

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Отделение химии и наук о материалах  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**Институт проблем химико-энергетических технологий**  
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

**Миронова Галина Федоровна**

**Повышение эффективности процесса получения  
биоэтанола из шелухи овса**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Научный руководитель  
Кандидат технических наук, доцент  
Скиба Екатерина Анатольевна

**Москва 2020**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Характеристика биоэтанола и основные сырьевые источники для его получения.....	10
1.2 Целлюлозосодержащее сырье .....	13
1.2.1 Шелуха овса .....	16
1.3 Методы трансформации целлюлозосодержащего сырья в среды для сбраживания.....	18
1.4 Ферменты, участвующие в биоконверсии компонентов целлюлозосодержащего сырья .....	22
1.5 Продуценты биоэтанола и стимуляторы его биосинтеза .....	24
1.6 Конфигурации проведения стадий в технологии биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья .....	29
1.7 Обоснование выбранного направления исследования .....	33
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	37
2.1 Объекты исследований.....	37
2.1.1 Характеристика сырья и продуктов его предварительной обработки (субстратов) .....	37
2.1.2 Характеристика ферментных препаратов .....	38
2.1.3 Характеристика продуцентов биоэтанола.....	39
2.2 Методы анализа.....	40
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ..	44
3.1 Оптимизация состава мультиэнзимной композиции .....	44

3.2 Оптимизация продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза перед ее совмещением со спиртовым брожением .....	50
3.3 Оптимизация состава питательной среды на основе ферментативного гидролизата стимуляторами биосинтеза этанола .....	59
3.4 Выбор штамма <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	64
3.5 Применение метода фермент-субстратной подпитки при получении биоэтанола.....	67
3.5.1 Получение биоэтанола из продукта щелочной делигнификации шелухи овса .....	68
3.5.2 Получение биоэтанола из продукта азотнокислой обработки шелухи овса .....	72
3.6 Апробация оптимизированной технологии получения биоэтанола на опытно-промышленном производстве.....	79
3.7 Сравнительная оценка технологий биоэтанола.....	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	90
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	95
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	117

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

В настоящее время роль биоэтанола как технического продукта в мировой экономике постоянно возрастает, так как он может быть применен не только в качестве альтернативного экологически чистого вида топлива или добавки к нему, но и как универсальный растворитель и прекурсор для синтеза широкого круга химических веществ. Биотехнологическое превращение целлюлозосодержащего сырья в биоэтанол полностью соответствует принципам циркулярной экономики и отвечает концепции опережающего развития, поэтому спрос на биоэтанол из этого вида сырья устойчиво растет. Среди всего многообразия целлюлозосодержащего сырья особое значение имеют именно сельскохозяйственные отходы. Они не представляют пищевой ценности, не конкурируют с пищевым производством, но наоборот, их превращение в продукты с высокой добавленной стоимостью имеет важное экономическое и экологическое значение.

Мировой урожай овса посевного (*Avena sativa*) составляет порядка 22 млн т в год, из них около 5 млн т производится в России, и Россия занимает первое место в мире по производству овса [1]. Овес используется не только на корм животным, но существует многотоннажное производство продуктов питания: круп, муки, хлопьев, печенья, слайсов. В пищевом производстве используется зерно, освобожденное от пленок (шелухи), которые составляют 25-35 % от массы зерна [2], и в настоящее время практически не используются. Благодаря высокому содержанию целлюлозы и гемицеллюлоз в шелухе овса она может быть источником технического биоэтанола (биоэтанола второго поколения).

В мировой научной литературе имеется ограниченное количество примеров получения биоэтанола из шелухи овса [3–5]. В ИПХЭТ СО РАН технология получения биоэтанола из шелухи овса разрабатывается с 2012 года [6], получено 2 патента [7, 8], защищена диссертация. Однако анализ разработанной ранее (базовой) технологии позволил выявить критические проблемные точки на стадиях ферментативного гидролиза и спиртового брожения, решение которых может существенно

повысить эффективность процесса и сделать его применимым для промышленного производства.

### **Степень разработанности**

Существенный вклад в развитие технологий переработки целлюлозосодержащего сырья в востребованные продукты, получения целлюлолитических ферментных препаратов, выделения штаммов спиртовых дрожжей, моделирования процессов в области технологии биоэтанола внесли российские и зарубежные ученые: Шарков В.И., Холькин Ю.И., Яровенко В.Л., Гельфанд Е.Д., Лобанок А.Г., Варфоломеев С.Д., Панфилов В.И., Градова Н.Б., Гернет М.В., Римарева Л.В., Сидницын А.П., Ефременко Е.Н., Абрамова И.М., Коваленко Г.А., Красноштанова А.А., Болтовский В.С., Кухаренко А.А., Винаров А.Ю., Федоренко В.Ф., Емельянов В.М., Hu F., Ragauskas A., Jordan D.B., Lawford H.G., Unrean P., Paulová L., Chaud L.C.S., Zabed H., Ballesteros M., Saha B. C.

### **Цель и задачи**

Целью работы являлось повышение эффективности процесса получения биоэтанола из шелухи овса.

В задачи входило:

1. Оптимизировать состав мультиэнзимной композиции;
2. Оптимизировать продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза перед совмещением ее со спиртовым брожением;
3. Оптимизировать состав питательной среды на основе ферментативного гидролизата;
4. Подобрать эффективный штамм *Saccharomyces cerevisiae*;
5. Разработать технологические режимы фермент-субстратной подпитки при получении биоэтанола;
6. Провести апробацию оптимизированной технологии получения биоэтанола на опытно-промышленном производстве.

## **Научная новизна работы**

Впервые с привлечением математических приемов планирования и обработки экспериментальных данных оптимизированы технологические решения биотрансформации субстрата из шелухи овса на стадиях ферментативного гидролиза и спиртового брожения: найден эффективный состав мультиэнзимной композиции; оптимизирована продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза перед совмещением ее со спиртовым брожением; оптимизирован состав питательной среды на основе ферментативного гидролизата стимуляторами биосинтеза этанола, что позволило повысить выход биоэтанола на вышеперечисленных стадиях. Разработаны технологические режимы подпитки субстратом и ферментными препаратами, в результате чего повышение концентрации субстрата позволило повысить концентрацию биоэтанола в бражке и тем самым эффективность на стадии ректификации биоэтанола за счет снижения затрат на ректификацию более концентрированного биоэтанола.

Научная новизна технического решения подтверждена патентом РФ № 2701643 (Приложение 1).

## **Практическая значимость**

Повышена эффективность процесса получения биоэтанола из шелухи овса в сравнении с базовой технологией: концентрация биоэтанола в бражке увеличена от 2,3 % об. до 5,4 % об.

Оптимизированная технология апробирована на опытно-промышленном производстве ИПХЭТ СО РАН, что подтверждено актом внедрения.

Полученный биоэтанол передан в Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, где из него методом каталитической дегидратации получен этилен, что подтверждено Актом внедрения (Приложение 2).

## **На защиту выносятся:**

- результаты оптимизации состава мультиэнзимной композиции;
- результаты оптимизации продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза перед ее совмещением со спиртовым брожением;

- результаты оптимизации состава питательной среды на основе ферментативного гидролизата стимуляторами биосинтеза этанола;
- результаты выбора штамма *Saccharomyces cerevisiae*;
- результаты применения метода фермент-субстратной подпитки при получении биоэтанола;
- результаты апробации оптимизированной технологии получения биоэтанола на опытно-промышленном производстве в емкостном оборудовании объемом от 250 до 63 л.

**Достоверность результатов исследования** обеспечивается воспроизводимостью экспериментальных результатов, применением стандартных методик их аналитического контроля, а также современного оборудования для проведения экспериментальных работ в специализированных лабораториях.

#### **Апробация результатов работы**

Основные результаты работы представлены на всероссийских и международных конференциях: «Инновационные решения при производстве продуктов питания из растительного сырья» (Воронеж, 2016-2017), «Ломоносовские чтения на Алтае: фундаментальные проблемы науки и образования» (Барнаул, 2017), «Химия и химическая технология переработки растительного сырья» (Минск, 2018), «Альтернативные источники сырья и топлива» (Минск, 2019), «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности» (Бийск, 2015-2016, 2018-2020); международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018); школе молодых ученых «Новые каталитические процессы глубокой переработки углеводородного сырья и биомассы» (Красноярск, 2019).

#### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 10 статей, в том числе 10 из списка ВАК, 6 – в журналах, индексируемых международными базами Web of Science и Scopus, а также 8 тезисов докладов и материалов конференций, 1 патент (Приложение 1).

Работа выполнена по проектам V.47.1.2 «Фундаментальные исследования химических и биотехнологических процессов получения новых материалов и компонентов топлив из недревесного сырья (ФАНО, № гос.регистрации темы 01201358390, 2015-2016 гг.), V.47.1.1 «Фундаментальные технологические основы биорефайнинга возобновляемого недревесного сырья» (Минобрнауки, № гос.регистрации темы АААА-А17-117011910006-5, 2017-2020 гг.), 1.56 «Исследование фундаментальных основ разработки экологически безопасной компонентной базы для создания перспективных низкочувствительных взрывчатых композиций повышенной эффективности» Программы 56 ФИ Президиума РАН «Фундаментальные основы прорывных технологий в интересах национальной безопасности» (Минобрнауки, № гос. регистрации темы АААА-А17-117114040005-9, 2018-2020 гг.), 15.3 «Фундаментальные основы получения этилена из мискантуса» Комплексной программы ФИ СО РАН II.1 «Междисциплинарные интеграционные исследования» (Минобрнауки, 2018-2019 гг.), № 17-19-0105 «Фундаментальные инженерные аспекты технологии получения бактериальной наноцеллюлозы из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья» (РНФ, № гос. регистрации темы АААА-А17-117072710004-4, 2017-2021 гг.) и в рамках стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики (СП-671.2019.1, 2019-2021 гг.).

**Личный вклад автора** состоял в анализе литературных данных, в постановке задач работы, планировании и проведении экспериментов, в обсуждении результатов, в подготовке статей, докладов конференций и представлении их на международных и всероссийских конференциях.

#### **Соответствие паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) по пунктам 2-5, 7.

## **Структура и объем работы**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, списка литературы, приложений и представлена на 118 страницах печатного текста. Иллюстративный материал включает 23 рисунка и 17 таблиц. Библиография включает 180 наименований, в том числе 117 зарубежных.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Характеристика биоэтанола и основные сырьевые источники для его получения

Этанол (этиловый спирт, метилкарбинол) – наиболее известный представитель класса спиртов, одноатомный спирт с формулой  $C_2H_5OH$ , горючая, летучая, бесцветная гигроскопичная жидкость жгучего вкуса с характерным спиртовым запахом, обладает специфическим физиологическим действием на человека и животных. Этанол является важным продуктом и основным или вспомогательным видом сырья для производств пищевой, химической, фармацевтической, парфюмерной, медицинской, лакокрасочной и других отраслей промышленности. В химической промышленности он используется как сырье для синтеза ряда химических веществ, таких как этилакрилат, этилацетат, этиламины, этилвиниловый эфир. В последнее время значительное внимание уделяется этанолу как добавке к бензину для частичной замены нефти или как оксигенатной присадки для дизельного топлива. Использование этанола в качестве добавки к бензину уже применяется на практике в США, Бразилии и других странах [9].

Существует два основных способа получения этанола: биотехнологический (путем спиртового брожения) и синтетический (путем каталитической гидратации этилена). Из-за высокой цены на этилен, субсидированного производства этанола путем спиртового брожения и низкой конверсии этилена (менее 5 %) при повышенной температуре производство вторым способом неуклонно сокращается, но все же работы в этой области ведутся [9], всего около 7 % этанола производится этим путем [10]. В настоящее время единственный производитель синтетического этанола в России – АО «Новокуйбышевская нефтехимическая компания».

Наиболее распространен способ получения этанола путем спиртового брожения, и такой этанол принято называть биоэтанолом. В 2018 году мировой объем производства биоэтанола составил 110 млрд л, и предполагается, что в 2022 году он достигнет 140 млрд л. Этот растущий рынок отражает повышенный спрос на

разработку технико-экономически осуществимых и устойчивых процессов, основанных на переработке углеродной фракции биомассы [11].

Биоэтанол (как и другие биотоплива: биобутанол, биодизель, метан, водород и синтез-газ) подразделяется на 4 поколения в зависимости от природы сырья.

#### *Биоэтанол первого поколения*

Традиционно биоэтанол в промышленных условиях получают из сахаро- и крахмалсодержащих сырьевых источников: из зерна, свеклосахарной мелассы, сахарной свеклы, картофеля; за рубежом – из кукурузы, сахарного тростника, маниоки, сорго. Это сырье относится к первому поколению, и биоэтанол из него также называется биоэтанолом первого поколения [10].

Выход биоэтанола первого поколения от массы сырья (дал/т) составляет: из картофеля 9-12, из зерна 34-36, из сахарной свёклы 12, из мелассы 30-35, из сахарного сорго 9-15, из сахарного тростника 6-8, из топинамбура 9-13 [12].

Использование сырья первого поколения для производства биоэтанола отрицательно сказывается на продовольственной безопасности, т.к. требует возделываемых земель и конкурирует с пищевым и кормовым производством [11, 13].

Автор работы [14] выделяет отходы отдельно. В этих исследованиях в качестве сырья для биоэтанола использовались: сок некондиционных арбузов [15], гнилые фрукты (банан, ананас, манго, рамбутан) [16], вторичные сырьевые ресурсы – крахмальное молоко и пшеничные отруби [17].

#### *Биоэтанол второго поколения*

Биоэтанол второго поколения получают из целлюлозосодержащего непищевого сырья, такого как солома, жмых, жом, лесные остатки, а также специально выращиваемые на маргинальных землях энергетические культуры [13, 18].

Целлюлозосодержащее сырье характеризуется широкой распространенностью, доступностью, обилием (более 50 % биомассы в мире), возобновляемостью, низкой стоимостью и не конкурирует с производством продуктов питания и кормов [19, 20].

В бывшем СССР существовала гидролизная промышленность, производившая этанол и ряд других продуктов из древесного сырья, точнее из отходов, образующихся при лесопилении и деревообработке. Гидролизное производство считалось высокорентабельным, но было остановлено по ряду причин. К 2000 г. В России осталось восемь гидролизных заводов, а на сегодняшний день только один – ООО «Кировский биохимический завод», выпускающий биоэтанол, фурфурол, pellets и кормовые дрожжи из отходов лесопиления и деревообработки [21, 22]

Производство биоэтанола второго поколения в промышленном масштабе сталкивается с некоторыми техническими барьерами, из-за которых в настоящее время производство считается экономически неконкурентоспособным по сравнению с производством биоэтанола первого поколения. В настоящее время объем производства биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья составляет менее 3 % от общего объема производства биоэтанола [11]. Основная проблема, возникающая при использовании целлюлозосодержащего сырья для биоконверсии, – это его сложная структура, требующая тщательной обработки [23]. Другими узкими местами являются наличие ингибиторов в субстратах после предварительной обработки, низкие концентрации и выход биоэтанола, неспособность микроорганизмов сбрасывать все сахара и другие [20, 24]. В попытках преодолеть барьеры и достичь устойчивости производства лигноцеллюлозного биоэтанола в последние годы проводятся многочисленные исследовательские работы. Эти исследования можно условно разделить на такие направления: отбор перспективного сырья, разработка перспективных биоагентов с помощью скрининга природных микроорганизмов или генетического модифицирования, разработка эффективных технологий предобработки сырья и его конверсии в биоэтанол для увеличения выхода биоэтанола и снижения производственных затрат [24].

#### *Биоэтанол третьего поколения*

Биоэтанол, полученный с использованием биомассы водорослей (макрроводорослей и микроводорослей), относится к третьему поколению. Некоторые штаммы водорослей (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Porphyra*, *Chlorella vulgaris*) богаты угле-

водами (крахмалом, гликогеном и целлюлозой), которые непосредственно используются в производстве биоэтанола [25]. Однако коммерческое производство биоэтанола третьего поколения не осуществляется из-за недостаточного производства биомассы, рисков загрязнения в системах открытых водоемов, высокой стоимости производства, включая затраты энергии для сбора урожая, обширную последующую переработку [18].

#### *Биоэтанол четвертого поколения*

В последние годы выделяют и четвертое поколение биоэтанола. Большинство авторов рассматривают под термином биоэтанол четвертого поколения – биоэтанол, произведенный с помощью генной инженерии микроводорослей, макроводорослей и цианобактерий, которые модифицируются для улучшений свойств и повышения продуцирования определенных соединений [13, 18]. Использование генномодифицированных водорослей требует строгой оценки связанных рисков и надлежащего управления воздействием на окружающую среду, в связи с этим большая часть исследований остается в исследовательских лабораториях [18].

Несмотря на развитие уже четырех поколений биоэтанола, многие процессы являются не являются в полной мере изученными и как минимум с экологической точки зрения важно продолжать исследования и повышать устойчивость технологий биоэтанола второго поколения.

### 1.2 Целлюлозосодержащее сырье

Целлюлозосодержащее сырье является природным устойчивым биокомпозитом и состоит из трех основных переплетенных полимерных компонентов: целлюлоза (40–50 %), гемицеллюлозы (20–30 %) и лигнин (10–25 %), а также содержит небольшое количество пектина, белков и экстрактивных веществ (хлорофилл, воски и неструктурные сахара). Состав целлюлозосодержащего сырья варьируется в зависимости от происхождения, возраста, климатических условий, процессов сбора и хранения растения [20].

По молекулярному строению целлюлоза представляет собой линейный полисахарид, ангидроглюкозные звенья которого связаны  $\beta$ -1,4-D-гликозидными связями. Как и у крахмала, молекулы целлюлозы состоят из звеньев  $C_6H_{10}O_5$ , состав целлюлозы выражается формулой  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . По своему строению она отличается от крахмала тем, что структура молекул целлюлозы имеет не разветвлённую, а нитевидную структуру, вследствие чего она может образовывать волокна. Степень полимеризации целлюлозы составляет примерно 4000–6000 глюкозных звеньев в древесной биомассе. Полимеры целлюлозы образуют микрофибриллы и присутствуют в кристаллической и аморфной форме. Части кристаллического целлюлозного волокна прикреплены друг к другу нековалентными водородными связями, что обеспечивает в 3–30 раз меньшую способность к разложению по сравнению с аморфной частью. Микрофибриллы целлюлозы покрыты гемицеллюлозами и лигнином [19, 20, 26].

Гемицеллюлозы – комплекс гетерогенно разветвленных полисахаридов, состоящих, в основном, из пентоз (D-ксилозы, L-арабинозы), гексоз (D-глюкозы, D-маннозы, D-галактозы), ацетильных групп и уроновых кислот. Степень полимеризации достигает 50–300 моносахаридных звеньев. Гемицеллюлозы содержат как  $\alpha$ - , так и  $\beta$ -гликозидные связи в разных положениях и обычно представляют собой полисахариды, не образующие кристаллических агрегатов, что делает их менее устойчивыми к ферментативной деградации, чем целлюлоза. Гемицеллюлозы связаны с целлюлозой нековалентно. Они защищают целлюлозные волокна, благодаря эффективной оболочке и укрепляют лигноцеллюлозные клеточные стенки [19, 20, 26].

Лигнин является наиболее сложным аморфным полифенольным гетерополимером, состоящим из фенилпропановых фрагментов  $C_6-C_3$ . В качестве монолигнолов выступают три производных коричневого спирта: *n*-кумаровый, кониферилловый, синаповый. Эти мономерные звенья образуют *n*-гидроксифенильные, гваяцильные и сирингильные субъединицы при включении в полимер лигнина. Лигнин из разных растений значительно отличается друг от друга в зависимости от соотношения

мономерных звеньев. Основными компонентами лигнина травянистых культур являются гваяцильные субъединицы, за которыми следуют *n*-гидроксифенильные и сингильные. Различные мономерные звенья связаны через ( $\beta$ -O-4)-арилэфирные связи. Основная функция лигнина заключается в обеспечении структурной и механической прочности растительной ткани и растению в целом [19, 26–28].

