартными структурными характеристиками: степень кристалличности составляет 86-93 %, содержание алломорфа I-альфа – 96-98 %. Это уникальные значения, превышающие все известные мировые аналоги;

– установлено, что выход БНЦ на среде из шелухи овса составляет 10 %, на среде из мискантуса – 6 %.

6. Разработана нормативная документация на технологию получения БНЦ; технология масштабирована в условиях опытно-промышленного производства. Выход БНЦ влажностью 99,0 % из 1 т шелухи овса составил 1,94 т.

Проведена технико-экономическая оценка разработанной технологии. При производительности завода 50 т/год цена 1 кг БНЦ влажностью 99 % составит 657 руб.

В ФГБУ ГНЦ Минздрава РФ установлено, что полученные по разработанной технологии образцы лиофильно высушенной БНЦ обладают гемостатической активностью. В ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава РФ установлено, что БНЦ влажностью 99 % обладает самостоятельной гемостатической активностью и показана высокая эффективность БНЦ в регенерации и заживлении ран мягких тканей верхних и нижних конечностей различного генеза.

7. Разработаны фундаментальные технологические основы комплексной переработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты микробиологического синтеза. Авторская безотходная предварительная обработка сырья разбавленным раствором азотной кислотой позволяет получить качественный субстрат для последующего ферментативного гидролиза. Предложена энергоэффективная технология технического безметанольного биоэтанола и сформированы научные основы новой для России отрасли – производства БНЦ. Внедрение данных технологий позволит не только осуществить импортозамещение, но и создать инновационные наукоёмкие производства, которые позволят динамично развивать научно-технологический комплекс России, получать продукты с высокой добавленной стоимостью, создавать новые рабочие места.

Работа соответствует «Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации» (Указ Президента РФ № 642 от 01.12.2016), п. 20а.

## Публикации, в которых представлены основные результаты диссертационной работы

### Статьи в журналах, входящих в базы данных WoS и Scopus

#### Q1, Q2

1. **Skiba E.A.**, Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V. Yield and quality of bacterial cellulose from agricultural waste // *Cellulose*. – 2022. – P. 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04372-x>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
2. Aleshina L.A., Gladysheva E. K., Budaeva V.V., Mironova G.F., **Skiba E.A.**, Sakovich G.V. X-ray diffraction data on the bacterial nanocellulose synthesized by *Komagataeibacter xylinus* B-12429 and B-12431 microbial producers in miscanthus-and oat hull-derived enzymatic hydrolyzates // *Crystallography Reports*. 2022. – V. 67. –№ 3. –P. 391-397. <https://doi.org/10.1134/S1063774522030026>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q2**.
3. **Skiba E.A.**, Ovchinnikova E.V., Budaeva V.V., Banzaraktsaeva S.P., Kovgan M.A., Chumachenko V. A., Mironova G.F., Kortusov A.N., Parmon V.N., Sakovich, G. V. Miscanthus bioprocessing using HNO<sub>3</sub>-pretreatment to improve productivity and quality of bioethanol and downstream ethylene // *Industrial Crops and Products*. – 2022. – 177. – 114448. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114448>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
4. Ovchinnikova E.V., Mironova G.F., Banzaraktsaeva S.P., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Kovgan M.A., Chumachenko V.A. Bioprocessing of oat hulls to ethylene: Impact of dilute HNO<sub>3</sub>- or NaOH pretreatment on process efficiency and sustainability // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* – 2021.– V. 9. – № 49. – P. 16588–16596. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05112>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
5. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., **Skiba E.A.**, Mironova G.F., Bychin N.V., Gismatulina Y.A., Kashcheyeva E.I., Sitnikova A.E., Shilov A.I., Kuznetsov P.S., Sakovich G.V. Scale-up of biosynthesis process of bacterial nanocellulose // *Polymers*. – 2021. V.13 (12). – P. 1920; <https://doi.org/10.3390/polym13121920> WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
6. Skiba E.A., Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Sitnikova A.E., Korchagina A.A., Bychin N.V., Gladysheva E.K., Pavlov I.N., Zharikov A.N., Lubyansky V.G., Semyonova E.N., Sakovich G.V. Biosynthesis of bacterial cellulose by extended cultivation with multiple removal of BC pellicles // *Polymers*. – 2021. – V. 13 (13). – P. 2118. <https://doi.org/10.3390/polym13132118>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
7. Shavyrkina N.A., **Skiba E.A.**, Kazantseva A. E., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Bychin N.V., Gismatulina Yu.A., Kashcheyeva E.I., Mironova G.F., Korchagina A.A., Pavlov I.N., Sakovich G.V. Static culture combined with aeration in biosynthesis of bacterial cellulose // *Polymers*. – 2021. – V. 13 (23). – P. 4241. <https://doi.org/10.3390/polym13234241>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
8. **Skiba E.A.**, Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V., Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from Miscanthus biomass // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – V. 252 – P. 117178, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
9. **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Ovchinnikova E.V., Gladysheva E.K., Kashcheyeva E.I., Pavlov I.N., Sakovich G.V. A technology for pilot production of bacterial cellulose from oat hulls // *Chemical Engineering Journal*. – 2020. – V. 383. – P. 123128. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123128>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
10. Kashcheyeva E.I., **Skiba E.A.**, Zolotukhin V.N., Budaeva V.V. Recycling of nitric acid solution in chemical pretreatment of oat hulls for biorefining // *BioResources*. – 2020. – V. 15 (1). – P. 1575-1586. <https://doi.org/10.15376/biores.15.1.1575-1586>. WoS, **Q2**. Scopus, **Q2**.
11. Aleshina L.A., Gladysheva E.K, Budaeva V.V., Golubev D.S., **Skiba E.A.**, Sakovich G.V. X-ray diffraction study of bacterial nanocellulose produced by *Medusomyces gisevii*