Структурные полисахариды клеточной стенки целлюлозосодержащего сырья являются потенциальными субстратами для получения полезных моносахаридов для биотехнологического преобразования.

Наряду со структурными компонентами существуют другие факторы, которые влияют на сопротивляемость целлюлозосодержащего сырья переработке, включая присутствие ацетильных групп, белков и золы [20, 29]. Также немаловажную роль играет физическая структура сырья (кристалличность, степень полимеризации, размер частиц, размер пор, площадь поверхности) [29, 30].

Среди всего разнообразия целлюлозосодержащего сырья большой интерес для переработки в биоэтанол представляют именно сельскохозяйственные отходы.

В России среди сельскохозяйственных культур по сбору лидирует пшеница, также высока урожайность ячменя, овса, ржи, кукурузы; увеличивается урожайность сахарной свеклы, подсолнечника. В процессе переработки сельскохозяйственных культур на полях и заводах собирается большое количество отходов, таких как шелуха, солома, жом, лузга, стебли, ботва, корни, листья, некондиционные плоды. Объем ежегодно производимых российским агропромышленным комплексом отходов составляет 260 млн т по сухому веществу, из них 150 млн т – отходы растениеводства, 14 млн т – отходы перерабатывающей промышленности [31].

Отходы сельскохозяйственного производства имеют неоднородный химический состав, он колеблется в широких диапазонах (таблица 1.1).

Судя по таблице 1.1, основная часть отходов сельскохозяйственных культур представлена полисахаридами, их суммарное количество колеблется от 48 до 83 %. Содержание лигнина в сельскохозяйственных отходах составляет 12–29 %.

Таблица 1.1 – Химический состав некоторых сельскохозяйственных целлюлозосодержащих отходов (масс. % на а.с.в. сырья)

Вид сырья	Целлюлоза	Гемицеллюлозы	Лигнин	Ссылка
Ржи солома	40,4-49,3	27,7-28,8	22,9	[32]
Багасса	55,4	27,5	19,0	
Кукурузы солома	37,0	26,8	18,0	[33]
Кукурузы стебли	43,3	26,3	13,6	[10]
Риса солома	39-40	16	21-22	[11]
Пшеницы солома	34-40	20-25	20	
Кукурузы початки	43,7	23,7	12,5	
Маниоки кожура	14,3	33,6	12,9	[34]
Хлопчатника стебли	40,1	13,6	29,4	[35]
Рапса солома	30,0	18,5	21,1	[36]

Массовая доля золы (не приведена в таблице 1.1) в различных видах растительного сырья колеблется от 1 до 18 %, при этом минеральные вещества представлены оксидом калия, диоксидом кремния, неорганическим азотом, оксидом фосфора (III), оксидом магния, оксидом кальция, оксидом серы (III) [31].

### 1.2.1 Шелуха овса

В данной работе в качестве сырья для биоэтанола выбран многотоннажный сельскохозяйственный отход – шелуха овса. По данным Росстата в 2019 году сбор овса в России составил 4,4 млн т (4,7 млн т в 2018) [37].

Овес посевной (*Avena sativa*) – однолетнее травянистое растение, представитель злаков, используется не только на корм животным, но существует многотоннажное производство продуктов питания из него: круп, муки, хлопьев, печенья, слайсов [3].

Среди многих видов овса наиболее распространен посевной пленчатых форм. По своему строению зерно крупяного овса состоит из ядра эндосперма, алейроно-

вого слоя, волосков на поверхности ядра, семенных и плодовых оболочек, цветковых пленок и зародыша [38]. Особенностью строения зерновки овса является высокая пленчатость, которая составляет 25–35 % от массы зерна [2]. В пищевом производстве используется зерно, освобожденное от пленок, вследствие чего на зерноперерабатывающих предприятиях образуется огромное количество малоценной шелухи. Основной функцией шелухи овса является поддержание чистоты зерна и его защита от механического разрушения и действия патогенов.

Шелуха овса в настоящее время используется для сжигания с целью выработки энергии, благодаря ее теплотворной способности 16 МДж/кг [39], или традиционно выбрасывается и тем самым пагубно влияет на окружающую среду, или запахивается в землю [3, 40]. Однако, благодаря химическому составу шелухи овса, ее можно использовать для производства многих продуктов с добавленной стоимостью.

В таблице 1.2 приведен химический состав шелухи овса из пяти источников.

Кроме указанных в таблице характеристик, в статье [40] приводятся также значения содержания в шелухе овса крахмала (7,72 %), белка (3,32 %) и водорастворимых экстрактивных веществ (5,8 %).

Таблица 1.2 – Химический состав шелухи овса

№	Источник шелухи овса	Массовая доля, масс. %				Ссылка
		целлюлоза	гемицеллюлозы	лигнин	зола	
1	Штат Риу-Гранди-ду-Сул, Бразилия	17	28	23	н/д	[5]
2	Штат Парана, Бразилия	29,26	28,35	22,22	4,49	[41]
3	Норрчёпинг, Швеция	24,78 (глюкан)	21,41	21,59	5,70	[40]
4	Штат Парана, Бразилия	31,16	28,72	18,12	н/д	[42]
5	Берёзовский, Россия	48,8	56,2 (холоцеллюлоза)	23,2	4,4	[43]

Примечание: н/д – нет данных

Различие в химическом составе шелухи овса может быть связано с неоднородностью сырья, зависеть от сорта, почвенно-климатических условий выращивания, зрелости при сборе урожая и от методов анализа.

Из шелухи овса получены топливные пеллеты [44], а также исследованы методы ее трансформации в синтез-газ, биомасло, биоуголь [39, 44]. Шелуха овса была использована как источник целлюлозы, из которой затем были получены нанофибриллы [46, 47]; нанокристаллы, предназначенные для использования в качестве осушителей в упакованных пищевых продуктах [48]; нитраты целлюлозы [49]. Активно ведутся исследования по использованию шелухи овса в качестве сорбента широкого спектра веществ после её химической обработки кислотами [50, 51] или после получения из неё активированного угля [52, 53]. Исследована преобработка шелухи овса разбавленной кислотой [54, 55], полученные гидролизаты позиционируются для дальнейшей биотехнологической переработки. Гидролизаты из шелухи овса получены и путём ферментативного гидролиза [56]; описано получение ксилита [41], этанола [3, 4], этанола и ксилита одновременно [5], бактериальной целлюлозы [57].

### 1.3 Методы трансформации целлюлозосодержащего сырья в среды для сбраживания

Структурные полисахариды клеточной стенки целлюлозосодержащего сырья являются потенциальными субстратами для получения полезных моносахаридов для биотехнологического преобразования и, в частности, для получения биоэтанола [58].

На отечественных предприятиях по производству биоэтанола из древесины применялось два подхода для экстракции сахаров из биомассы: гидролиз концентрированной кислотой и гидролиз разбавленной кислотой.

Использование концентрированной кислоты приводит к высокой степени коррозии оборудования. Поэтому процесс требует либо дорогих сплавов, либо спе-

циализированных неметаллических конструкций. Восстановление кислоты является энергоемким процессом. В процессе нейтрализации серной кислоты образуется большое количество гипса, а применение соляной кислоты сильно ограничивается вредным воздействием на окружающую среду [59].

Основным недостатком широко применяемого метода гидролиза биомассы разбавленными кислотами является деградация сахаров в реакции гидролиза и образование нежелательных побочных продуктов (органические кислоты, фенольные соединения, фурфурол, гидроксиметилфурфурол). Эти соединения действуют как ингибиторы спиртового брожения [3, 60]. Различные процедуры детоксикации были оценены для удаления или уменьшения концентраций токсичных соединений, такие как нейтрализация, адсорбция активированным углем, адсорбция на ионообменных смолах [3], выпаривание, жидко-жидкостная экстракция, твердо-жидкостная экстракция, обработка микробными и ферментативными биокатализаторами [35].

В работе [3] гемицеллюлозный гидролизат шелухи овса, полученный гидролизом разбавленной серной кислотой, использовали в качестве среды для культивирования *Pichia stipitis*. Сравнивали обработанный 1% активированным углем гидролизат и необработанный гидролизат в качестве контроля. В культурах с использованием обработанного гидролизата наблюдалась утилизация глюкозы, ксилозы и низкое образование этанола (3,67 г/л) и глицерина. На среде из необработанного гидролизата наблюдались морфологические модификации клеток и последующая гибель клеток, отсутствие образования этанола и глицерина, вероятно, в ответ на стрессовые условия для дрожжей из-за высокой концентрации ингибиторов.

В работе [5] оценено сбраживание двумя рекомбинантными штаммами *Saccharomyces cerevisiae* гемицеллюлозных гидролизатов смеси шелухи овса и шелухи сои (1:1), полученных гидролизом 1 мас. % серной кислотой при 121 °С. Гидролизат I содержал 3,2 г/л глюкозы, 28,3 г/л ксилозы. Гидролизат II был сконцентрирован до концентрации глюкозы 5,4 г/л, ксилозы 57,1 г/л. Гидролизаты нейтра-

лизировались, но намеренно не детоксифицировались. В результате сбраживания гидролизата I было получено до 5,4 г/л этанола. В гидролизате II ни один из штаммов не дал рост. Эффект осмотического давления в сочетании с присутствием токсических соединений (уксусная кислота 2,4 г/л, фурфурол 0,19 г/л, гидроксиметилфурфурол 0,47 г/л) был причиной гибели клеток.

После прорыва в снижении стоимости производства целлюлолитических ферментов в 1990-х годах, стал популярным ферментативный способ получения моносахаридов, который во многом лишен недостатков, присущих способам, основанным на кислотном гидролизе. Ферментативный гидролиз проводится в более мягких условиях (по кислотности, давлению, температуре среды) и имеет высокую селективность. Процесс требует значительно меньшего расхода энергии, предотвращает разложение сахаров и накопление ингибиторов. Кроме того, появляется возможность решения экологических проблем. Ферментативный гидролиз биомассы крайне ограничен из-за сложности лигноцеллюлозной матрицы, необработанное целлюлозосодержащее сырье не достигает эффективности ферментативного превращения выше 35 % от исходного содержания целлюлозы [58].

На преодоление неподатливости биомассы и повышение выхода высвобождаемых сахаров при ферментативном гидролизе направлена предварительная обработка сырья. Предобработка включает физические, химические и другие условия, цель которых облегчить доступ ферментов к полисахаридам биомассы [23, 61, 62].

К физическим методам обработки целлюлозного сырья относятся измельчение (как в сухом, так и во влажном состоянии), измельчение в комбинации с химическими веществами, механокатализ (измельчение вместе с гетерогенными каталитическими системами в среде без растворителей), ультразвук, микроволновое излучение, гидротермическая предобработка, паровой взрыв, комплексные механические и термомеханические методы [30, 62–65].

Химические методы предобработки основаны на способности химических веществ к деструкции лигноуглеводных связей сырья, к разрушению кристаллической структуры целлюлозы или ее набуханию, к разделению основных компонентов сырья (целлюлоза, гемицеллюлозы, лигнин) [66–68]. Наиболее популярными

методами, исследованными и примененными за последние годы, являются: предобработка разбавленными кислотами и щелочами [69–74], органосольventная предобработка [75, 76].

К биологическим методам относятся бактериальная, грибковая, ферментативная предобработка [77, 78]. Хотя технологии предварительной биологической обработки являются многообещающими и экологически чистыми, они пока не жизнеспособны, потому что процесс слишком медленный (несколько дней) [62].

В масштабированных и реализованных в промышленности работах чаще всего используются химические методы, лидерами являются щелочная и кислотная предобработки. Ряд авторов сравнивает эти методы между собой и в зависимости от используемого сырья отдает предпочтение щелочному [71] или кислотному методу [70, 72].

В ИПХЭТ СО РАН применяются следующие методы предобработки сырья: щелочная делигнификация гидроксидом натрия, азотнокислая обработка, комбинированный способ (последовательная обработка раствором щелочи и азотной кислотой), гидротермобарическая обработка, взрывной автогидролиз, гидротропная варка [79–82]. В настоящей работе применены продукты, полученные путем обработки шелухи овса методом щелочной делигнификации и азотнокислым методом

В процессе щелочной делигнификации в композитной матрице растения удаляется лигнин и гидролизуются гемицеллюлозы. Механизм реакции заключается в деэтерификации межмолекулярных эфирных связей, прошивающих гемицеллюлозы и лигнин. В результате чего происходит расщепление связей, и щелочь воздействует на микрофибриллы целлюлозы. При этом снижается степень полимеризации целлюлозы и одновременно происходит ее набухание. Это ведет к увеличению внутренней поверхности целлюлозы и делает ее доступнее для действия ферментов. Реакции протекают в мягких условиях и приводят к увеличению пористости и площади поверхности, тем самым усиливая ферментативный гидролиз [19, 83, 84].

Под действием разбавленной азотной кислоты при температуре кипения на первом этапе происходит разрыв связей между целлюлозой, гемицеллюлозами и лигнином, а также гидролиз гемицеллюлоз, на втором этапе – частичный гидролиз целлюлозы и окислительные процессы с образованием низкомолекулярных органических кислот и углекислого газа, а также окислительное нитрование лигнина. При азотнокислой обработке сырья появляется возможность регенерации варочных вод (десятикратное использование), а после их отработки и нейтрализации гидроксидом аммония – использование как комбинированное лигногуминовое удобрение [85].

#### 1.4 Ферменты, участвующие в биоконверсии компонентов целлюлозосодержащего сырья

Целлюлазы – это ферменты, которые способны гидролизовать целлюлозу в глюкозу. Целлюлазы относятся к классу  $\beta$ -1,4-глюканаз, т.е. карбогидраз (О-гликозид-гидролаз, КФ 3.2.1), расщепляющих  $\beta$ -1,4-связи в О-гликозильных соединениях. По традиционной классификации целлюлазы по типу действия на субстрат подразделяются на: экзо-целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91 и 3.2.1.176), эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы (КФ 3.2.1.4) и  $\beta$ -глюкозидаза (КФ 3.2.1.21). Три типа ферментов действуют синергетически, гидролизуя целлюлозу [10, 86].

Волокна целлюлозы первоначально расщепляются эндоглюканазами, высвобождая небольшие фрагменты целлюлозы, затем с концов полимерных молекул нативной или частично гидролизованной целлюлозы целлобиогидролазами высвобождаются остатки целлобиозы. На основании исследований грибкового штамма *Trichoderma reesei*, целлобиогидролазы являются наиболее распространенными ферментами в составе целлюлазного комплекса.  $\beta$ -глюкозидазы – ограничивающие скорость ферменты, они завершают реакцию, превращая целлобиозу в глюкозу, отщепляя концевые нередуцирующие остатки  $\beta$ -D-глюкозы от целлобиозы и олигосахаридов [10, 26, 86]. Часто  $\beta$ -глюкозидазы вносят при ферментативном гидролизе

дополнительно, это снижает накопление негидролизованной целлобиозы и предотвращает ингибирование активности целлюлазы по обратной связи [87].

Основным источником коммерческих препаратов целлюлаз, производимых в промышленном масштабе, являются микроскопические мицелиальные грибы. Наиболее распространены коммерческие препараты на основе мутантных штаммов *Trichoderma reesei*. Но существуют и альтернативы ферментным препаратам на основе *T. reesei*. В частности, это касается целлюлаз, продуцируемых грибами родов *Penicillium*, *Myceliophthora* и др. [10, 26].

Среди основных факторов, влияющих на ферментативный гидролиз целлюлозы, входящей в состав лигноцеллюлозных материалов, в первую очередь необходимо отметить непродуктивную адсорбцию целлюлаз на лигнине, отрицательно влияющую на эффективность гидролиза, а также положительное влияние ксиланаз как дополнительных ферментов, облегчающих доступ целлюлаз к поверхности целлюлозы за счет деструкции ксиланов [10, 26].

Ксиланазы – комплекс ферментов, катализирующих гидролиз ксиланов и состоящий обычно из эндо-1,4-β-ксиланаз, β-ксилозидаз, α-L-арабинофуранозидаз и ацетилксиланэстераз. Главными компонентами комплекса ферментов являются эндо-1,4-β-ксиланызы (КФ 3.2.1.8), катализирующие неупорядоченный гидролиз гликозидных связей между остатками D-ксилозы в основной цепи ксилана и образуя короткие фрагменты ксилоолигосахаридов, при этом снижается степень полимеризации полисахарида. β-ксилозидазы гидролизуют концевые связи с невосстанавливающего конца короткого ксилоолигосахариды и образуют ксилопиранозу. С помощью β-ксилозидазы короткие ксилоолигосахариды могут быть полностью преобразованы в ксилозу. Основными источниками ксиланаз являются микроорганизмы – бактерии, археи, микроскопические грибы и дрожжи [88].

Литические полисахаридмонооксигеназы (ЛПМО) – ферменты, катализирующие ферментативное расщепление целлюлозы и других полисахаридов по окислительному механизму, относятся к классу оксидоредуктаз, их действие приводит к образованию окисленных концов молекул частично разрушенной целлюлозы. Из-

за образования окисленных олигосахаридов в результате действия ЛПМО в качестве конечных продуктов биодegradации целлюлозы также выступают целлобионовая и глюконовая кислоты. Содержание последней может достигать 1,2–2,5 % [10].

В недавних исследованиях изучены также важные ферменты с лигнолитической активностью: лакказы, лигнин пероксидаза, марганец пероксидаза, универсальная пероксидаза [86].

### 1.5 Продуценты биоэтанола и стимуляторы его биосинтеза

Основными продуцентами биоэтанола, используемыми в промышленных процессах, являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, поскольку они характеризуются быстрой скоростью роста, высокой продуктивностью по целевому продукту, толерантностью к этанолу и низким значениям кислотности среды. Дрожжи *S. cerevisiae* конвертируют в этанол глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, раффинозу и галактозу. Однако *S. cerevisiae* не способны к сбраживанию пентоз [24, 89].

Разработка штаммов *S. cerevisiae*, способных метаболизировать ксилозу, была предметом нескольких исследований, но не многие штаммы были испытаны в процессе ферментации реальных гидролизатов из целлюлозосодержащего сырья.

В работе [5] оценили способность рекомбинантных промышленных штаммов *S. cerevisiae* YRH 396 и YRH 400 к ферментации сахаров из кислотных и ферментативных гидролизатов смеси шелухи овса и шелухи сои в этанол и ксилит. Штаммы были генетически модифицированы путем хромосомной интеграции генов *Pychia conditionitis* *XYL1* / *XYL2* и сверхэкспрессии генов *S. cerevisiae* *XKS1*. Штамм YRH 396 показал лучшие кинетические параметры для получения этанола и ксилита, поэтому его метаболизм был дополнительно изучен при культивировании в ферментере объемом 2 л. При анаэробном культивировании штамм демонстрировал утилизацию 73 % ксилозы, достигая выхода этанола 0,33 г/г (количество произведенного этанола к общему количеству потребленных сахаров, присутству-

ющих в среде) При культивировании в биореакторе с ограниченным доступом кислорода потребление ксилозы достигало приблизительно 65 %, а основным продуктом был ксилит, конечная концентрация которого составляла 8,17 г/л.

К конверсии пентоз способны бактерии рода *Zygomonas*, дрожжи родов *Pachysolen*, *Pichia*, *Candida*, однако продуктивность их по целевому продукту невелика. Для получения этанола могут применяться и мицелиальные грибы родов *Phizopus*, *Aspergillus* и *Mucor*. Ксилотрофные базидиальные грибы (например, грибы родов *Peniophora*, *Trametes*), обладающие способностью к конверсии лигноцеллюлозы, также могут быть использованы для биосинтеза этанола [10].

Методами генетической инженерии направленно создаются рекомбинантные штаммы с высокой продуктивностью по целевому продукту, повышенной резистентностью к воздействию негативных факторов, термотолерантные штаммы. В обзоре [90] приведено множество стратегий метаболической инженерии, которые увеличивают производительность микроорганизмов-продуцентов биоэтанола. К ним относятся недавно обнаруженные ферменты, катализирующие неизвестные реакции, сконструированные ферменты с улучшенными характеристиками и новые пути синтеза, предназначенные для более высокого метаболического потока к целевым продуктам.

Однако существуют определенные проблемы со сконструированными микроорганизмами, которые ограничивают их использование в промышленном производстве этанола [24, 91]. Поэтому в реальных производственных условиях целесообразнее использовать проверенные негенномодифицированные промышленные штаммы спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

В таблице 1.3 перечислены некоторые микроорганизмы-продуценты биоэтанола, которые могут сбрасывать сахара гидролизатов целлюлозосодержащего сырья.

В спиртовой промышленности могут применяться стимуляторы роста дрожжей, которые подразделяются на физические, биологические и химические.

Их объединяет характер наблюдаемых эффектов: прирост биомассы или интенсификация синтеза вторичных метаболитов при использовании стимуляторов в малых дозировках [92].

Таблица 1.3 – Микроорганизмы-продуценты биоэтанола

Название микроорганизма	Оптимальная ферментации, °С	Особенности	Ссылки
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	60–65	Утилизирует глюкозу и ксилозу	[93]
<i>Thermoanaerobacter italicus</i> подвид <i>marato</i>	55–70	Строгий анаэроб, утилизирует пентозы и гексозы	[94]
<i>Clostridium thermocellum</i>	40–50	Анаэроб, быстро гидролизует и ферментирует кристаллическую целлюлозу	[95]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	42	Выживает при 52 °С, утилизирует глюкозу, ксилозу и арабинозу	[96, 97]
<i>Clavispora sp.</i>	37	Может использовать целлобиозу в качестве единственного источника углерода для биосинтеза этанола	[98]
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	37	Продуцирует одновременно н-бутиловый спирт, ацетон и этанол; утилизирует крахмал, глюкозу, целлобиозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, маннозу, сахарозу, глицерин и пируват	[99]
<i>S. cerevisiae</i>	20–37	Рекомбинантные штаммы способны утилизировать глюкозу и ксилозу, а также целлюлозу	[100–102]
Гибридный штамм из <i>S. cerevisiae</i> и <i>Pichia stipitis</i>	30	Может ассимилировать глюкозу и ксилозу	[103]
<i>Pichia stipites</i>	30	Не выяснена потребность в аэрации, утилизирует глюкозу	[104]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	32	Анаэроб; способен сбраживать глюкозу, мальтозу, сахарозу и раффинозу	[105]
<i>Escherichia coli</i>	37	Рекомбинантные штаммы могут утилизировать одновременно глюкозу и ксилозу	[106]
<i>Zymomonas mobilis</i>	33	Рекомбинантный штамм утилизирует глюкозу и ксилозу, имеет повышенную устойчивость к примесям гидролизатов	[107]

К факторам физического характера, влияющим на метаболические и репродуктивные функции, относятся: температура, давление, излучения (оптические, ультрафиолетовые, ультразвуковые), электрический ток, электромагнитные поля,

разное физическое состояние воды в средах, низкие дозы радиации, лазерная и механическая обработка. Обычно положительный эффект от физических факторов наблюдается в результате кратковременного воздействия или после их воздействия в малых дозах на биомассу [92, 108–110].

Биологические стимуляторы роста являются сложными соединениями с большим спектром действия. Источником биостимуляторов для дрожжей является сырье растительного, реже животного происхождения, включая гидробионты. Кроме исходного сырья, часто используются отходы и продукты переработки отходов различных отраслей промышленности, например, пивоваренной (пивная дробина, пивные дрожжи и получаемые из них препараты), спиртовой (остаточные дрожжи, барда), крахмало-паточной (картофельный сок, кукурузный экстракт), молочной (подсырная или творожная сыворотка), птицеперерабатывающей (мясо-перьевая мука), чайной (экстракты отходов чая) и других [92].

Среди химических стимуляторов роста можно выделить предшественников синтеза вторичных метаболитов и макромолекул; химические соединения, которые не являются метаболитами, но способны стимулировать репродуктивную и синтетическую активность клеток. В качестве дополнительного источника минеральных веществ применяются соли (сульфаты аммония, железа, цинка, селена, хлорид калия, фосфат диаммония) или металлоорганические комплексы (аквакомплексы цинка с глутаминовой кислотой, марганца с метионином, магния с аспарагиновой кислотой, селеноцистеина, кальция с фосфатом) [92].

Сообщалось, что многие металлы положительно влияют на показатели ферментации дрожжей, поскольку они необходимы для роста и метаболизма. Кроме того, дрожжи способны очень эффективно накапливать незаменимые минералы и исключать или детоксифицировать ненужные минералы. Некоторые ионы металлов (K, Na, Zn) могут изменять скорость гликолиза и впоследствии превращение пирувата в этанол. Ионы металлов жизненно необходимы для всех организмов, так как они играют важную роль в клеточном метаболизме, прежде всего, из-за потребности большого количества ферментов в них, как в кофакторах. Однако токсичные концентрации этих соединений могут стать серьезной проблемой для ферментации

различных субстратов. Например, большое влияние на биосинтез этанола *S. cerevisiae* оказывает концентрация ионов натрия [3].

Качество используемой для получения биоэтанола воды имеет также немаловажное значение. В работе [111] был изучен анионный и катионный состав воды различной жесткости, используемой в зерновых замесах, его влияние на каталитическое действие ферментов и процессы генерации дрожжей; установлено, что на питательных средах с повышенным соляно-щелочным балансом замедляются процессы генерации дрожжей и спиртового брожения; сделан вывод о том, что для повышения биосинтеза этанола следует использовать воду с пониженным соляно-щелочным балансом при минерализации не более 3,5 г/л и жесткости не более 3,1 °Ж.

На рынке существуют коммерческие дрожжевые подкормки, например, «Витамон Ультра» (смесь автолизата дрожжей, фосфата диаммония и тиамин), «Иноферм» (сульфат аммония и тиамин), «Истекс» (смесь сульфатов, фосфата диаммония, марганца и цинка), «Истлайф экстра» (пептоны с добавлением минералов и витаминов), «Суператтиванте ДЧ» (питательные соли, витамин В1, минералы) [92, 112]. Дозирование питания для дрожжей проводится, как правило, в один прием в начале брожения, но в некоторых случаях – дробно [92].

Перспективными способами биосинтеза этанола являются: совместное культивирование микроорганизмов-продуцентов биоэтанола, например, *Zygomonas mobilis* и *Candida shehatae* [113], *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia stipitis* [35, 114, 115]; биосинтез с применением высококонцентрированных популяций клеток, иммобилизованных на нетоксичных химически стабильных носителях [116]; совместная иммобилизация ферментов и микроорганизмов-продуцентов биоэтанола [117] или совместная иммобилизация двух микроорганизмов-продуцентов биоэтанола [118].

## 1.6 Конфигурации проведения стадий в технологии биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья

Наиболее часто применяемые конфигурации проведения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения: традиционное раздельное проведение ферментативного гидролиза и спиртового брожения (SHF – separate hydrolysis and fermentation) и одновременное проведение этих стадий (SSF – simultaneous saccharification and fermentation) [119–122].

В процессе SSF образующаяся в результате ферментативного гидролиза глюкоза почти сразу превращается микроорганизмами в этанол, тем самым, не ингибируя ферментативный гидролиз. SSF превосходит SHF также за счет меньшей продолжительности процесса, сниженного риска контаминации, меньшего потребления энергии и капиталозатрат, большим выходом биоэтанола. Однако процесс SHF может быть эффективным из-за оптимальной температуры проведения ферментативного гидролиза (около 50 °C) [123]. То есть обе конфигурации имеют недостатки.

Альтернативная конфигурация – совмещенное проведение стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения с отсроченной инокуляцией (dSSF – simultaneous saccharification and fermentation with delayed inoculation) [124, 125], называемая также S-SSF (semi-simultaneous saccharification and fermentation) [123], PSSF (pre-hydrolysis and the simultaneous saccharification and fermentation) [125, 126], PTSSF (simultaneous saccharification and fermentation processes with prehydrolysis time) [127]. Такой процесс проводится в одном ферментере, где субстрат подвергается отдельной стадии частичного ферментативного гидролиза при оптимальной температуре для целлюлолитических ферментов, затем вносится продуцент биоэтанола (часто при более низкой температуре, чем на отдельной стадии гидролиза) и тем самым проводится совмещение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения. Таким образом, процесс имеет преимущества как SHF, так и SSF [128].

Критичным является изменение условий проведения процесса после внесения продуцента биоэтанола, т.к. температурные оптимумы действия гидролитических ферментов и продуцентов биоэтанола, как правило, отличаются, и процесс проводится неизотермически. Описаны успешные способы решения данной проблемы, когда используются термотолерантные микроорганизмы, как природные, так и полученные с помощью методов генной инженерии, что позволяет проводить процессы ферментативного гидролиза и спиртового брожения в изотермических условиях [129–131]. Однако главным ограничением использования такого способа является неизбежная адсорбция клеток продуцента на субстрат и тогда клетки продуцента нужно вносить многократно [132].

В неизотермических процессах совмещения биокаталитических стадий с отсроченной инокуляцией продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза является важным критерием для успешного получения биоэтанола. В литературе описаны исследования, когда отдельная стадия ферментативного гидролиза проводилась в течение 8 ч [134], 24 ч [125, 135], т.е. время было выбрано случайно. В работах [123, 124, 137–139] исследована продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза в разных временных диапазонах, при этом изучено по 3–4 точки. Эти результаты сложно сравнивать, потому что сырьё, способы предварительной обработки, ферментные препараты, продолжительность стадий и продуценты в представленных работах были различными. Поэтому отличаются и выводы: в работах [135, 137] авторы критикуют введение в технологический процесс отдельной стадии ферментативного гидролиза, в работе [134] – оценивают это нейтрально. Вместе с этим, авторы работ [124, 126, 136, 138, 139] делают положительные выводы по результатам проведения процесса с отдельной стадией ферментативного гидролиза, но ее рекомендованная продолжительность варьирует от 10 до 72 ч. Таким образом, очевидно, что задача определения оптимальной продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза должна индивидуально решаться для индивидуального процесса.

Современная технология биоэтанола должна основываться на использовании концентрированной питательной среды, что позволит повысить рентабельность

производства, сократить энергозатраты, снизить объемы образования послеспиртовой барды [111].

Получить биоэтанол с высокой концентрацией из целлюлозосодержащего сырья с довольно проблематично. Сообщалось, что концентрация биоэтанола в бражке должна быть выше 4 мас. % для экономичной дистилляции [36]. И очевидным решением проблемы является увеличение концентрации субстрата. Но, как правило, эффективность биоконверсии целлюлозы при ферментативном гидролизе уменьшается с увеличением концентрации субстрата из-за высокой вязкости реакционной массы [140]. При типичном ферментативном гидролизе кристаллической целлюлозы компромисс между увеличением концентрации субстрата и степенью его конверсии приводит к гидролизатам с концентрацией глюкозы менее 30 г/л; степень конверсии субстратов снижается с более чем 70 % до менее чем 52 % при увеличении концентрации субстрата с 1 до 5 %. В дополнение к трудностям тепло-массопереноса, необратимая адсорбция целлюлаз, особенно целлобиогидролазы, на субстрате, связывание ферментов с лигнином и ингибирование целлюлолитических ферментов может быть причинами снижения степени конверсии при высоком содержании субстрата [140].

Одним из подходов к преодолению этой проблемы является применение метода подпитки. При этом важно подобрать правильную технологическую схему подпитки для конкретного субстрата.

В зарубежной литературе найдены примеры получения биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья с периодической подпиткой субстратом, субстратом и ферментными препаратами, субстратом и дрожжами.

В работе [141] исследовано получение биоэтанола из отхода, образующегося в результате варки древесины и производства бумаги. Стадии ферментативного гидролиза и спиртового брожения проводились одновременно, фермент-субстратная подпитка проводилась с интервалом в 12 ч. Процесс вели в течении двух одномесячных циклов. После переходной стадии в течение десяти дней в первом цикле (при загрузке целлюлозы 120 г/л) устанавливалось среднее значение 50 г/л этанола

при конверсии целлюлозы 74 %, во втором цикле (при загрузке целлюлозы 82 г/л) – 42 г/л этанола при конверсии целлюлозы 92 %.

В работе [132] исследовано применение интегративной математической модели при получении биоэтанола из субстрата, полученного обработкой багассы паром разбавленной серной кислоты. Процесс одновременного ферментативного гидролиза и спиртового брожения проводился в течение 120 ч. Кроме субстрата, ферментных препаратов и дрожжей, в среде содержались питательные соли, дрожжевой экстракт и 10 % мелассы. Начальная концентрация субстрата составила 10 %, далее производилась подпитка каждые 12–24 ч до общей концентрации субстрата 22 %. Засевные дрожжи подавались из расчета 0,04 г клеток/г субстрата каждые 12 ч в течение 72 ч. В результате наивысшая концентрация биоэтанола составила 65,4 г/л, что эквивалентно выходу биоэтанола 85 % от доступных сахаров и около 110 г этанола/кг субстрата.

В работе [123] исследовано получение биоэтанола из субстрата, полученного предобработкой сульфитом аммония отходов соломы пшеницы (смеси листьев, колосьев). Сначала проводилась отдельная стадия ферментативного гидролиза в течение 48 ч при загрузке субстрата 5 %, 10 %, 20 % и 30 %. Для экспериментов с загрузкой субстрата более 10 % был применялась подпитка: внесение по 5 % субстрата каждые 6 ч до достижения целевой загрузки. Ферментные препараты были внесены разово в начале ферментативного гидролиза. Совмещенная стадия ферментативного гидролиза и спиртового брожения проводилась в течение еще 120 ч. При загрузке субстрата 5 %, 10 %, 20 % и 30 % концентрация биоэтанола составляла соответственно 11,5, 22,4, 43,1 и 57,2 г/л, выход биоэтанола (от теоретической концентрации глюкозы в субстрате) – 80,4%, 78,6%, 76,8% и 66,1%.

## 1.7 Обоснование выбранного направления исследования

Анализ отечественных и зарубежных литературных источников свидетельствует об актуальности исследований, посвященных процессам получения биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья, а переработка шелухи овса с получением биоэтанола является перспективным направлением.

В мировой научной литературе имеется ограниченное количество примеров получения биоэтанола из шелухи овса. В ИПХЭТ СО РАН технология получения биоэтанола из шелухи овса разрабатывается с 2012 года [6], получено 2 патента [7, 8], защищена диссертация [122].

В таблице 1.4 приведены данные о выходе биоэтанола из шелухи овса из литературы и полученные в ИПХЭТ СО РАН, а также данные о выходе биоэтанола из некоторых других целлюлозосодержащих источников для сравнения. В литературе, как правило, приводится массовая концентрация биоэтанола (г/л), а эффективность процесса его получения оценивается различно. Некоторые авторы не приводят выход биоэтанола [3]; вторые приводят выход биоэтанола (г/г) как отношение количества биоэтанола к общему количеству потребленных сахаров [5]; большинство авторов – выход биоэтанола (%) от теоретического, рассчитанного по уравнению брожения от начального содержания глюкозы (теоретической) в субстрате [36, 51, 143]. Но некоторые авторы приводят формулу расчета выхода, как и большинство, однако за начальное содержание глюкозы в субстрате берут содержание целлюлозы в субстрате без деления на коэффициент 0,9 (коэффициент обусловлен присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам мономерных звеньев в результате гидролиза), тем самым завышая выход [125]. В таком случае результаты исследований сложно сравнивать, поэтому в таблице 1.4 некоторые показатели были пересчитаны автором диссертации, а также рассчитан выход биоэтанола (дал) с 1 т сырья для примеров с достаточными исходными данными.

Таблица 1.4 – Показатели выхода биоэтанола из шелухи овса и другого целлюлозосодержащего сырья

Сырье	Субстрат; концентрация сахаров или загрузка субстрата	Концентрация биоэтанола	Выход биоэтанола	Страна, год
Шелуха овса (ИПХЭТ)	Продукт азотнокислой обработки; загрузка 6 %	2,3 % об. (18,1 г/л <sup>А</sup> )	66,7 <sup>А,**</sup> (12,8 <sup>А,***</sup> )	РФ, 2017 [122]
Шелуха овса	Кислотный гидролизат; концентрация ксилозы 46,80 г/л, глюкозы 8,32 г/л	3,67 г/л	13,0 <sup>А,*</sup>	Бразилия, 2012 [3]
Смесь шелухи овса и сои	Кислотный гидролизат; концентрация ксилозы 28,3 г/л, глюкозы 3,2 г/л	5,4 г/л	34,0 <sup>А,*</sup>	Бразилия, 2018 [5]
	Сконцентрированный ферментативный гидролизат твердой фракции после кислотного гидролиза; концентрация глюкозы 60,12 г/л, ксилозы 18,0 г/л	24,2 г/л	60,6 <sup>А,*</sup>	
Солома овса	Продукт обработки известью; загрузка 12,5 %	33,9 г/л	84,2 <sup>**</sup> (23,7 <sup>А,***</sup> )	Испания, 2016 [143]
	Продукт автогидролиза с последующей обработкой известью; загрузка 12,5 %	49,9 г/л	95,2 <sup>**</sup> (20,7 <sup>А,***</sup> )	
Багасса	Продукт щелочной обработки, загрузка 18 % 24 % 30 % 36 %	36,2 г/л	59,1 <sup>**</sup>	Китай, 2015 [125]
		48,0 г/л	58,7 <sup>**</sup>	
		51,5 г/л	50,4 <sup>**</sup>	
		55,9 г/л	45,6 <sup>**</sup>	
Солома рапса	Продукт обработки сырья паром разбавленной серной кислоты; загрузка 22 %	53,1 г/л	72,4 <sup>**</sup> (14,0 <sup>А,***</sup> )	Китай, 2020 [36]
Отходы от соломы пшеницы	Продукт предобработки сульфитом аммония, загрузка 5 %, 10 %, 20 %, 30 %	11,5 г/л	80,4 <sup>**</sup> (16,5 <sup>А,***</sup> )	Китай, 2018 [123]
		22,4 г/л	78,6 <sup>**</sup> (16,0 <sup>А,***</sup> )	
		43,1 г/л	76,8 <sup>**</sup> (15,4 <sup>А,***</sup> )	
		57,2 г/л	66,1 <sup>**</sup> (13,6 <sup>А,***</sup> )	

Примечания:

<sup>А</sup> – показатель, посчитанный автором диссертации;

\* – выход биоэтанола (%) как отношение экспериментальной концентрации биоэтанола к теоретической, рассчитанной по уравнению брожения от концентрации сбраживаемых (доступных) сахаров;

\*\* – выход биоэтанола (%) как отношение экспериментальной концентрации биоэтанола к теоретической, рассчитанной по уравнению брожения от массы целлюлозы в субстрате с учетом коэффициента 0,9 (т.е. от теоретической концентрации сбраживаемых сахаров)

\*\*\* – выход биоэтанола (дал) из 1 т сырья

Достижения в области переработки целлюлозосодержащего сырья, особенно выход из него этанола, значительно варьируются в зависимости от сырья, типа сахаров, концентрации сахаров в гидролизатах, полученных после предобработки и гидролиза, микроорганизмов-продуцентов и условий процесса спиртового брожения. Поэтому трудно сделать вывод о потенциале разных источников сырья и ранжировать сырьё на основе выхода этанола, поскольку переработку различного сырья невозможно провести в одинаковых условиях [77].