- Sa-12 cultured in enzymatic hydrolysates of miscanthus // Crystallography Reports. – 2019. – V. 64. – №.6. – P. 914–919. <https://doi.org/10.1134/S1063774519060026>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q2**.
12. Kashcheyeva E.I., Gladysheva E.K., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V. A study of properties and enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose // Cellulose. – 2019 – V. 26. –P. 2255–2265. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-02242-7>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
13. Mironova G.F., **Skiba E.A.**, Kukhlenko A.A. Optimization of pre-saccharification time during dSSF process in oat-hull bioethanol technology // 3 Biotech. – 2019. – V. 9. – P. 455. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1988-x>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q2**.
14. Budaeva V.V.; Gismatulina Y.A.; Mironova G.F.; **Skiba E.A.**; Gladysheva E.K.; Kashcheyeva E.I.; Baibakova O.V.; Korchagina A.A.; Shavyrkina N.A.; Golubev D.S.; Bychin N.V.; Pavlov I.N.; Sakovich G.V. Bacterial nanocellulose nitrates // Nanomaterials. – 2019. –V. 9. – P. 1694. <https://doi.org/10.3390/nano9121694>. WoS, **Q2**. Scopus, **Q1**.
15. Zharikov A.N., Lubyansky V.G., Gladysheva E.K., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Semyonova E.N., Zharikov A.A., Sakovich G.V. Early morphological changes in tissues when replacing abdominal wall defects by bacterial nanocellulose in experimental trials // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2018. – V. 29 (7). – P. 95. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6111-z>. WoS, **Q2**. Scopus, **Q2**.
16. Aleshina L.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., **Skiba E.A.**, Arkharova N.A., Sakovich G.V. X-ray diffraction study of bacterial nanocellulose produced by the *Medusomyces gisevii* Sa-12 culture in enzymatic hydrolysates of oat hulls // Crystallography Reports. – 2018. – V. 63. – №. 6. – P. 955–960. <http://dx.doi.org/10.1134/S1063774518050024>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q2**.
17. **Skiba E.A.**, Baibakova O.V., Budaeva V.V., Pavlov I.N., Vasilishin M.S., Makarova E.I., Sakovich G.V., Ovchinnikova E.V., Banzaraktsaeva S.P., Vernikovskaya N.V., Chumachenko V.A. Pilot technology of ethanol production from oat hulls for subsequent conversion to ethylene // Chemical Engineering Journal. – 2017. – V. 329. – P. 178–186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.05.182>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
18. Tarabanko V.E., Kaygorodov K.L., **Skiba E.A.**, Tarabanko N., Chelbina Y.V., Baybakova O.V., Kuznetsov B.N., Djakovich L. Processing pine wood into vanillin and glucose by sequential catalytic oxidation and enzymatic hydrolysis // Journal of Wood Chemistry and Technology. – 2017. – V. 37(1). – P. 43-51. <http://dx.doi.org/10.1080/02773813.2016.1235583>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.
19. **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Baibakova O.V., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Dilute nitric-acid pretreatment of oat hulls for ethanol production // Biochemical Engineering Journal. – 2017. – V. 126. – P. 118-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.003>. WoS, **Q2**. Scopus, **Q1**.
- Q3, Q4**
20. **Skiba E.A.**, Skiba M.A., Pyatunina O.I. Nitric acid solution after treating miscanthus as a growth regulator of seed peas (*Pisum sativum* L.) in vitro // Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. –2021. – T. 11. –№ 3. –P. 413–420. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-413-420>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**
21. Baibakova O.V., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Gismatulina Y.A., Sakovich G.V. Producing bioethanol from miscanthus: experience of primary scale-up // Catalysis in Industry. – 2020. – V. 12. – №. 2. – P. 155–161. <https://doi.org/10.1134/S2070050420020038>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.
22. Mironova G.F., **Skiba E.A.**, Kukhlenko A.A. Preparing nutrient media from lignocellulose: optimizing the composition of a multienzyme compound // Catalysis in Industry. – 2020. – V.12. – №. 2. – P. 162–168. <https://doi.org/10.1134/S2070050420020063>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.
23. Mironova G.F., **Skiba E.A.** Synthesis of bioethanol from oat hulls via enzyme-substrate feeding // Catalysis in Industry. – 2020. – V. 12. – № 4. – P. 359-363. <https://doi.org/10.1134/S2070050420040054>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.