Разработанная ранее технология ИПХЭТ СО РАН, взятая за базу для данной работы, включает предварительную обработку шелухи овса, совмещенные стадии ферментативного гидролиза и спиртового брожения, выделение биоэтанола из бражки, при этом предварительная обработка проводится 4 мас. % растворами азотной кислоты или гидроксида натрия при температуре 90–96 °С в течение 3–8 ч, совмещенная стадия осуществляется с помощью штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693. Наибольшая концентрация биоэтанола равная 2,3 % об. (18,1 г/л) была получена из продукта азотнокислой обработки шелухи овса в условиях опытно-промышленного производства. Выход биоэтанола от теоретического от концентрации субстрата составил 53,5 % [122], в пересчете на выход биоэтанола от теоретического от массы целлюлозы в субстрате – 66,7 %, в пересчете на 1 т сырья – 12,8 дал/т. Не смотря на сравнительно нормальный выход биоэтанола, концентрация биоэтанола 2,3 % об. невыгодна ввиду больших затрат на ректификацию, большего количества запусков процесса для получения требуемого количества биоэтанола, большего количества используемой воды и т.д., чем требовалось бы при получении более концентрированной бражки. Описанная технология хороша, перспективна, но требует оптимизации, так как некоторые технологические параметры выбраны случайно и не обоснованы, в частности, концентрации ферментных препаратов, продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза; не испытаны другие возможности повышения концентрации и выхода биоэтанола.

Оптимизация технологических параметров на биотехнологических стадиях ферментативного гидролиза и спиртового брожения может повысить эффективность процесса, что особенно важно для его применения на промышленном производстве.

## 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Объекты исследований

#### 2.1.1 Характеристика сырья и продуктов его предварительной обработки (субстратов)

Шелуха овса была предоставлена ЗАО «Бийский элеватор».

Предварительная обработка шелухи овса проводилась на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН в аппарате с перемешивающим устройством объемом 250 л (загрузка аппарата 80 %) при атмосферном давлении и температуре 90–96 °С [8].

Продукт азотнокислой обработки (ПАО) получен с выходом 36,3 % от массы сырья по следующей схеме: шелуха овса → промывка водой → обработка раствором азотной кислоты с концентрацией 1 мас. % в течение 2 ч → обработка раствором азотной кислоты с концентрацией 4 мас. % в течение 4,5 ч → промывка водой до момента получения бесцветных промывных вод нейтральной реакции.

Продукт щелочной делигнификации (ПЩД) получен с выходом 34,7 % от массы сырья следующим образом: шелуха овса → обработка 1 мас. % раствором азотной кислоты 2 ч → активная щелочная делигнификация 4 мас. % раствором гидроксида натрия в течение 5 ч → промывка 2 мас. % раствором азотной кислоты и водой до нейтральной реакции.

Химические показатели сырья и полученных из него субстратов представлены в таблице 2.1.

Массовая доля целлюлозы оценена по Кюршнеру согласно методике [144, 145]. Массовая доля пентозанов определена спектрофотометрическим методом на «UNICO UV-2804» («United products & instruments», США) с использованием раствора орсина [144, 146]. Массовая доля кислотонерастворимого лигнина оценена в соответствии с методикой [144, 147]. Зольность определена путем сжигания образцов при 600 °С в течение 3 ч [144, 148].

Перед использованием субстраты были простерилизованы путем автоклавирования при 2 атм 40 мин.

Таблица 2.1 – Химические показатели сырья и субстратов

Образец	Массовые доли, % на а.с.в.			
	Целлюлозы по Кюршнеру	Пентозанов	Кислотонерастворимого лигнина	Золы
Шелуха овса	40,9±0,1	34,6±0,1	19,1±0,1	5,3±0,05
ПАО	81,4±0,1	9,2±0,1	5,7±0,1	3,7±0,05
ПЩД	83,6±0,1	8,7±0,1	6,7±0,1	1,0±0,05

### 2.1.2 Характеристика ферментных препаратов

В данной работе были применены такие ферментные препараты (ФП), как «Целлолюкс-А» (порошкообразный, ООО ПО «Сиббиофарм», Россия) [149], «Ультрафло Коре» (жидкий, «Novozymes A/S», Дания) [150] и «Брюзайм ВGX» (жидкий, «Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A.», Польша) [151]. «Целлолюкс-А» стандартизован по целлюлазе (целлюлазный комплекс ферментов КФ 3.2.1.4, КФ 3.2.1.91, КФ 3.2.1.74, КФ 3.2.1.21), однако при этом преобладающей является ксиланазная активность; «Ультрафло Коре» стандартизован по  $\beta$ -глюканазе (К.Ф. 3.2.1.6); «Брюзайм ВGX» стандартизован по ксиланазе (К.Ф. 3.2.1.8), активности приведены в таблице 2.2. По значениям плотности жидких ФП (плотность «Ультрафло Коре» 1,22 г/мл, плотность «Брюзайм ВGX» 1,20 г/мл) пересчитаны их активности из объемных (мл) в массовые (г).

Таблица 2.2 – Характеристика ФП

Наименование ФП	Активность по паспорту
«Целлолюкс-А»	целлюлазная: 2000 ед. ЦлС/г ксиланазная: 8000 ед. КС/г $\beta$ -глюканазная: до 1500 ед. $\beta$ -ГкС/г
«Ультрафло Коре»	$\beta$ -глюканазная: 1580 ед. $\beta$ -ГкС/г целлюлазная: 700 ед. ЦлС/г ксиланазная (дополнительно)
«Брюзайм ВGX»	ксиланазная: 1000–1170 ед. КС/г целлюлазная: 580–630 ед. ЦлС/г $\beta$ -глюканазная: 230–280 ед. $\beta$ -ГкС/г

### 2.1.3 Характеристика продуцентов биоэтанола

В работе использовались три штамма спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: Y-1693, Y-3137, Y-3136, их характеристики приведены в таблице 2.3.

Штамм *S. cerevisiae* Y-1693 (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика, Москва) был выделен из ферментера Котласского целлюлозно-бумажного комбината Архангельской области. Дрожжи *S. cerevisiae* Y- 1693 применяются в производстве этилового спирта на гидролизатах древесины [152].

Штаммы *S. cerevisiae* Y-3137 и *S. cerevisiae* Y-3136 (Коллекция микроорганизмов для спиртовой, уксусной, ферментной и дрожжевой промышленности (руководитель Поляков В.А., куратор коллекции Римарева Л.В.), ВНИИПБТ, Москва) применяются в спиртовой промышленности для сбраживания осахаренного сусле из зернового сырья. Они осмофильны, выдерживают повышенные концентрации спирта (до 13-14 % об.) и кроме того снижают образование побочных метаболитов в процессе получения спирта [153–155].

Таблица 2.3 – Характеристика штаммов спиртовых дрожжей

№	Штамм <i>S. cerevisiae</i>	Особенность	Оптимальная температура роста
1	Y-3137	Термотолерантность (37°C), осмофильность (25 % СВ)	32-35 °С
2	Y-3136	Осмофильность (27 % СВ)	30-32 °С
3	Y-1693	Устойчивость к гидролизным средам	28 °С

Культуральные свойства дрожжей *S. cerevisiae* в лаборатории поддерживаются методом субкультивирования на солодовом сусле, частота пересева 1 раз в месяц, контроль чистоты культуры и физиологического состояния дрожжей осуществляется путём микроскопирования [152].

## 2.2 Методы анализа

Анализ субстратов, ферментативных гидролизатов, бражки и биоэтанола проводился с использованием стандартной химической посуды и материалов следующим образом.

1. Влажность субстратов определялась гравиметрическим методом с помощью анализатора влажности MB-23 (Ohaus, США), погрешность прибора 0,1–0,3 %.

2. Активная кислотность реакционной массы контролировалась с помощью иономера И-160МИ (ООО «Измерительная техника», Россия), погрешность прибора  $\pm 0,03$  ед. pH.

3. Для анализа сахаров образцы гидролизатов и бражки центрифугировались с помощью центрифуги MiniSpin 5452 («Eppendorf A.G.», Германия) 5 мин при 10000 об/мин.

Концентрация редуцирующих веществ (РВ) в супернатанте определялась в пересчете на глюкозу с помощью спектрофотометра UNICO UV-2804 (United Products & Instruments, Inc., США) при длине волны 530 нм с применением реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Panreac, Испания), относительная погрешность метода 3,45 % [156].

Концентрация глюкозы в супернатанте определялась глюкозооксидазно-пероксидазным методом с помощью реактивов из набора «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия) на спектрофотометре UNICO UV-2804 при длине волны 530 нм [157].

Концентрация пентоз определялась в пересчете на ксилозу спектрофотометрически (на UNICO UV-2804) при длине волны 630 нм с орсиновым реактивом; для построения градуировочного графика использовались растворы ксилозы с известными концентрациями; относительная погрешность метода 5,0 % [144, 146].

По результатам анализа РВ рассчитывались: выход РВ от массы субстрата по формуле (2.1), степень гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз субстрата по формуле (2.2). По результатам анализа глюкозы рассчитывался выход глюкозы от массы целлюлозы в субстрате по формуле (2.3):

$$\eta_{РВ} = \frac{C_{РВ}}{C_C} \cdot 0,9 \cdot 100 \%, \quad (2.1)$$

$$H = \frac{C_{РВ}}{C_C \cdot (100 - Л - З)} \cdot 0,9 \cdot 100 \cdot 100 \%, \quad (2.2)$$

$$\eta_{Г} = \frac{C_{Г}}{C_C \cdot Ц} \cdot 0,9 \cdot 100 \cdot 100\%, \quad (2.3)$$

где  $\eta_{РВ}$  – выход РВ от массы субстрата, %;

$H$  – степень гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз субстрата, %;

$\eta_{Г}$  – выход глюкозы от содержания целлюлозы в субстрате, %;

$C_{РВ}$  – концентрация РВ в гидролизате, г/л;

0,9 – коэффициент, обусловленный присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате гидролиза;

$C_C$  – концентрация субстрата, г/л;

$Л$  – массовая доля лигнина в субстрате, %;

$З$  – массовая доля золы в субстрате, %;

$C_{Г}$  – концентрация глюкозы в гидролизате, г/л;

$Ц$  – массовая доля целлюлозы в субстрате, %.

4. Массовая доля сухих веществ (СВ) в пробах определялась методом высушивания до постоянной массы в сушильном шкафу ED 23 (Binder, Германия).

5. Концентрация (объемная доля) биоэтанола анализировалась в бражном дистилляте, доведенном до объема бражки дистиллированной водой, с помощью ареометра для спирта АСП-1 по ГОСТ 3639-79, погрешность измерения  $\pm 0,1$  % об. [158].

Выход биоэтанола (%) для всех опытов, кроме п. 3.3., рассчитывался как отношение экспериментальной концентрации биоэтанола к теоретической, рассчитанной от по стехиометрическому уравнению брожения от массы целлюлозы в субстрате с учетом коэффициента 0,9 (т.е. от теоретической концентрации сбраживаемых сахаров) (2.4):

$$Y_1 = \frac{K}{C_C \cdot \text{Ц} \cdot 0,6479} \cdot 0,9 \cdot 1000 \cdot 100 \%, \quad (2.4)$$

где  $Y_1$  – выход биоэтанола, %;

$K$  – концентрация биоэтанола, % об.;

$C_C$  – концентрация субстрата, г/л;

Ц – массовая доля целлюлозы в субстрате, %.

0,6479 – коэффициент конверсии глюкозы в этанол;

0,9 – коэффициент, обусловленный присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза.

Выход биоэтанола (дал/т шелухи овса) рассчитывался по формуле (2.5):

$$Y_2 = \frac{K \cdot W}{C_C} \cdot 10, \quad (2.5)$$

где  $Y_2$  – выход биоэтанола, дал/т шелухи овса;

$K$  – концентрация биоэтанола, % об.;

$W$  – выход субстрата после предобработки, %;

$C_C$  – концентрация субстрата, г/л;

Ц – массовая доля целлюлозы в субстрате, %.

Выход биоэтанола (%), приведенный только в п. 3.3, рассчитывался как отношение экспериментальной концентрации биоэтанола к теоретической, рассчитанной от концентрации сбраживаемых сахаров по стехиометрическому уравнению брожения по формуле (2.6):

$$Y_3 = \frac{K}{(C_{РВ} - C_{П}) \cdot 0,6479} \cdot 100 \%, \quad (2.6)$$

где  $Y_3$  – выход биоэтанола, %;

$K$  – концентрация биоэтанола, % об.;

$C_{РВ}$  – концентрация РВ в гидролизате, г/л;

$C_{П}$  – концентрация пентоз в гидролизате, г/л;

0,6479 – коэффициент конверсии глюкозы в этанол.

6. Для анализа физиологического состояния дрожжей, подсчета общего количества дрожжевых клеток (КОЕ) в 1 мл и почкующихся клеток проводилось микроскопирование проб на микроскопе Ортика В-150 POL-B (Италия) с помощью камеры Горяева (площадь = 1/400 мм<sup>2</sup>; высота = 0,100 мм) [159].

7. Анализ полученного биоэтанола выполнялся Аналитическим испытательным центром АО ФНПЦ «Алтай» по ГОСТ 32039-2013 [160] методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором «Кристалл – 2000М» (ЗАО СКБ «Хроматэк», г. Йошкар-Ола, Россия).

Работа выполнена при использовании приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

### 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### 3.1 Оптимизация состава мультиэнзимной композиции

С целью повышения эффективности ферментативного гидролиза ПАО шелухи овса требовалась оптимизация состава мультиэнзимной композиции (МЭК). Вместе с применяемыми ранее ФП «Целлолюкс-А» и «Брюзайм ВГХ» исследовался новый ФП «Ультрафло Коре».

В задачи входило нахождение оптимального соотношения ФП в МЭК на первом этапе; на втором этапе – изучение кинетики ферментативного гидролиза при различных концентрациях МЭК для повышения выхода редуцирующих веществ (РВ), в том числе глюкозы. Проведение первого этапа исследований осуществлялось путем математической обработки экспериментальных данных, полученных в результате реализации симплекс-центроидного плана опытов для трехкомпонентного состава МЭК. На втором этапе кинетика ферментативного гидролиза изучалась путем аппроксимации экспериментальных данных, полученных при проведении ферментативного гидролиза при различных концентрациях МЭК оптимизированного состава, по уравнению экспериментально-статистической модели согласно [161].

Ферментативный гидролиз субстрата проводился в 0,1 М ацетатном буферном растворе (рН 4,6); начальная концентрация субстрата – 30,0 г/л по сухим веществам, температурный режим –  $(46 \pm 2)$  °С, скорость перемешивания – 150 об/мин, продолжительность процесса – 72 ч; концентрация МЭК варьировалась в соответствии с планом эксперимента (план приведен ниже).

Процесс велся в конических колбах объемом 0,5 л с использованием горизонтального перемешивающего устройства ЭКРОС ПЭ-6410 с нагревом («Экохим», Россия).

На первом этапе проводилось определение оптимального соотношения ФП в МЭК. Для этого МЭК рассматривалась как трехкомпонентная смесь ФП. При таком подходе содержание ФП в МЭК должно удовлетворять условию (3.1):

$$x_1+x_2+x_3=1, \quad (3.1)$$

где  $x_1=(X_1-X_{1\min})/(X_{1\max}-X_{1\min})$ ,  $x_2=(X_2-X_{2\min})/(X_{2\max}-X_{2\min})$ ,  $x_3=(X_3-X_{3\min})/(X_{3\max}-X_{3\min})$  – относительные концентрации ФП «Целлолюкс-А», «Ультрафло Коре» и «Брюзайм ВGX» соответственно;  $X_1, X_2, X_3$  – концентрации ферментных препаратов «Целлолюкс-А», «Ультрафло Коре» и «Брюзайм ВGX» в составе МЭК, мг/г субстрата;  $X_{1\max}=40$  мг/г субстрата,  $X_{2\max}=100$  мг/г субстрата,  $X_{3\max}=200$  мг/г субстрата – максимальные концентрации ФП «Целлолюкс-А», «Ультрафло Коре» и «Брюзайм ВGX» в составе МЭК;  $X_{1\min}=X_{2\min}=X_{3\min}=0$  мг/г субстрата – минимальные концентрации ФП «Целлолюкс-А», «Ультрафло Коре» и «Брюзайм ВGX» в составе МЭК.

Оценка гидролитической способности МЭК велась по динамике накопления в реакционной смеси РВ (таблица 3.1).

В результате численного моделирования на основе проведенных экспериментов зависимость концентрации РВ от состава МЭК описывается уравнением (3.2):

$$C = 23,1x_1 + 24,1x_2 + 14,2x_3 + 11,6x_1x_2 + 28,7x_1x_3 + 24,7x_2x_3, \quad (3.2)$$

где  $C$  – конечная концентрация РВ, г/л.

Расчет коэффициентов в выражении (3.2) осуществлялся по методике, изложенной в работе [162]. Так как в зависимости (3.2) используется шесть коэффициентов, определенных на основе шести опытов, то для подтверждения адекватности полученной зависимости были проведены дополнительные эксперименты (№ 7–12), данные которых также представлены в таблице 3.1. Адекватность предложенной зависимости была подтверждена по критерию Фишера при уровне значимости 0,05. Графическое представление функции отклика  $C$  показано на рисунке 3.1 в виде тернарного графика.

Таблица 3.1 – План и результаты экспериментов по поиску оптимального состава МЭК

№	Относительные концентрации ФП			Концентрация РВ (г/л) от времени, ч								
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	2	4	6	8	24	32	48	56	72
1	1	0	0	4,3	6,1	8,0	8,8	14,8	16,3	19,7	20,8	23,4
2	0	1	0	6,3	8,9	10,7	12,1	17,2	18,8	21,5	23,7	25,5
3	0	0	1	3,9	5,8	6,7	7,7	11,0	11,4	13,4	13,6	14,3
4	1/2	1/2	0	6,2	8,8	10,4	12,0	17,8	19,1	22,5	24,9	26,5
5	0	1/2	1/2	6,0	8,6	9,9	11,5	16,7	17,7	20,0	22,8	23,4
6	1/2	0	1/2	4,4	6,8	8,5	9,3	15,8	17,3	21,0	21,8	24,6
7	1/3	1/3	1/3	4,8	7,0	9,0	9,7	16,6	18,0	21,5	21,6	25,6
8	3/4	0	1/4	6,0	8,3	10,3	12,0	17,7	18,1	20,3	22,1	24,7
9	1/2	1/4	1/4	6,0	9,0	11,0	12,1	19,4	19,5	22,8	25,0	26,1
10	1/4	1/2	1/4	6,5	9,4	11,0	11,8	18,8	19,0	22,0	24,6	25,8
11	1/3	2/3	0	6,5	9,2	11,8	12,3	20,7	21,0	23,4	26,0	26,9
12	2/3	1/6	1/6	6,6	9,4	11,7	12,0	20,0	21,0	23,0	25,0	26,1

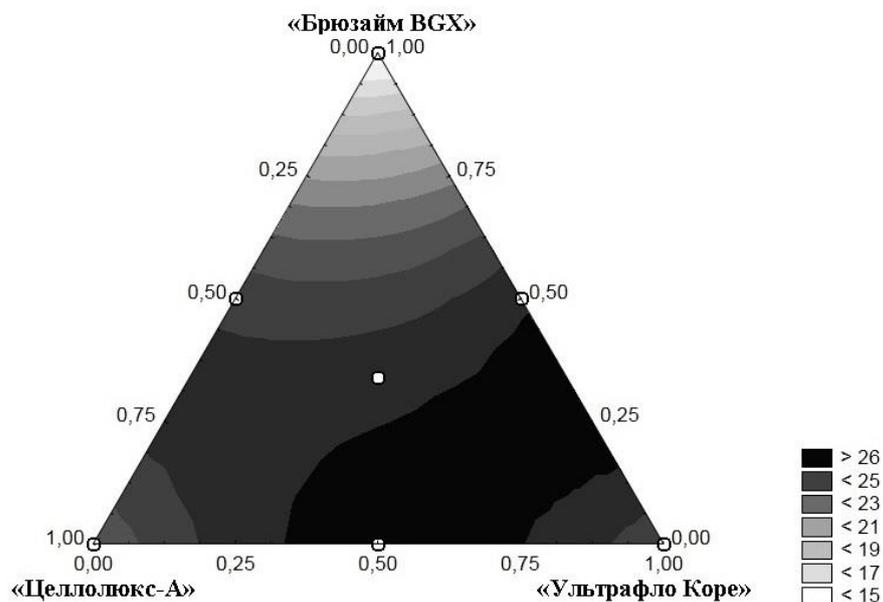


Рисунок 3.1 – Тернарный график влияния состава МЭК на концентрацию РВ (г/л)

Задача оптимизации состава МЭК решалась методом приведенного градиента с учетом условия (3.1). Конечная концентрация РВ (после 72 часов фермента-

тивного гидролиза) являлась параметром оптимизации. В результате решения задачи оптимизации найдено, что максимальная конечная концентрация РВ достигается при следующих концентрациях ФП, мг/г субстрата: «Целлолюкс-А» – 18, «Ультрафло Коре» – 55, «Брюзайм ВGX» – 0; сумма – 73 мг/г субстрата, т.е. оптимальным является соотношение «Целлолюкс-А» и «Ультрафло Коре», равное 1/4:3/4. Найденное соотношение позволило повысить концентрацию РВ от 14,3 г/л (экспериментально полученная наименьшая конечная концентрация РВ в опыте 3, соответствующая выходу РВ 42,9 % от массы субстрата) до 27,9 г/л (значение конечной концентрации РВ, рассчитанное в результате оптимизации и соответствующее выходу РВ 83,7 % от массы субстрата), т.е. в 1,95 раз.

На втором этапе, после нахождения оптимального соотношения ФП в МЭК, проводилось изучение кинетики ферментативного гидролиза при различных концентрациях МЭК с целью повышения выхода РВ и отдельно глюкозы. Для решения этой задачи была изучена кинетика ферментативного гидролиза в шести опытах, где дозировка ФП при их оптимальном соотношении в МЭК была увеличена в 1,3; 1,7; 2,0; 2,3; 2,7 и 3,0 раза.

На рисунке 3.2 показана зависимость конечной концентрации РВ от концентрации МЭК в диапазоне от 73 до 219 мг/г субстрата. Видно, что конечная концентрация РВ линейно повышается с увеличением концентрации МЭК.

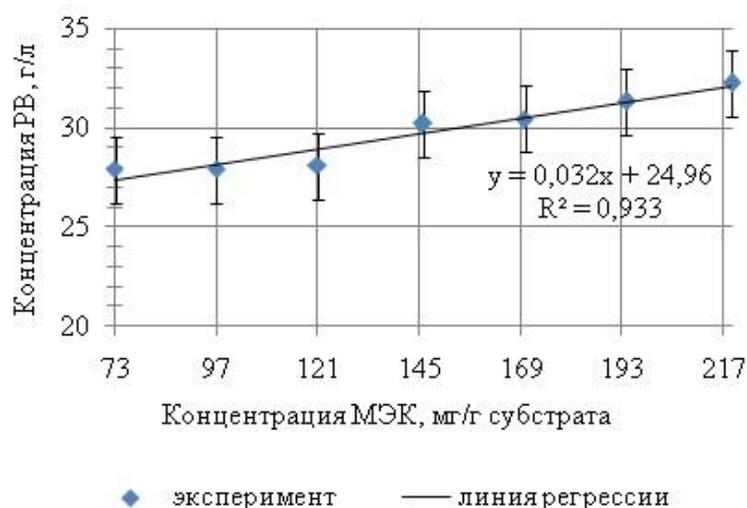


Рисунок 3.2 – Зависимость конечной концентрация РВ от концентрации МЭК

Кинетика ферментативного гидролиза изучалась путем аппроксимации экспериментальных данных по уравнению экспериментально-статистической модели (3.3).

$$C = C_p(1 - \exp(kt)), \quad (3.3)$$

где  $C$  – концентрация продукта по модели;  $C_p$  – конечная концентрация продукта, г/л;  $k$  – константа скорости реакции ферментативного гидролиза,  $\text{ч}^{-1}$ ;  $t$  – продолжительность ферментативного гидролиза, ч. Модель выбрана согласно [161]. Коэффициенты уравнения регрессии находились методом наименьших квадратов. На рисунке 3.3 представлено графическое решение этих уравнений.

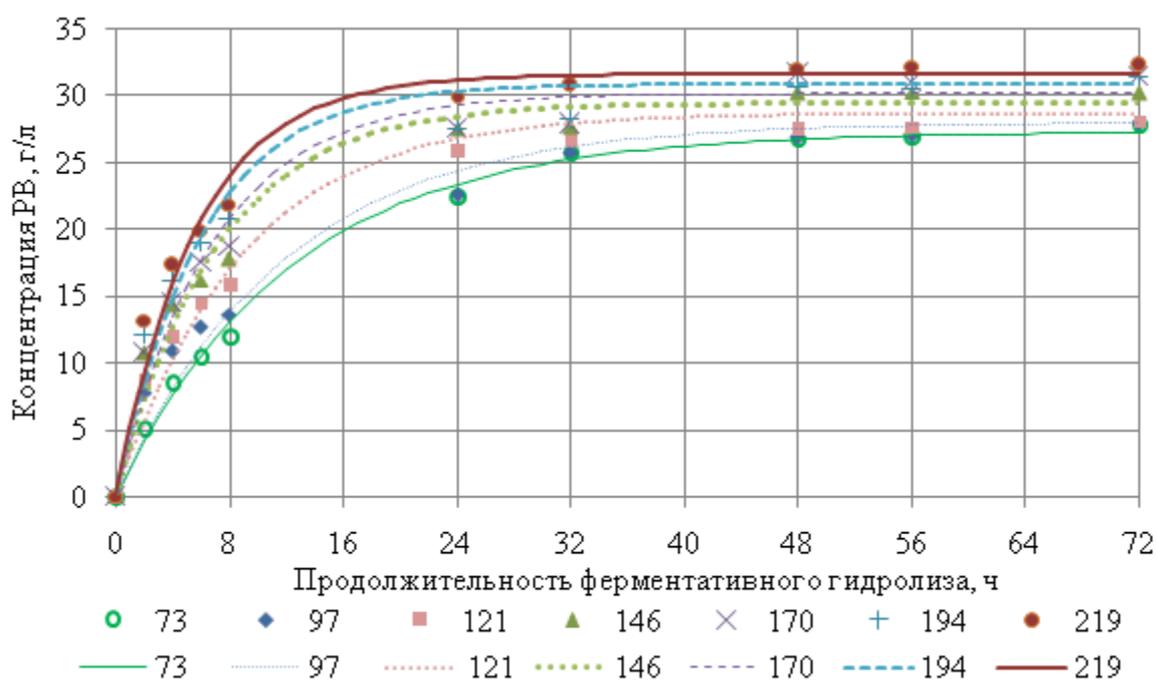


Рисунок 3.3 – Зависимости концентрации РВ при различных концентрациях МЭК (мг/г субстрата) от продолжительности процесса: точки – экспериментальные данные; линии – теоретические кривые, полученные в результате аппроксимации выражения (3.3)

Наибольшая концентрация РВ (выход РВ 96,7 % от массы субстрата) достигается при трехкратном увеличении соотношения ФП в МЭК, что соответствует 219 мг/г субстрата («Целлолюкс-А» – 54 мг/г субстрата, «Ультрафло Коре» – 165 мг/г

субстрата), причем концентрация РВ практически не изменяется спустя 24 ч гидролиза. Поэтому такая концентрация МЭК может быть использована для увеличения скорости ферментативного гидролиза, т.е. сокращения продолжительности процесса.

Дополнительно к оценке гидролитической способности МЭК по динамике накопления в реакционной среде РВ (рисунок 3.3) был проведен анализ концентрации глюкозы в процессе ферментативного гидролиза с применением МЭК в предельных концентрациях МЭК: 73 мг/г субстрата и 219 мг/г субстрата (рисунок 3.4).

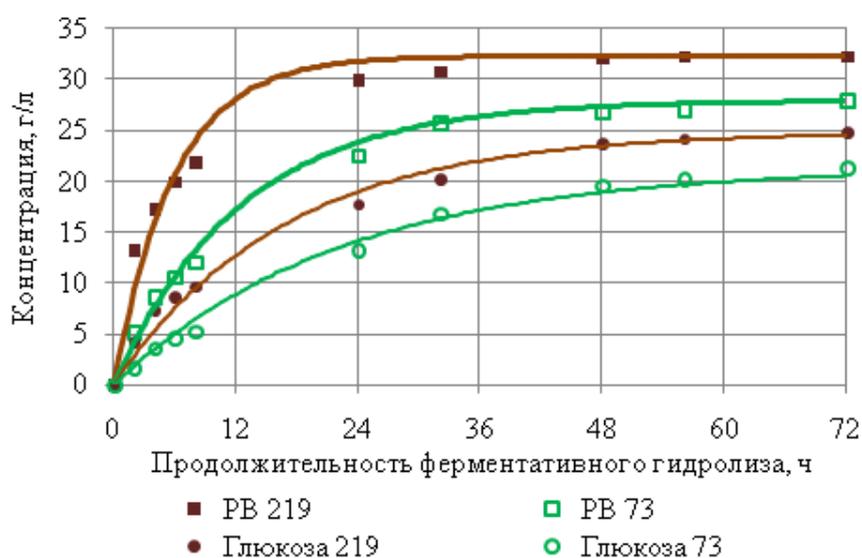


Рисунок 3.4 – Зависимости концентрации РВ и глюкозы от продолжительности ферментативного гидролиза при концентрациях МЭК 73 мг/г субстрата и 219 мг/г субстрата: точки – экспериментальные данные; линии – теоретические кривые, полученные в результате аппроксимации выражения (3.3)

По графикам видно, что в обоих случаях накопление глюкозы идет медленнее, чем накопление РВ, но доля глюкозы в РВ не остается постоянной и медленно растет: так, через 24 ч гидролиза доля глюкозы составляет 59 %, через 72 ч – 77 %. Это можно объяснить механизмом реакции гидролиза целлюлозы с образованием дисахарида целлобиозы и моносахарида глюкозы. На заключительном этапе дисахарид целлобиоза медленно гидролизуеться до глюкозы [10], поэтому на практике всегда

следует уточнять рациональную продолжительность процесса для конкретных МЭК и субстрата. Выход глюкозы от массы целлюлозы в субстрате при концентрации МЭК 73 мг/г субстрата составил 78,7 %, при концентрации МЭК 219 мг/г субстрата 91,5 %.

При повышении концентрации МЭК до 219 мг/г субстрата достигнуто повышение на 13,0 % выхода РВ от массы субстрата и выхода глюкозы от массы целлюлозы в субстрате. Результаты данного исследования опубликованы в работе [163].

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

В данном исследовании решалась задача оптимизации продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза перед ее совмещением со спиртовым брожением с целью обеспечения максимально быстрой и полной конверсии субстрата в целевой продукт – биоэтанол. В качестве субстрата использован ПЩД. Для разработки математической модели проводился эксперимент следующим образом. Брался влажный субстрат и проводилась отдельная стадия ферментативного гидролиза в водной среде при концентрации субстрата 60 г/л по сухим веществам; с применением ФП в дозировке: «Целлолюкс-А» 40 мг/г субстрата, «Брюзайм ВGX» 200 мг/г субстрата; при температуре  $(46 \pm 2)$  °С, активной кислотности  $(4,8 \pm 0,2)$  ед. рН, постоянном перемешивании с частотой 150 об/мин; объем реакционной смеси – 1 л. Продолжительность данной стадии ( $t_0$ ) варьировалась: опыт 1 – 8 ч; опыт 2 – 15 ч; опыт 3 – 24 ч; опыт 4 – 39 ч; опыт 5 – 48 ч; опыт 6 – 72 ч (последний опыт представлял собой последовательное проведение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения и являлся контрольным опытом).

По истечении запланированного времени отдельной стадии ферментативного гидролиза реакционная масса охлаждалась до 28 °С, вносилось 15 % засевных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 и проводилось сбраживание, совмещенное с осахариванием в анаэробных статических условиях в течение 5 сут.

Отдельная стадия ферментативного гидролиза проводилась в конических колбах с использованием инкубационной системы, состоящей из шейкера Unimax 1010 и инкубатора Inkubator 1000 (производитель Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Germany). Совмещенный процесс ферментативного гидролиза и спиртового брожения проводился в колбах объемом 2 л с гидрозатвором в термостате суховоздушном ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 28 °С.

Результаты эксперимента отражены в таблице 3.2.

По численности клеток дрожжей в процессе сбраживания отличались опыты 1 и 2, в них общее количество клеток дрожжей на протяжении всего процесса составляло всего 6,5–9,0 млн КОЕ/мл, почкующихся около 7 %. Это свидетельствует о неблагоприятных условиях для жизнедеятельности дрожжей в этих опытах ввиду высокой вязкости среды, обусловленной большим количеством негидролизованного субстрата. Во всех опытах реакционная масса через 8 и 15 ч от начала ферментативного гидролиза была вязкой, это особенность используемого субстрата из шелухи овса [169]. Наибольшее количество клеток дрожжей наблюдалось на вторые сутки при проведении опыта 6 – 34,5 млн КОЕ/мл, из них почкующихся 12 %. В других опытах накапливалось меньшее количество дрожжей (17,0–28,5 млн КОЕ/мл, из них почкующихся 12–28 %).

Такую низкую численность клеток дрожжей можно объяснить адсорбцией дрожжей на субстрате, потому как ферментативный гидролизат не фильтруется перед совмещением стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения (в отличие от традиционного последовательного проведения стадий).

Таблица 3.2 – Зависимость степени конверсии субстрата от продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза

Номер опыта	1	2	3	4	5	6
Продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза, ч	8	15	24	39	48	72
Концентрация РВ в момент внесения дрожжей, г/л	17,0	24,6	29,1	32,5	34,3	34,8
Степень гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз субстрата перед внесением дрожжей, %	27,6	40,0	47,3	52,8	55,7	56,6
Остаточная концентрация РВ после спиртового брожения, г/л	9,0	7,7	5,7	5,7	5,8	9,0
Концентрация биоэтанола, % об.	0,9	1,3	1,9	1,8	1,7	1,4
Выход биоэтанола, %	24,9	35,9	52,5	49,7	47,0	38,7
Выход биоэтанола, дал/т шелухи овса	5,2	7,5	11,0	10,4	9,8	8,7

Поиск оптимальной продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза перед совмещением его со спиртовым сбраживанием проводился путем обработки экспериментальных результатов следующим образом.

На первом этапе проводилась обработка экспериментальных данных, имеющих отношение непосредственно к процессу ферментативного гидролиза, с целью нахождения теоретических закономерностей кинетики данного процесса согласно работе [161].

Известно по классической теории ферментативного катализа Михаэлиса-Ментен, что получение продукта (РВ) из субстрата (целлюлозы) происходит через стадию образования фермент-субстратного комплекса (ES). Образование фермент-субстратного комплекса при этом характеризуется константой скорости  $k_1$ , реакция распада комплекса –  $k_2$ , реакция образования конечного продукта (P) –  $k_3$ . Этот механизм описывается следующим уравнением реакции (3.4):



где S – субстрат; E – фермент; ES – фермент-субстратный комплекс; P – продукт.

Вводя обозначения концентрации исходного и промежуточного веществ и продукта реакции (РВ) как  $C_S$ ,  $C_{ES}$  и  $C_P$ , записана система уравнений кинетики ферментативного гидролиза. Описывающие процесс гидролиза дифференциальные уравнения записаны следующим образом (3.5):

$$\begin{aligned}\frac{dC_S}{dt} &= -k_1 C_S + k_2 C_{ES} \\ \frac{dC_{ES}}{dt} &= k_1 C_S - (k_2 + k_3) C_{ES} \\ \frac{dC_P}{dt} &= k_3 C_{ES}\end{aligned}\quad (3.5)$$

В качестве начальных условий ( $t=0$ ) при решении системы дифференциальных уравнений принимались:  $C_S=C_m$ ;  $C_{ES}=C_P=0$ .

Выражения (3.6, 3.7), приведённые ниже, являются решением системы уравнений (3.5) [165]:

$$C_S = C_m \left\{ \frac{\lambda_2 - k_1^{-1} k_3}{\lambda_2 (\lambda_2 - \lambda_3)} \exp(-\lambda_2 k_1 t) + \frac{k_1^{-1} k_3 - \lambda_3}{\lambda_3 (\lambda_2 - \lambda_3)} \exp(-\lambda_3 k_1 t) \right\} \quad (3.6)$$

$$C_{ES} = \frac{C_m}{\lambda_2 - \lambda_3} [\exp(-k_1 \lambda_3 t) - \exp(k_1 \lambda_2 t)], \quad (3.7)$$

где  $\lambda_2 = \frac{1}{2}(\alpha + \beta)$ ;  $\alpha = 1 + \frac{k_2}{k_1} + \frac{k_3}{k_1}$ ;  $\lambda_3 = \frac{1}{2}(\alpha - \beta)$ ;  $\beta = \left(\alpha^2 - \frac{4k_3}{k_1}\right)^{0,5}$ .

Коэффициенты скоростей реакций  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  и  $C_m$  зависят от природы субстрата, от внешних условий (рН, температуры среды, условий перемешивания суспензии в процессе ферментативного гидролиза и др.). Поскольку условия проведения опытов по ферментативному гидролизу не менялись, то данные коэффициенты являются константами.

Экспериментальные данные обрабатывались следующим образом: уравнения (3.6) и (3.7) были объединены в выражение (3.8), которое описывает изменение концентрации РВ:

$$C_P = C_m - (C_S + C_{ES}) \quad (3.8)$$

Выражение (3.8) применялось в качестве аппроксимирующей функции, которая определяет коэффициенты модели. Аппроксимация экспериментальных данных, показанная на рисунке 3.5, выполнялась методом наименьших квадратов [166].

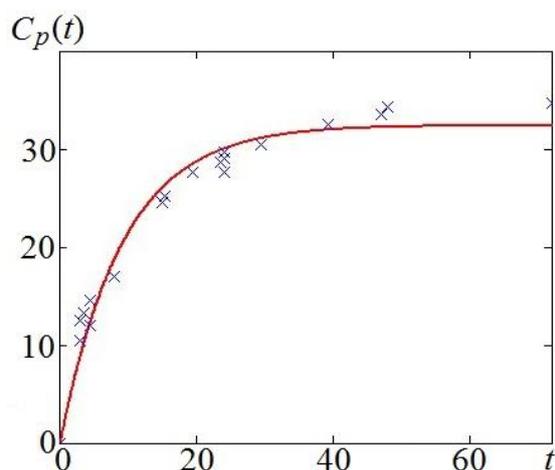


Рисунок 3.5 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментативного гидролиза: точки – экспериментальные данные; линия – теоретическая кривая, полученная в результате аппроксимации выражения (3.8)

Согласно результатам математического моделирования константы, входящие в систему уравнений (3.5) и выражение (3.8) имеют следующие значения:  $k_1=0,128$ ;  $k_2=1,839$ ;  $k_3=11,091$ ;  $C_m=32,472$ . Адекватность полученной математической модели была подтверждена по критерию Фишера при уровне значимости 0,05. Полуширина доверительного интервала при вероятности 0,95 составила 5,53 г/л.

На втором этапе проводилась обработка результатов совмещения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения в опытах 1–6 в следующие моменты времени от начала ферментативного гидролиза: 8 ч, 15 ч, 24 ч, 39 ч, 48 ч и 72 ч. Соответственно, увеличивалась концентрация РВ, при которых в реакционную массу вносились дрожжи: 17,0 г/л, 24,6 г/л, 29,1 г/л, 32,5 г/л, 34,3 г/л, 34,8 г/л.

При внесении дрожжей концентрация РВ снижалась в результате их преобразования в биоэтанол. Отметим, что преобразование РВ в биоэтанол проходило неполно и зависело от момента времени внесения в реакционную массу дрожжей.