24. Sakovich G.V., **Skiba E.A.**, Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V. *Miscanthus* as a feedstock for the production of bacterial nanocellulose // Doklady Chemistry. – 2020. – T. 495. – № 2. – P. 205-208. <https://doi.org/10.1134/S0012500820120034>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q3**.
25. Gladysheva E.K., Golubev D.S., **Skiba E.A.** Investigation of bacterial nanocellulose biosynthesis by *Medusomyces gisevii* Sa-12 from enzymatic hydrolyzate obtained by alkaline delignification of miscanthus // Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. – 2019. – V. 9. – №. 2. – P. 260–269. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-260-269>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.
26. **Skiba E.A.**, Baibakova O.V., Gladysheva E.K., Budaeva V.V. Study of the influence of *Medusomyces gisevii* Sa-12 inoculum dosage on bacterial cellulose yield and degree of polymerization // Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. – 2019. V. 9. – №. 3, P. 420–429. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-420-429>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.
27. Gladysheva E.K., **Skiba E.A.**, Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the conditions for the biosynthesis of bacterial cellulose by the producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – V. 54. – №. 2. – P. 179–187. <https://doi.org/10.1134/S0003683818020035>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q3**.
28. Zemnukhova L.A., Skiba E.A., Budaeva V.V., Panasenko A.E, Polyakova N.V. Composition of inorganic components of oat husks and products of their chemical and enzymatic transformation // Russian Journal of Applied Chemistry. – 2018. – V. 91. – №. 2. –P. 230–234. <https://doi.org/10.1134/S1070427218020106>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q3**.
29. Zharikov, A.N., Lubyansky, V.G., Gladysheva, E.K., **Skiba, E.A.**, Budaeva, V.V., Semenova, E.N., Motin, Yu.G., Zharikov, A.A. Prosthetic hernioplasty using bacterial nanocellulose: An experimental study // Clinical and Experimental Surgery. – 2018. – 6 (2). –P. 59-66. <https://doi.org/10.24411/2308-1198-2018-12008>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.
30. **Skiba E.A.**, Mironova G.F., Kukhlenko A.A., Orlov S.E. Enhancing the yield of bioethanol from the lignocellulose of oat hulls by optimizing the composition of the nutrient medium // Catalysis in Industry. – 2018. – V. 10. – №. 3. – P. 257–262. <https://doi.org/10.1134/S207005041803008X>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.
31. **Skiba E.A.** Biosynthesis of bacterial nanocellulose in media obtained from cellulose containing materials // Izvestiya vuzov-prikladnaya khimiya i biotekhnologiya [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 41-47 (in Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-3-41-47>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.
32. Sakovich G.V., **Skiba E.A.**, Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Aleshina L.A. Chemical aspects of bacterial nanocellulose // J. Sib. Fed. Univ. Chem. – 2018. – V. 11 (4) – P. 531-542. <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0097>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.
33. Baibakova O.V., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Sakovich G.V. Preparing bioethanol from oat hulls pretreated with a dilute nitric acid: scaling of the production process on a pilot plant // Catalysis in Industry. – 2017. – V. 9. – №. 3. – P. 257–263. <https://doi.org/10.1134/S2070050417030023>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.
34. Sakovich G.V., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Aleshina L.A. Technological fundamentals of bacterial nanocellulose production from zero prime-cost feedstock // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2017. – V. 477. – P. 357-359. <https://doi.org/10.1134/S1607672917060047>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q3**.
35. Gladysheva E.K., **Skiba E.A.** Biosynthesis of bacterial cellulose on enzymatic hydrolyzate of oat hull pulp // Izvestiya vuzov-prikladnaya khimiya i biotekhnologiya. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 141-147 (in Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-141-147>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.
36. **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Makarova E.I., Baibakova O.V., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Bioethanol from oat hulls pretreated by alkaline delignification. I. Chemical and