Поскольку концентрация  $C_p(t)$  показывает общее количество РВ в реакционной массе (как преобразуемых в биоэтанол, так и не преобразуемых в него) и, полагая, что отношение концентраций переработанных и непереработанных РВ в биоэтанол сохраняется постоянным в отдельно взятом эксперименте, введем коэффициент  $k_0$ , характеризующий долю не утилизируемых в биоэтанол РВ (3.9):

$$k_0(t_0) = C_n(t_0) / C_m \quad (3.9)$$

Изменение концентрации РВ, не утилизируемых в биоэтанол в таком случае можно найти как (3.10):

$$C_0(t, t_0) = k_0(t_0) \cdot C_p(t) \quad (3.10)$$

Отсюда концентрацию РВ, утилизируемых в биоэтанол, находим как (3.11):

$$C_{ps}(t, t_0) = C_p(t) - C_0(t, t_0) = (1 - k_0(t_0)) C_p(t) \quad (3.11)$$

Зависимость коэффициента  $k_0(t_0)$  представлена на рисунке 3.6.

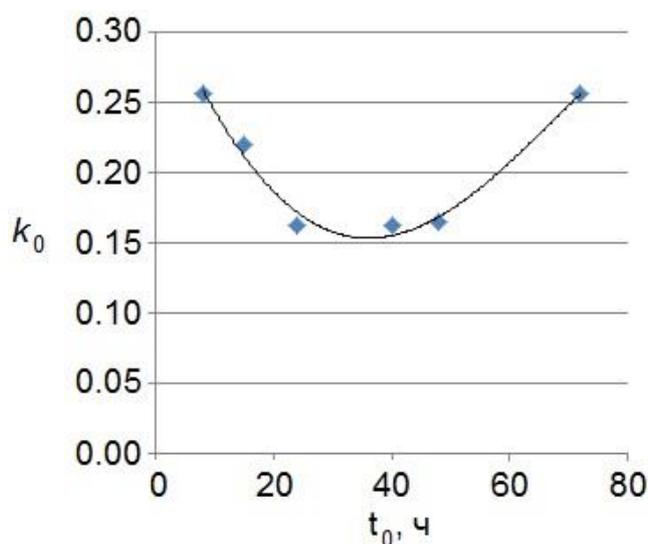


Рисунок 3.6 – Зависимость коэффициента  $k_0$  от времени внесения дрожжей

Согласно результатам расчета, коэффициент  $k_0$  определяется выражением (3.12):

$$k_0 = -0,000000007t_0^4 + 0,00000025t_0^3 + 0,000147t_0^2 - 0,01024t_0 + 0,3319 \quad (3.12)$$

Полагая, что скорость сбраживания линейно зависит от концентрации утилизируемых в биоэтанол РВ, можно записать уравнение (3.13):

$$\frac{dC_k}{dt} = -k_4 C_{ps}(t, t_0) \quad (3.13)$$

Решением уравнения (3.13) является выражение (3.14):

$$C_k(t, t_0) = \begin{cases} 0, & t \leq t_0; \\ (1 - k_0(t, t_0)) C_{ps}(t, t_0) [1 - \exp(-k_4(t - t_0))]; & t > t_0 \end{cases} \quad (3.14)$$

Сравнение результатов математической модели с экспериментальными данными представлено на рисунке 3.7, на котором наблюдается хорошая сходимость результатов.

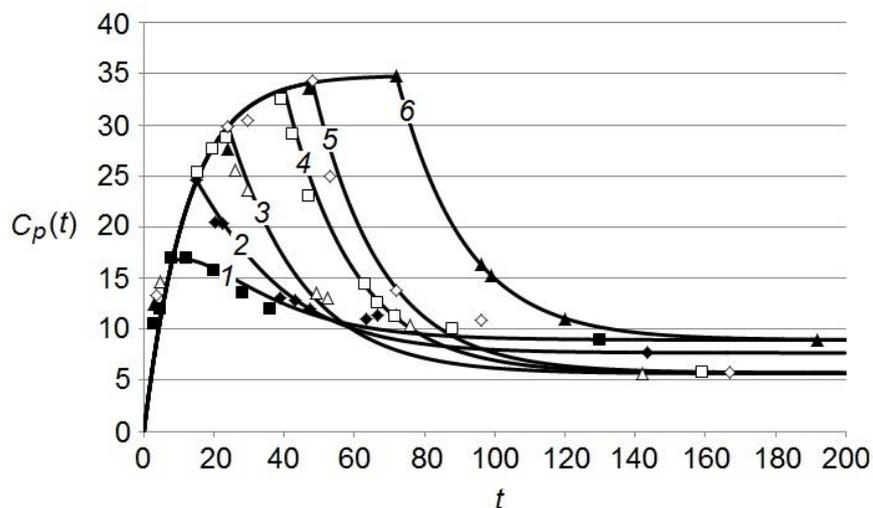


Рисунок 3.7 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности процесса; 1)  $t_0 = 8$  ч; 2)  $t_0 = 15$  ч; 3)  $t_0 = 24$  ч; 4)  $t_0 = 39$  ч; 5)  $t_0 = 48$  ч; 6)  $t_0 = 72$  ч; точки – экспериментальные данные; линии – теоретические

Интересно, что максимальная концентрация утилизованных РВ наблюдается для опытов 3, 4 и 5. Это объясняется тем, что было сделано допущение о том, что концентрация РВ, достигаемая через 72 ч отдельного ферментативного гидролиза в опыте 6 и равная 34,8 г/л, является максимальной. Накопленные 34,8 г/л РВ являются ингибиторами процесса ферментативного гидролиза, поэтому при их отведении в опытах 3–5 и использовании на синтез биоэтанола, ферментативный гидролиз возобновляется. Вот почему концентрация утилизованных РВ в этих опытах повышается. Однако в опытах 1 и 2 концентрация утилизованных РВ ниже, чем в опыте 6 (контроле), это объясняется низкой концентрацией РВ в момент внесения дрожжей и затруднённым ферментативным гидролизом из-за снижения температуры. Кроме того, наблюдается адсорбция дрожжей на субстрате, что затрудняет синтез биоэтанола и отвод РВ из системы.

Концентрация биоэтанола  $K$  (% об.) прямо пропорциональна концентрации утилизованных РВ (3.15):

$$K = k_5 C_k(t, t_0) \cdot 100 \% \text{ об.}, \quad (3.15)$$

где  $k_5 = 0,0006479$  л – теоретический выход биоэтанола из 1 г глюкозы.

Выход биоэтанола (% от массы субстрата) определялся по выражению (3.16):

$$Y(t, t_0) = C_k(t, t_0) / C_s(0) \cdot 100 \% , \quad (3.16)$$

где  $C_s(0) = 60$  г/л – начальная концентрация субстрата.

Выход биоэтанола  $Y$  для рассматриваемого случая зависит от двух параметров: общей продолжительности процесса –  $t$ , и от времени внесения дрожжей –  $t_0$ .

Графическое представление о концентрации биоэтанола и выходе биоэтанола при совмещении двух процессов представлено на рисунках 3.8 и 3.9 соответственно.

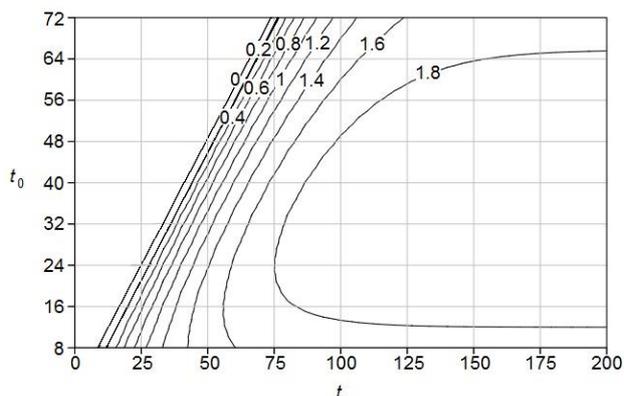


Рисунок 3.8 – Зависимость концентрации биоэтанола  $K$  (% об.) от общей продолжительности процесса ( $t$ , ч) и времени внесения дрожжей ( $t_0$ , ч)

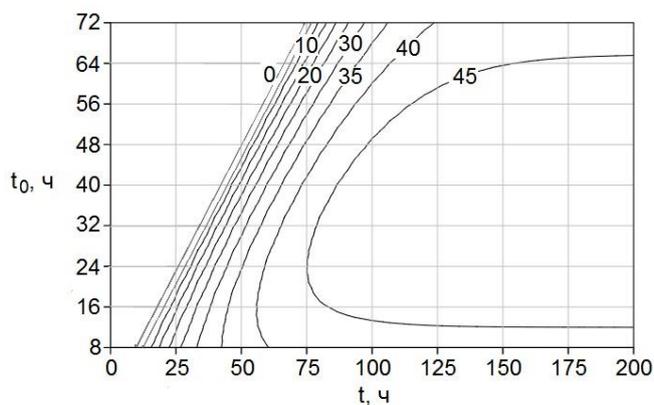


Рисунок 3.9 – Зависимость выхода биоэтанола  $Y$  (%) от общей продолжительности процесса ( $t$ , ч) и времени внесения дрожжей ( $t_0$ , ч)

В качестве параметра оптимизации при совмещении процессов ферментативного гидролиза со сбраживанием рассматривали минимум общей продолжительности процессов, при котором выход биоэтанола 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 при условии внесения дрожжей через 24 ч от начала ферментативного гидролиза.

Таким образом, оптимальная продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза субстрата из шелухи овса в данных условиях – 24 ч. В течение этого времени целлюлоза и гемицеллюлозы субстрата гидролизуются на 84 % от максимально возможных в данных условиях РВ.

Чтобы экстраполировать результаты данного эксперимента на другой лигноцеллюлозный субстрат при тех же условиях, нужно иметь в виду различия в скорости гидролиза разных субстратов. Поэтому отдельную стадию ферментативного гидролиза рекомендовано проводить не обязательно 24 ч. Стадия должна проводиться столько времени, чтобы обеспечить гидролиз на 84 % от максимально возможных для данного субстрата в данных условиях РВ, затем можно вносить дрожжи. Совмещение ферментативного гидролиза и спиртового брожения при степени конверсии, не достигшей 84 %, не даст высокий выход биоэтанола ввиду раннего изменения температурного оптимума для действия гидролитических ферментов и адсорбции дрожжей на субстрат. Проведение стадии ферментативного гидролиза до степени конверсии более 84 % увеличит общую продолжительность процесса, увеличит риск контаминации посторонней микрофлорой, не приведет к существенной интенсификации процесса ферментативного гидролиза за счет отведения сбраживаемых сахаров дрожжами.

Таким образом, решение задачи совмещения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения для неизвестных видов субстратов может быть упрощено. Во-первых, следует провести процесс ферментативного гидролиза в течение

72 ч и определить максимально возможную для данного субстрата концентрацию РВ. Во-вторых, определить продолжительность ферментативного гидролиза, за которую обеспечивается гидролиз субстрата на 84 % от максимально возможной концентрации РВ. В-третьих, провести совмещение стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения в установленный момент времени. Результаты данного исследования опубликованы в работе [167].

### 3.3 Оптимизация состава питательной среды на основе ферментативного гидролизата стимуляторами биосинтеза этанола

Задачей данного эксперимента являлось нахождение оптимального состава питательной среды, соответствующего максимальному выходу биоэтанола при спиртовом брожении ферментативного гидролизата ПАО шелухи овса.

Сначала был проведен ферментативный гидролиз ПАО при концентрации субстрата 60 г/л по сухим веществам. Ферментативный гидролиз проводился в ферментёре авторской конструкции Павлова И.Н. объёмом 11 л (рабочий объём 7–9 л) – вертикальном аппарате с перемешивающим устройством, оборудованном теплообменным элементом, приспособлением для подачи компонентов, пробоотборником [168], рН электродом InPro 42XX (Mettler Toledo, США) и трансмиттером M200 (Mettler Toledo, Швейцария). Использовались ФП в следующей дозировке: «Целлюлюкс-А» 40 мг/г субстрата, «Брюзайм ВGX» 200 мг/г субстрата. Процесс ферментативного гидролиза проводился при температуре  $(46 \pm 2)^\circ\text{C}$  в течение 42 ч, активная кислотность поддерживалась вручную на уровне  $(4,8 \pm 0,2)$  ед. рН. Концентрация РВ в ферментативном гидролизате составила 46,5 г/л, в том числе пентоз – 4,8 г/л, концентрация сбраживаемых сахаров (СС) – 41,7 г/л. С помощью вакуум-фильтрации по окончании ферментативного гидролиза жидкая фракция гидролизата отделялась от твёрдого остатка.

Исследовалось влияние на выход биоэтанола таких факторов: концентрации монофосфата калия, сульфата аммония и дрожжевого экстракта (таблица 3.2). Реализация плана полного трёхфакторного эксперимента не привела к получению

адекватной экспериментально-статистической модели, поэтому были проведены дополнительные семь опытов (таблица 3.3, варианты 9–15). Кроме приведенных выше компонентов, в среды также вносился кальций хлористый (0,2 г/л) и сульфат магния (1 г/л), их концентрации во всех опытах были одинаковые.

Готовые питательные среды стерилизовались методом автоклавирования (0,5 атм, 20 мин) и в них вносились засевные дрожжи – суспензия культуры *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693, культивируемой 24 ч при 28 °С на солодовом сусле. Дозировка засевных дрожжей для разных вариантов составила от 8 до 12 % так, чтобы в начальный момент времени в питательной среде общее количество дрожжей было одинаково во всех вариантах – 11,0 млн КОЕ/мл. Общее количество клеток в засевных дрожжах варьировалось от 105 млн КОЕ/мл до 135 млн КОЕ/мл, а доля почкующихся клеток – от 15 % до 22 %. Спиртовое брожение проводилось в колбах объемом 2 л с гидрозатвором в термостате ТС-1/80 при температуре 28 °С. В таблице 3.3. приведены результаты экспериментов по исследованию влияния состава питательной среды на характеристики спиртового брожения.

Таблица 3.3– План экспериментов и результаты исследования влияния состава питательной среды на характеристики спиртового брожения

№	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , г/л	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , г/л	Дрожжевой экстракт, г/л	Концентрация биоэтанола, % об.	Выход биоэтанола, %	Константа скорости убыли СС·10 <sup>3</sup> , ч <sup>-1</sup>	Остаточная концентрация РВ, г/л
1	0	4	20	1,70	63,0	49,5	11,1
2	4	4	20	1,60	59,3	49,7	10,7
3	0	0	20	1,65	61,1	49,6	11,0
4	4	0	20	1,60	59,3	49,6	10,9
5	0	4	0	1,85	68,5	50,2	9,3
6	4	4	0	2,00	74,1	50,3	9,2
7	0	0	0	2,20	81,5	50,0	9,9
8	4	0	0	2,00	74,1	50,5	8,5
9	2	2	10	2,35	87,0	50,2	9,4
10	2	2	0	2,20	81,5	50,0	10,0
11	2	0	10	2,40	88,9	50,6	8,4
12	0	2	10	2,20	81,5	50,4	8,8
13	4	2	10	2,10	77,8	50,5	8,5
14	2	2	20	2,10	77,8	49,6	10,9
15	2	4	10	2,30	85,2	49,7	10,6

Выход биоэтанола варьировал от 59,3 % (неудачные опыты) до 88,9 % (максимальный выход).

Экспериментально-статистическая модель была построена с помощью метода наименьших квадратов. В результате реализации плана полного трехфакторного эксперимента  $2^3$  (варианты 1–8) установлен нелинейный характер функции отклика. С целью уточнения типа нелинейной зависимости искомой функции проводились дополнительные опыты (варианты 9–15). В результате обработки экспериментальных данных было установлено, что зависимость концентрации биоэтанола  $K$  от состава питательной среды описывается выражением (3.17).

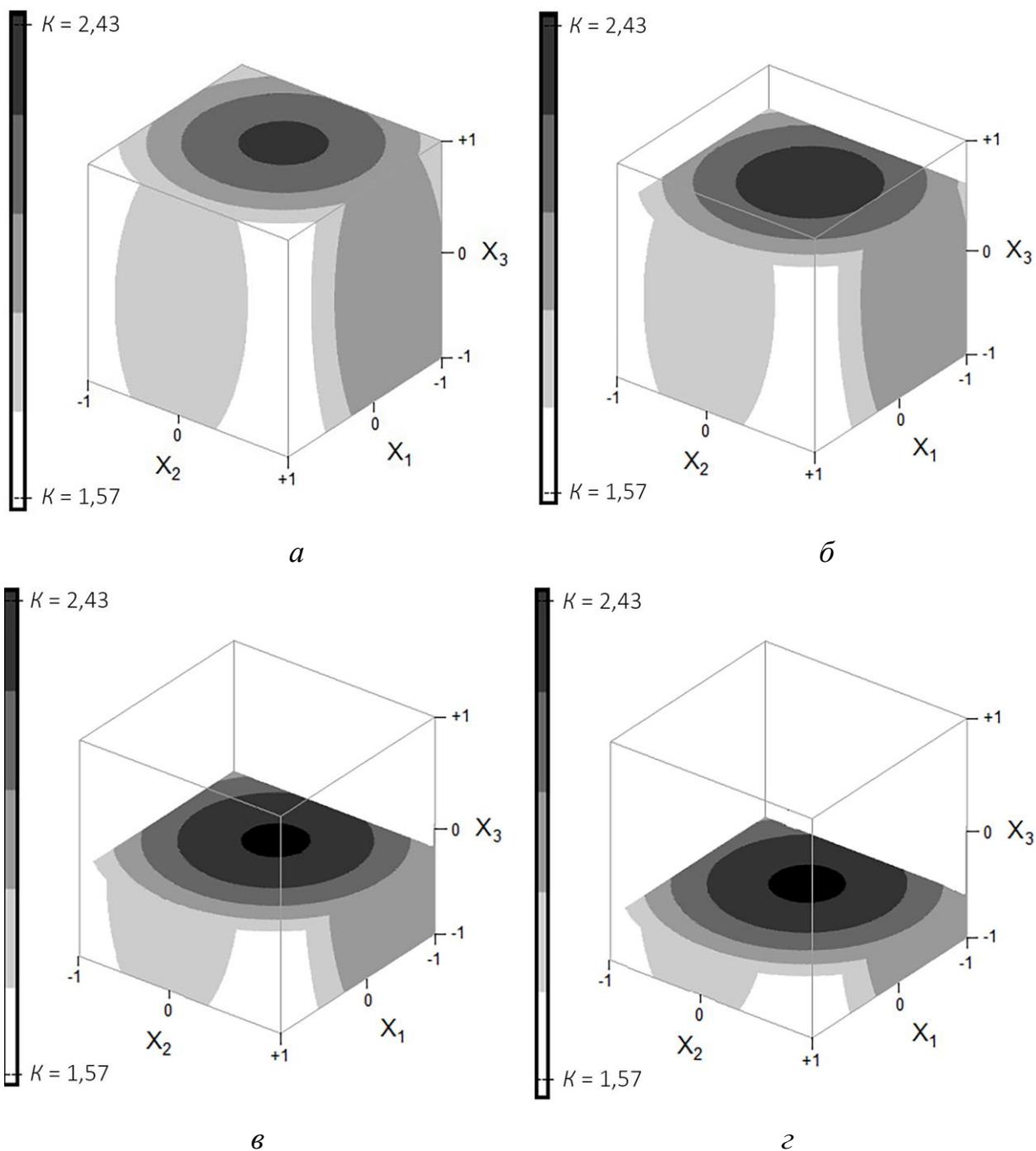
$$K = 2,39 - 0,03X_1 - 0,04X_2 - 0,16X_3 + 0,04X_1X_2 - 0,01X_1X_3 + 0,05X_2X_3 - 0,26X_1^2 - 0,06X_2^2 - 0,26X_3^2, \quad (3.17)$$

где  $K$  – концентрация биоэтанола, % об.;

$X_1, X_2, X_3$  – концентрации сульфата аммония, монофосфата калия и дрожжевого экстракта соответственно, выраженные в безразмерном виде.