enzymatic material conversion // *Biotekhnologiya*. – 2017. – Vol.33. – №. 2. – P. 68-75. <https://doi.org/10.1016/0234-2758-2017-33-2-68-75>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

37. **Skiba E.A.**, Baibakova O.V., Budaeva V.V., Pavlov I.N., Makarova E.I., Mironova G.F., Kriukov Y.A., Sakovich G.V. Bioethanol from oat hulls pretreated by Alkaline Delignification. II. Scaling of alcoholic fermentation up to pilot process // *Biotekhnologiya*. – 2017. – V. 33. – №. 3. – P. 47-56. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-3-47-56>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

38. Budaeva V.V., **Skiba E.A.**, Baibakova O.V., Makarova E.I., Orlov S.E., Kukhlenko A.A., Udoratina E.V., Shcherbakova T.P., Kuchin A.V., Sakovich G.V. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials at different concentrations of the substrate // *Catalysis in Industry*. – 2016. – V. 8. – N. 1. –P. 81-87. <https://doi.org/10.1134/S2070050416010025>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

39. **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Baibakova O.V., Udoratina E.V., Shakhmatov E.G., Shcherbakova T.P., Kuchin A.V., Sakovich G.V. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials in aqueous media and the subsequent microbiological synthesis of bioethanol // *Catalysis in Industry*. – 2016. – V. 8. – №. 2. – P. 168–175. <https://doi.org/10.1134/S2070050416020100>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

40. **Skiba E.A.** Biosynthesis of fodder yeasts in broths derived from oat hulls. *Izvestiya Vuzov // Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. – 2016. – V. 6. –№ 3. – P. 140–142. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-3-140-142> (in Russian). WoS, Q4. Scopus, Q4.

41. **Скиба Е.А.** Методика определения биологической доброкачественности гидролизатов из целлюлозосодержащего сырья с помощью штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-1693 // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2016. – № 1 (16). – С. 34-44. WoS, Q4. Scopus, Q4.

42. **Скиба Е.А.**, Миронова Г.Ф. Преимущества совмещения биокаталитических стадий в синтезе биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2016. – Т.6. – № 4. – С. 53-60. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-4-53-60>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

43. Baibakova O.V., **Skiba E.A.** Biotechnological aspects of ethanol biosynthesis from miscanthus // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. – 2015. – V. 5. – №. 1. – P. 69-74. <https://doi.org/10.1134/S2079059715010025>. Scopus, Q4.

44. Makarova E.I., Budaeva V.V., **Skiba E.A.**, Sakovich G.V. Enzymatic hydrolysis of celluloses obtained via the hydrothermal processing of *Miscanthus* and oat hulls // *Catalysis in Industry*. – 2014. – V. 6. – №. 1. – P. 67-71. <https://doi.org/10.1134/S20700504140061>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

45. Makarova E.I., Budaeva V.V., **Skiba E.A.** Enzymatic hydrolysis of cellulose from oat husks at different substrate concentrations // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2014. – V. 40. – №. 7. – P. 726-732. <https://doi.org/10.1134/S1068162014070103>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

46. Budaeva V.V., Makarova E.I., **Skiba E.A.**, Sakovich G.V. Enzymatic hydrolysis of the products of hydro-thermobaric processing of *Miscanthus* and oat hulls // *Catalysis in Industry*. – 2013. – V. 5. – №. 4. – P. 335-341. <https://doi.org/10.1134/S207005041304003X>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

47. **Скиба Е.А.**, Орлов С.Е., Будаева В.В. Оптимизация состава глюкозо-аммонийной среды по выходу этанола для штамма *Saccharomyces cerevisiae* У-1693 // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. – 2012. – № 2 (18). – С.66-73. WoS, Q4. Scopus, Q4.