Минимальным концентрациям компонентов в питательной среде, а именно, 0 г/л для всех трёх факторов, соответствуют нижние границы безразмерных факторов (-1). Верхние границы безразмерных факторов (+1) соответствуют максимальным концентрациям компонентов питательной среды в исследуемом диапазоне: 4 г/л – для сульфата аммония, 4 г/л – для монофосфата калия, 20 г/л – для дрожжевого экстракта. Адекватность полученного выражения (3.17) была подтверждена по критерию Фишера при уровне значимости 0,05. Доверительный интервал для  $K$  равен  $\pm 0,05$ .

На рисунке 3.10 приведено графическое представление функции отклика  $K$  в виде сечений гиперкуба. Изменение концентрации биоэтанола в зависимости от состава питательной среды показано градациями цвета: концентрация биоэтанола тем выше, чем насыщеннее цвет.



$a - X_3 = +1,0$ ;  $б - X_3 = +0,6$ ;  $в - X_3 = -0,2$ ;  $г - X_3 = -0,6$

Рисунок 3.10 – Изменение концентрации биоэтанола ( $K$ , % об.) в зависимости от состава среды

В результате анализа полученного уравнения показано, что наиболее значимыми факторами, влияющими на концентрацию биоэтанола, являются концентрации сульфата аммония и дрожжевого экстракта. Концентрация монофосфата калия в диапазоне от 0 г/л до 2 г/л не оказывает существенного влияния на показатели

спиртового брожения, а в диапазоне от 2 г/л до 4 г/л приводит к снижению концентрации и выхода биоэтанола. Это можно объяснить достаточным содержанием в нативном гидролизате фосфора для питания дрожжей, так как в процессе проведения ферментативного гидролиза активная кислотность среды корректировалась с помощью ортофосфорной кислоты. В результате сбраживания нативного гидролизата (вариант 7) выход биоэтанола составил 81,5 %, что говорит об отсутствии в среде технологически вредных компонентов и ингибиторов. Получить доброкачественную питательную среду позволяет коррекция минерально-витаминного состава, например, в варианте 11 достигнут выход биоэтанола 88,9 %.

Нахождение оптимального состава питательной среды проводилось методом приведенного градиента. В результате решения задачи оптимизации было установлено, что для достижения наибольшего выхода биоэтанола нужно обеспечить следующие исходные концентрации факторов: дрожжевого экстракта – 6,47 г/л, сульфата аммония – 1,82 г/л, монофосфата калия – 0,98 г/л. При указанных исходных концентрациях выход биоэтанола будет равен 89,9 % (при концентрации биоэтанола 2,43 % об), это выше на 8,4 % выхода биоэтанола, полученного в контрольном опыте (вариант 7). Как было отмечено ранее, концентрация монофосфата калия практически не влияет на характеристики биоэтанола, в связи с этим его исключение позволит получить биоэтанол с выходом 89,6 % (при концентрации биоэтанола 2,42 % об.)

Для анализа зависимости эффективности спиртового брожения от состава сред рассчитывались константы скоростей убыли субстрата (таблица 3.3). Все константы были очень близки (от  $49,5 \cdot 10^{-3}$  в варианте 1 до  $50,6 \cdot 10^{-3}$  в варианте 11), это говорит об одинаковой во всех вариантах биохимической активности дрожжей. Отмечается также, что остаточные концентрации РВ тем меньше, чем выше константы скоростей убыли субстрата. Результаты данного исследования опубликованы в работе [169].

### 3.4 Выбор штамма *Saccharomyces cerevisiae*

Различия оптимумов действия целлюлолитических ферментов (40-60°C) и комплекса ферментов продуцента биоэтанола (например, для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 оптимум равен 28° С) является проблемой совмещения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения. Поэтому желательно, чтобы продуцент биоэтанола был термотолерантным, чтобы его температурный оптимум был близок с оптимумом целлюлолитических ферментов, и осмофильным, чтобы выдерживать высокие концентрации сухих веществ в реакционной массе. Но в первую очередь продуцент должен быть технологически устойчивым к гидролизным средам и обладать повышенной продуктивностью.

В связи с этим, в данном исследовании проведен скрининг штаммов спиртовых дрожжей для получения биоэтанола из шелухи овса. Характеристики выбранных штаммов (*S. cerevisiae* Y-3137, *S. cerevisiae* Y-3136 и контрольного *S. cerevisiae* Y-1693) приведены в таблице 2.3.

Выбранные штаммы были использованы в качестве засевных дрожжей в совмещенных процессах ферментативного гидролиза и спиртового брожения ПАО. Контролем послужил используемый ранее в данном процессе штамм *S. cerevisiae* Y-1693.

Влажный субстрат (ПАО) направлялся на ферментативный гидролиз, который проводился при перемешивании (150 об/мин) в водной среде при концентрации субстрата 60 г/л по сухим веществам, активная кислотность поддерживалась на уровне  $4,8 \pm 0,2$  ед. рН; применялась МЭК из расчета: «Целлолюкс-А» – 54 мг/г субстрата, «Ультрафло Коре» – 165 мг/г субстрата; объем реакционной массы – 1 л, температурный режим –  $(46 \pm 2)$  °С.

Засевные дрожжи готовились культивированием 24 ч на среде солодового суслу, штамм Y-3137 культивировался при температуре 35 °С, Y-3136 – при 32 °С, Y-1693 – при 28 °С.

По истечении 26 ч от начала проведения отдельной стадии ферментативного гидролиза температура намеренно понижалась до значения, оптимального для каждого штамма, вносились засевные дрожжи (10 % от реакционной массы) и стадии ферментативного гидролиза и спиртового брожения проводились совмещенно в течение 7 суток.

Отдельная стадия ферментативного гидролиза проводилась в конических колбах с использованием инкубационной системы, состоящей из шейкера Unimax 1010 и инкубатора Inkubator 1000. Совмещенный процесс проводился в колбах объемом 2 л с гидрозатвором в термостате ТС-1/80.

В процессе экспериментов в реакционной массе контролировалась активная кислотность и корректировалась внесением растворов ортофосфорной кислоты и аммиака, определялась концентрация РВ, глюкозы, биоэтанола и проводился подсчет количества клеток дрожжей.

На рисунке 3.11 показаны результаты проведения трех опытов в виде зависимостей концентрации РВ и концентрации биоэтанола от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения.

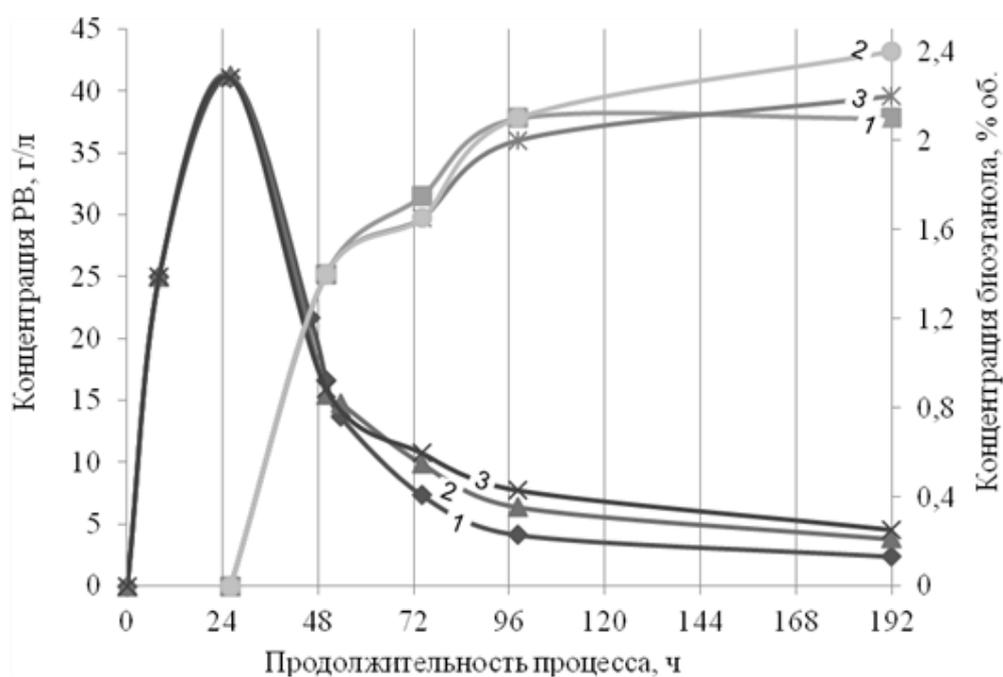


Рисунок 3.11 – Зависимости концентрации РВ и концентрации биоэтанола от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения;

1 – опыт с Y-3137, 2 – опыт с Y-3136, 3 – опыт с Y-1693

Изменение концентрации РВ в трех опытах происходило практически одинаково: большая часть РВ утилизировалась в первые сутки брожения, остаточная концентрация РВ составила: в опыте с Y-3137 – 2,4 г/л, с Y-3136 – 3,8 г/л, с Y-1693 – 4,6 г/л. Остаточная глюкоза во всех экспериментах не определялась количественно.

Наибольшее количество клеток дрожжей было накоплено на вторые сутки брожения во всех опытах и равнялось 36 млн КОЕ/мл (28 % почкующихся) в опыте с Y-3137, 34 млн КОЕ/мл (25 % почкующихся) в опыте с Y-3136, 53 млн КОЕ/мл (25 % почкующихся) в опыте с Y-1693. На седьмые сутки брожения количество клеток дрожжей в первом опыте уменьшилось до 11 млн КОЕ/мл (13 % почкующихся), во втором опыте осталось на том же уровне – 34 млн КОЕ/мл (24 % почкующихся), в третьем также – 51 млн КОЕ/мл (21 % почкующихся). Несмотря на то, что количество дрожжей Y-3137 и Y-3136 было несколько меньше, чем контрольных Y-1693, они все же проявили активность и показали устойчивость к гидролизной среде.

Все три штамма показали равнозначные результаты по концентрации биоэтанола на третьи сутки брожения (2,0-2,1 % об.). В конце брожения проявилось отличие: в опыте с Y-3137 – 2,1 % об., в опыте с Y-3136 – 2,4 % об., в контрольном опыте с Y-1693 – 2,2 % об., т.е. штамм *S. cerevisiae* Y-3136 показал наибольшую эффективность.

Таким образом, экспериментальные данные показали, что исследуемые штаммы *S. cerevisiae* Y-3137 и *S. cerevisiae* Y-3136 могут применяться не только в пищевом производстве, но и в технологии технического биоэтанола.

Для апробации технологии получения биоэтанола из шелухи овса на опытно-промышленном производстве биоэтанола выбран штамм *S. cerevisiae* Y-3136.

### 3.5 Применение метода фермент-субстратной подпитки при получении биоэтанола

Опыты по применению метода фермент-субстратной подпитки при получении биоэтанола проводились в ферментере авторской конструкции Павлова И.Н. объемом 11 л.

Для осуществления спиртового брожения использовалась культура *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693, культивируемая с целью адаптации на смешанной питательной среде: 50 % солодового сусле и 50 % супернатанта ферментативного гидролизата соответствующего субстрата с концентрацией РВ 30 г/л; продолжительность культивирования 24 ч, температура 28 °С. Объем засевных дрожжей во всех опытах составил 15 % от объема реакционной массы, при работе с ПАО одновременно с засевными дрожжами в реакционную массу вносился питательный раствор на основе дрожжевого экстракта. сульфата аммония, монофосфата калия, сульфата магния и кальция хлористого (согласно п. 3.3.)

Общие условия проведения процессов получения биоэтанола:

- среда водная;
- начальный объем реакционной массы 6 л;
- активная кислотность ( $4,8 \pm 0,2$ ) ед. рН;
- перемешивание от 500 до 150 об/мин (варьировалось по мере разжижения реакционной массы);
- температурный режим проведения ферментативного гидролиза  $46 \pm 2$  °С, спиртового брожения 30 °С.
- внесение антибиотика (бензилпенициллин) из расчета 3 тыс. ЕД/л реакционной массы каждые 24 ч.

В ходе проведения ферментативного гидролиза и спиртового брожения контролировалась и при необходимости корректировалась активная кислотность, определялись концентрации РВ, СВ, биоэтанола и проводился микробиологический анализ реакционной массы. При наложении времени отбора проб и подпитки,

сначала производился отбор, затем подпитка. При работе с ПАО дополнительно определялась концентрация глюкозы.

### 3.5.1 Получение биоэтанола из продукта щелочной делигнификации шелухи овса

Данный опыт проводился при начальной концентрации ПЩД 30 г/л по сухим веществам. Ферментативный гидролиз осуществлялся с применением ФП в дозировке: «Целлолюкс-А» 40 мг/г субстрата, «Брюзайм ВGX» 200 мг/г субстрата. Подпитка системы свежими порциями субстрата (по 30 г/л) и ФП из расчета на порцию субстрата осуществлялась каждые 12 ч. Засевные дрожжи вносились через 24 ч от начала ферментативного гидролиза, после охлаждения реакционной массы до 30° С. По истечении 36 ч от начала ферментативного гидролиза общая концентрация субстрата в системе составила 120 г/л, и поэтому было принято решение не увеличивать концентрацию субстрата из-за видимых проблем с массообменом. Общая продолжительность процесса составила 96 ч.

График изменения концентрации СВ приведен на рисунке 3.12. Массовая доля СВ соответствовала концентрации внесенного субстрата до 24 ч, после чего были внесены дрожжи, и поэтому анализ СВ (через 32 ч и 40 ч) после двух последних подпиток показал значения ниже общей концентрации субстрата (12 %), так как дрожжи уже утилизировали часть СВ для образования этанола и углекислоты. Продолжительное время массовая доля СВ находилась практически на одном уровне и лишь через 64 ч начала убывать, но снизилась незначительно (конечная концентрация СВ 8,4 %). Косвенно это свидетельствует о затруднённом массообмене. Более полно о степени гидролиза и сбраживания можно судить по анализам концентрации РВ.

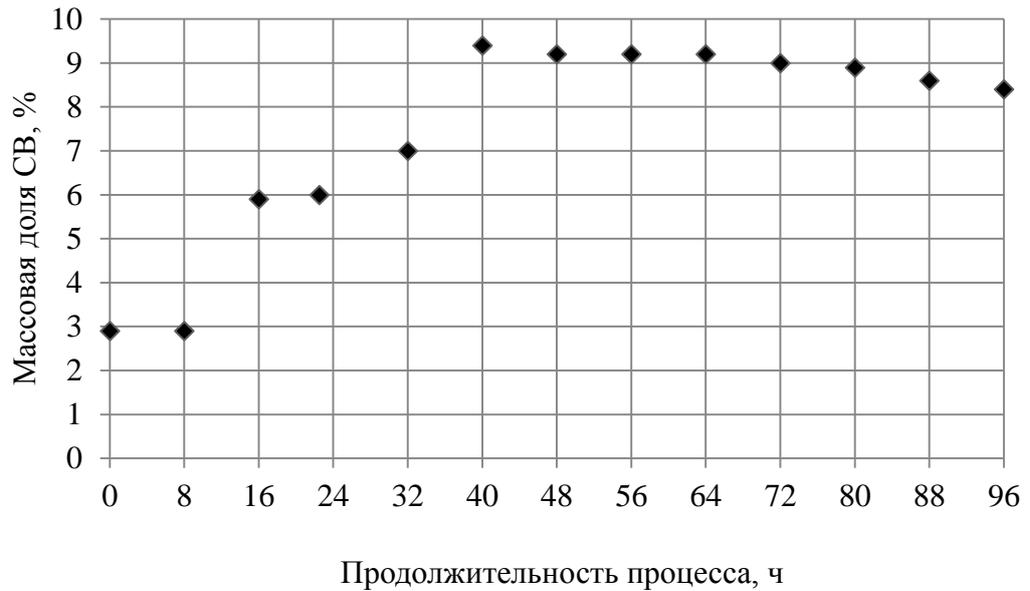


Рисунок 3.12 – Зависимость концентрации СВ от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения

Изменения концентраций РВ и биоэтанола в ходе эксперимента отражены на рисунке 3.13.

Накопление РВ при ферментативном гидролизе в первые 24 ч процесса шло достаточно быстро. Концентрация РВ после внесения дрожжей резко убывла и порядка 50 ч оставалась практически на одном уровне. Это свидетельствует о том, что одновременно осуществлялся процесс ферментативного гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз ПЩД шелухи овса и ассимиляция моносахаридов дрожжами. Через 92 ч концентрация РВ стала равна 9,5 г/л и далее не менялась, к этому же моменту перестала изменяться концентрация биоэтанола (2,1 % об.).

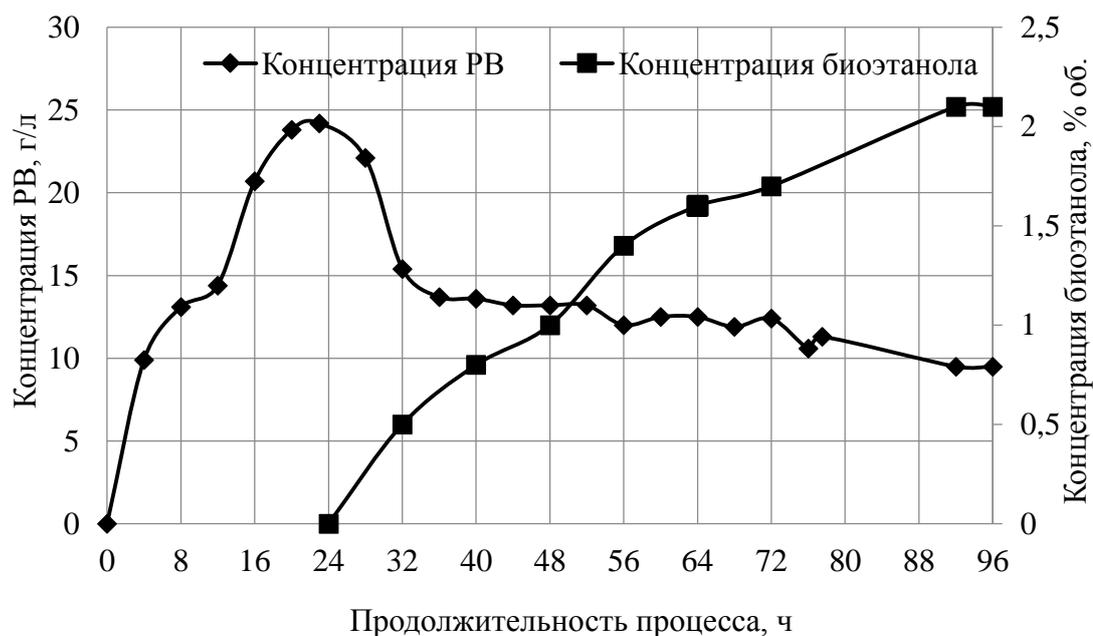


Рисунок 3.13 – Зависимость концентраций РВ и биоэтанола от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения

Выход биоэтанола составил 29,1 %, 6,1 дал/т шелухи овса.

Подсчитанные в камере Горяева значения количества клеток дрожжей в пробах реакционной массы представлены в таблице 3.4.