48. **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Павлов И.Н., Макарова Е.И., Золотухин В.Н., Сакович Г.В. Получение ферментативных гидролизатов технических целлюлоз мискантуса и их спиртовое брожение // *Биотехнология*. – 2012. – № 6. – С. 42-52. WoS, Q4. Scopus, Q4.

## Патенты

1. Пат. 2533921, Российская Федерация, МПК C13K1/02. Способ предварительной обработки целлюлозосодержащего сырья для ферментативного гидролиза / Будаева В.В., Макарова Е.И., **Скиба Е.А.**, Золотухин В.Н., Сакович Г.В. – № 2013140699/20, заявл. 03.09.2013; опубл. 27.11.2014, Бюл. № 33 – 10 с.

2. Пат. 2581799, Российская Федерация, МПК C12P7/10. Способ получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья / **Скиба Е.А.**, Байбакова О.В., Будаева В.В., Сакович Г.В. – № 2015108958/10; заявл. 13.03.2015; опубл. 20.04.2016, Бюл. № 11. – 9 с.

3. Пат. 2593724 Российская Федерация, МПК C12P7/10. Способ получения биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья / **Скиба Е.А.**, Байбакова О.В., Будаева В.В., Сакович Г.В. – № 2015125195/10; заявл. 25.06.2015; опубл. 10.08.2016, Бюл. № 22. – 8 с.

4. Пат. № 2597291 Российская Федерация, МПК C12N 1/22, C12P 19/04. Способ получения бактериальной целлюлозы / Будаева В.В., Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.**, Сакович Г.В. – № 2015129304/10; заявл. 16.07.2015; опубл. 10.09.2016, Бюл. № 25. – 9 с.

5. Пат. 2624242 Российская Федерация, МПК A61L 15/18, A61L 15/44, A61L 15/28, A61F 13/00. Раневое покрытие с гемостатическим действием, и способ его получения / Савченко В.Г., Белозерская Г.Г., Макаров В.А., Малыгина Л.С., Неведрова О.Е., Бычичко Д.Ю., Голубев Е.М., Широкова Т.И., Шальнев Д.В., Никитина Н.М., Кабак В.А., Момот А.П., Шахматов И.И., Будаева В.В., Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.**, Сакович Г.В., Макарова Е.И., Гисматулина Ю.А., Бычин Н.В. – № 2016133023, заявл. 10.08.2016; опубл. 03.07.2017, бюл. № 19. – 14 с.

6. Пат. 2701643 Российская Федерация, МПК C12P7/06, C12P7/10. Способ получения биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья / Миронова Г.Ф., **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Кашеева Е.И., Байбакова О.В. – № 2018134393; заявл. 27.09.2018; опубл. 30.09.2019, Бюл. № 28. – 9 с.

7. Пат. 2718762 Российская Федерация, МПК C07C 1/24. Способ получения этилена из легковозобновляемого непродовольственного растительного сырья / Овчинникова Е.В., Чумаченко В.А., Банзаракцаева С.П., Сурмина М.А., Байбакова О.В., **Скиба Е.А.**, Сакович Г.В., Будаева В.В. – № 2019140882, заявл. 11.12.2019; опубл. 14.04.2020 Бюл. № 11. – 10 с.

Полный список публикаций приведен в диссертации, в конце введения.

*За содействие при выполнении диссертационной работы выражаю глубокую благодарность научному консультанту академику РАН Г.В. Саковичу; заведующей лаборатории биоконверсии к.х.н., доценту В.В. Будаевой; к.х.н. В.Н. Золотухину; к.т.н., доценту А.А. Кухленко; коллективу лаборатории биоконверсии ИПХЭТ СО РАН.*

*Благодарю сотрудников ИК им. Г.К. Борескова СО РАН к.т.н. В.А. Чумаченко и к.т.н. Е.В. Овчинникову за исследования каталитической дегидратации биоэтанола в биоэтилен и плодотворное сотрудничество; сотрудника ФГБУН ИХ ДВО РАН д.х.н. Л.А. Земнухову за исследование неорганических компонентов продуктов переработки шелухи овса; сотрудника ПетрГУ к.ф.-м.н., доцента, Л.А. Алешину за исследование БНЦ методом рентгеноструктурного анализа; сотрудника ФГБУ ГНЦ Минздрава РФ, д.м.н., Г.Г. Белозерскую за исследование гемостатической активности БНЦ; сотрудников ФГБОУ ВО АГМУ д.м.н., профессора В.Г. Лубянского и д.м.н., профессора А.Н. Жарикова за исследование применения БНЦ в хирургии.*