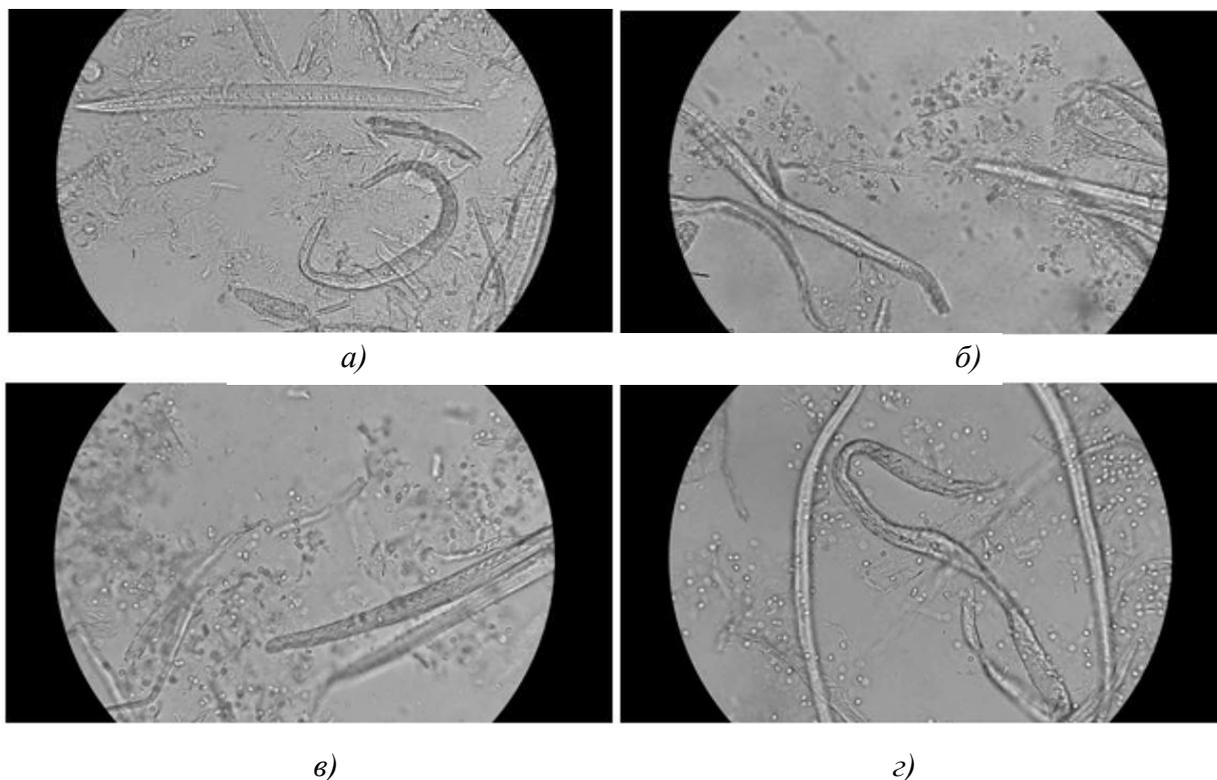
Таблица 3.4 – Количество клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693

Продолжительность процесса, ч	Общая численность дрожжей, млн КОЕ/мл	Доля почкующихся клеток, %
24	8,0	30
48	27,5	24
72	40,0	20
96	36,0	19

Максимальное количество клеток дрожжей было накоплено на вторые сутки сбраживания (72 ч), доля почкующихся клеток с момента внесения дрожжей постепенно уменьшалась.

На рисунке 3.14 показаны микрофотографии реакционной массы.

Видно, что клетки дрожжей круглой и овальной формы, мелкие по размеру, образуют скопления и находятся вблизи к частицам субстрата, частично адсорбируясь на нём.



от начала гидролиза: а) 24,5 ч, б) 51 ч, в) 71 ч, з) 92 ч

Рисунок 3.14 – Микрофотографии реакционной массы,  $\times 400$

Низкая численность дрожжей (27,5–40,0 млн КОЕ/мл) и их морфологическое состояние говорит о том, что высокая концентрация субстрата неблагоприятна для метаболизма дрожжей.

Таким образом, показано, что концентрация субстрата является избыточной при данной технологической схеме проведения процесса в силу реологических свойств высококонцентрированной суспензии ПЩД шелухи овса. Кроме того, на концентрации РВ и биоэтанола повлияло понижение температуры среды до температуры, необходимой для спиртового брожения дрожжей. Результаты этого эксперимента опубликованы в работе [170].

С учетом недостатков данного эксперимента были спланированы следующие опыты с применением фермент-субстратной подпитки для другого субстрата – ПАО шелухи овса.

### 3.5.2 Получение биоэтанола из продукта азотнокислой обработки шелухи овса

Для сравнения был проведен опыт без подпитки при концентрации субстрата 60 г/л по сухим веществам и 3 опыта с применением фермент-субстратной подпитки до общих концентраций субстрата 90–150 г/л по сухим веществам.

Предварительно был определен оптимальный момент для совмещения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения (время внесения засевных дрожжей) с учетом степени гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз субстрата согласно модели, описанной в п. 3.2.

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

Проведен ферментативный гидролиз ПАО в течение 72 ч. Процесс проводился при концентрации субстрата 30,0 г/л по сухим веществам, температурный режим –  $(46 \pm 2)$  °С, скорость перемешивания – 150 об/мин; концентрация МЭК: «Целлолюкс-А» – 54 мг/г субстрата, «Ультрафло Коре» – 165 мг/г субстрата.

Результаты ферментативного гидролиза представлены на рисунке 3.15. За концентрацию РВ, максимально возможную для данного субстрата, принята концентрация равная 26,7 г/л. Значит степени гидролиза 84 % от максимально возможной концентрации РВ соответствует концентрация РВ 22,4 г/л и продолжительность гидролиза 16 ч (пунктирная линия на рисунке 3.15). Таким образом, совмещение стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения нужно проводить через 16 ч с момента внесения последней порции субстрата.

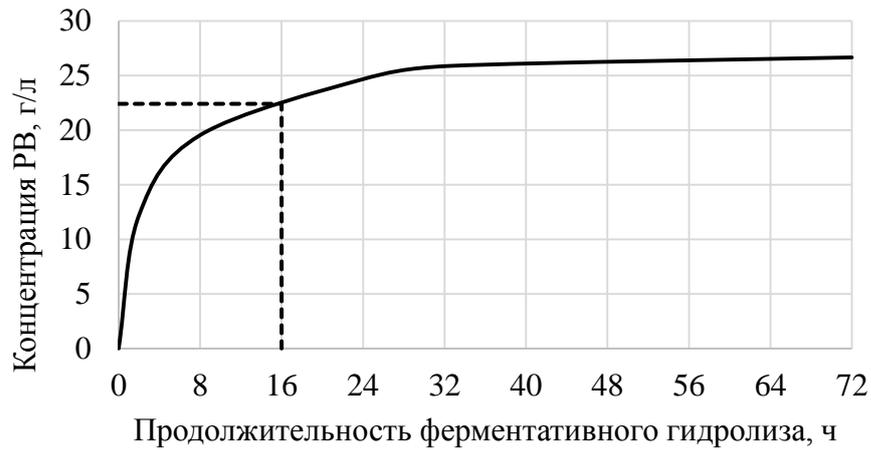


Рисунок 3.15 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментативного гидролиза ПАО

*Опыт получения биоэтанола без фермент-субстратной подпитки (опыт 1)*

Данный опыт проводился при концентрации ПАО в среде 60 г/л по сухим веществам, загрузка субстрата и МЭК осуществлялась разово в начале процесса. Засевные дрожжи вносились через 16 ч от начала ферментативного гидролиза. Общая продолжительность процесса составила 112 ч. На рисунке 3.16 показано изменение концентраций РВ, глюкозы и биоэтанола в ходе опыта 1.

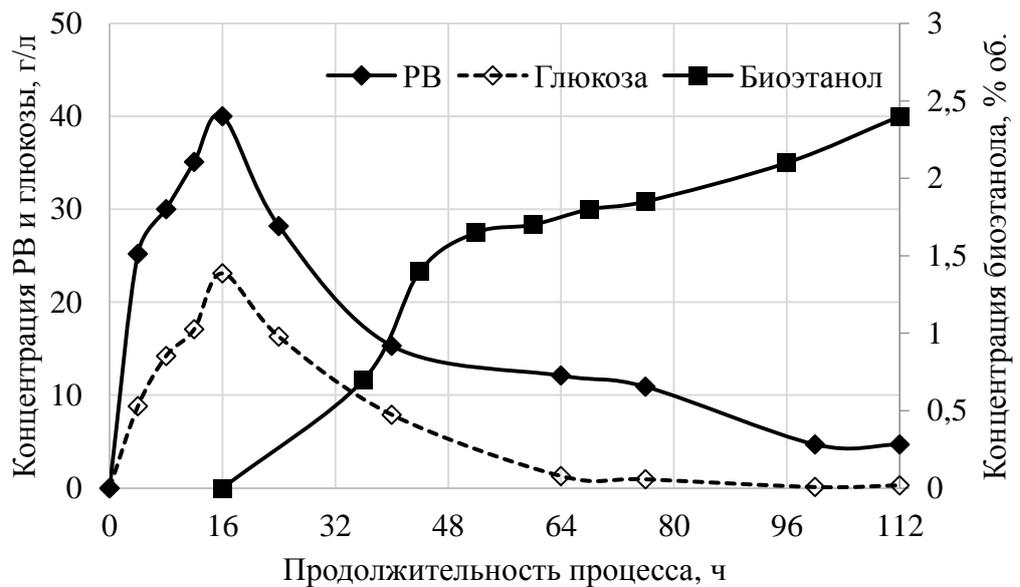


Рисунок 3.16 – Зависимости концентраций РВ и биоэтанола от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения

По графикам видно, что накопление глюкозы происходило одновременно с накоплением общих РВ, но с меньшей скоростью. На момент внесения засевных дрожжей концентрация РВ составила 40,0 г/л, из них концентрация глюкозы – 23,1 г/л. После внесения дрожжей концентрации РВ и глюкозы резко убывали в течение суток. Остаточная концентрация РВ через 4 сут брожения была равна 4,7 г/л, остаточная концентрация глюкозы не определялась количественно, это демонстрирует эффективность, с которой дрожжи утилизируют глюкозу.

Сравнивая кривые изменения концентрации биоэтанола с кривыми концентрации глюкозы, можно видеть, что, несмотря на отсутствие глюкозы в системе после 64 ч процесса, концентрация биоэтанола продолжает расти, что свидетельствует о немедленном потреблении образующейся глюкозы дрожжами [132, 171].

Через 4 суток брожения концентрация биоэтанола составила 2,4 % об., это соответствует выходу биоэтанола 68,3 % или 14,5 дал/т шелухи овса.

Численность дрожжей во время брожения изменилась от 10 млн КОЕ/мл (почкующихся 24 %) до 75 млн КОЕ/мл (почкующихся 24 %) ко вторым суткам брожения, затем снизилась до 49 млн КОЕ/мл (почкующихся 15 %).

#### *Опыт получения биоэтанола при концентрации ПАО 90 г/л (опыт 2)*

Опыт 2 проводился аналогично опыту 1, но через 4 часа от начала гидролиза была внесена порция субстрата 30 г/л и МЭК из расчета на количество субстрата. Таким образом, общая концентрация субстрата составила 90 г/л. Засевные дрожжи вносились через 20 ч от начала гидролиза. Общая продолжительность процесса составила 116 ч. На рисунке 3.17 показано изменение концентраций РВ, глюкозы и биоэтанола в ходе опыта 2.

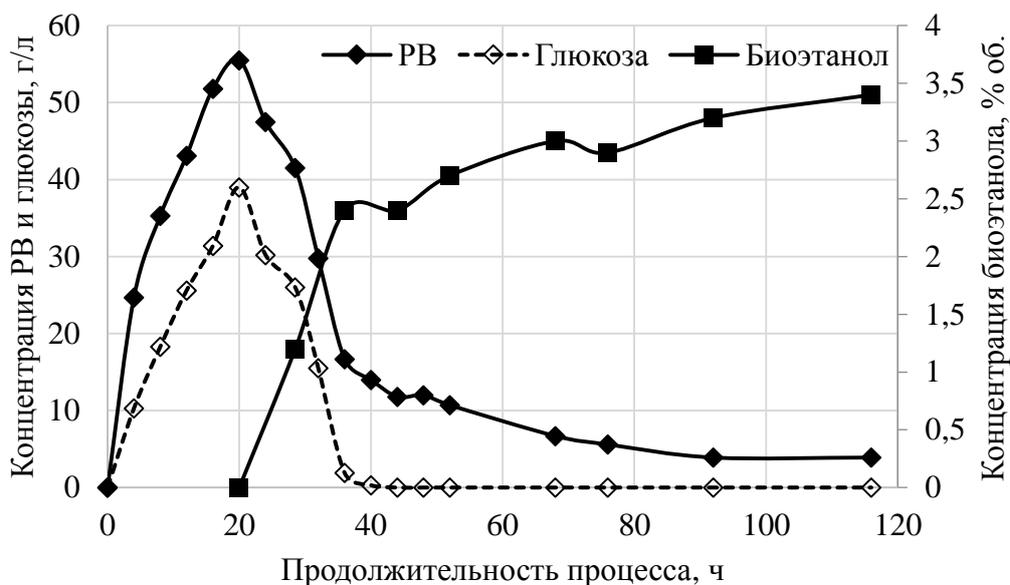


Рисунок 3.17 – Зависимости концентраций РВ и биоэтанола от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения

На момент внесения засевных дрожжей концентрация РВ составила 55,5 г/л, из них концентрация глюкозы – 39,0 г/л. Остаточная концентрация РВ через 4 сут брожения была равна 3,9 г/л, остаточная концентрация глюкозы не определялась количественно. Через 4 суток брожения концентрация биоэтанола составила 3,4 % об., выход биоэтанола 64,5 % или 13,7 дал/т шелухи овса.

Общее количество клеток дрожжей во время брожения изменилось от 9 млн КОЕ/мл (почкующихся 25 %) до 85 млн КОЕ/мл (почкующихся 20 %) ко вторым суткам брожения, затем снизилось до 59 млн КОЕ/мл (почкующихся 12 %).

#### *Опыт получения биоэтанола при концентрации ПАО 120 г/л (опыт 3)*

В опыте 3 проводилась загрузка субстрата в концентрации 60 г/л по сухим веществам и соответствующего количества МЭК в начале процесса, затем через 4 ч и 8 ч от начала гидролиза вносилось еще 2 порции по 30 г/л субстрата и МЭК из расчета на количество субстрата. Общая концентрация субстрата составила 120 г/л. Засевные дрожжи вносились через 24 ч от начала ферментативного гидролиза. Общая продолжительность процесса составила 120 ч. На рисунке 3.18 показано изменение концентраций РВ, глюкозы и биоэтанола в ходе опыта 3.

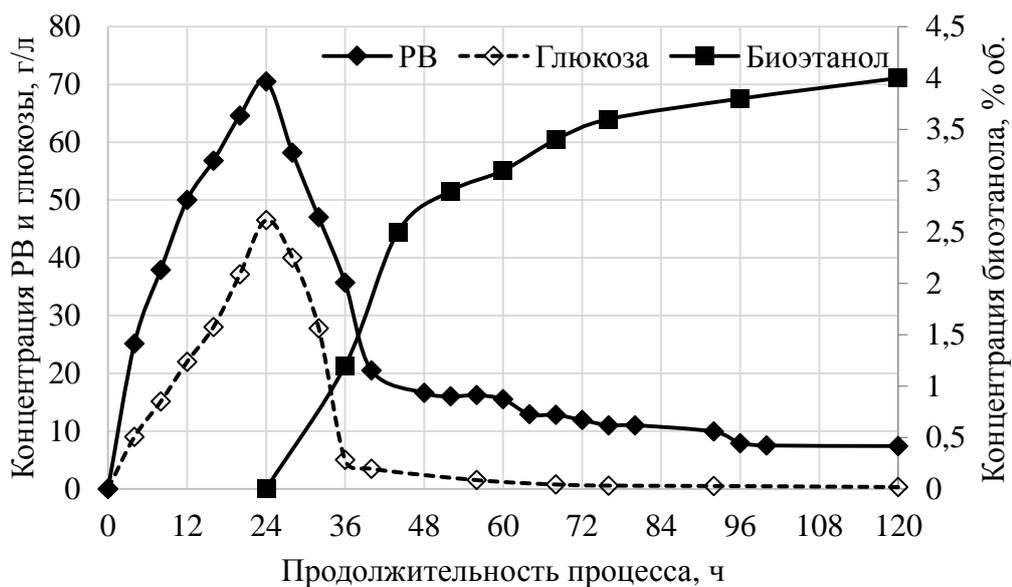


Рисунок 3.18 – Зависимости концентраций РВ и биоэтанола от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения

Накопление РВ и глюкозы при ферментативном гидролизе шло соразмерно внесению порций субстрата и МЭК, при этом резких скачков на графиках не наблюдается. На момент внесения засевных дрожжей концентрация РВ составила 70,5 г/л, из них концентрация глюкозы – 46,5 г/л. Остаточная концентрация РВ через 4 сут брожения была равна 7,4 г/л, остаточная концентрация глюкозы не определялась количественно.

Концентрация биоэтанола на конец брожения составила 4,0 % об., это значение соответствует выходу биоэтанола 56,9 % или 12,1 дал/т шелухи овса.

Численность дрожжей во время брожения изменилась от 11 млн КОЕ/мл (почкующихся 23 %) до 48 млн КОЕ/мл (почкующихся 23 %) к третьим суткам брожения, затем снизилась до 40 млн КОЕ/мл (почкующихся 18 %).

Данный опыт можно сравнить с опытом получения биоэтанола из ПЩД (п.3.5.1) при такой же концентрации субстрата (120 г/л). В данном опыте получен выход биоэтанола от массы целлюлозы в субстрате выше на 27,8 %, от массы субстрата выше на 24,5 %, от сырья выше на 6,0 дал/т шелухи овса. Это указывает не

только на более правильную схему подпитки, но и дополнительно объясняет выбор ПАО в качестве субстрата для дальнейшей работы.

#### *Опыт получения биоэтанола при концентрации ПАО 150 г/л (опыт 4)*

В опыте 4 проводилась загрузка субстрата в концентрации 60 г/л по сухим веществам и соответствующего количества МЭК в начале процесса, затем через 4 ч, 8 ч и 16 ч от начала гидролиза вносилось еще 3 порции по 30 г/л субстрата и МЭК из расчета на количество субстрата. Общая концентрация субстрата составила 150 г/л. Засевные дрожжи вносились через 32 ч от начала ферментативного гидролиза (через 16 ч от последней подпитки). Общая продолжительность процесса составила 128 ч. На рисунке 3.19 показано изменение концентраций РВ, глюкозы и биоэтанола в ходе опыта 4.



Рисунок 3.19 – Зависимости концентраций РВ и биоэтанола от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения

На момент внесения засевных дрожжей концентрация РВ составила 83,0 г/л, из них концентрация глюкозы – 58,9 г/л. Остаточная концентрация РВ через 4 сут брожения была равна 8,3 г/л, остаточная концентрация глюкозы остаточная концентрация глюкозы не определялась количественно.

Конечная концентрация биоэтанола была достигнута уже через 116 ч от начала процесса и составила 5,1 % об., выход биоэтанола 58,0 % или 12,3 дал/т шелухи овса.

Численность дрожжей во время брожения изменилась от 12 млн КОЕ/мл (почкующихся 21 %) до 38 млн КОЕ/мл (почкующихся 20 %) к третьим суткам брожения, затем снизилась до 28 млн КОЕ/мл (почкующихся 15 %).

В таблице 3.5 обобщены результаты описанной серии опытов.

Таблица 3.5 – Результаты опыта без фермент-субстратной подпитки (концентрация субстрата 60 г/л) и трех опытов с подпиткой

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

Из таблицы следует зависимость: с повышением концентрации субстрата повышается концентрация РВ (в том числе глюкозы) и повышается концентрация биоэтанола. Остаточная концентрация РВ также повышается, но выбивается опыт 2, где она немного ниже, чем в опыте 1. 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 %. Повышение концентрации субстрата свыше 150 г/л возможно и приведен к повышению концентрации биоэтанола, но также и увеличит общую продолжительность процесса, что нецелесообразно.

Данные опыты подтверждают, что эффективность биоконверсии целлюлозы и гемицеллюлоз при ферментативном гидролизе уменьшается с увеличением концентрации субстрата. Это объясняется реологическими свойствами реакционной

массы, обуславливающих сложность перемешивания, и, как следствие, ограничения массо- и теплопереноса [172]. В особенности это касается субстратов из шелухи овса. С одной стороны, из-за низкой плотности шелухи овса субстраты получаются рыхлыми и объёмными, с другой стороны, из-за высокой влагоудерживающей способности они образуют высоковязкие пастообразные суспензии в воде. Суспензии оказывают большую нагрузку на перемешивающее устройство, при загрузке субстрата выше 60 г/л суспензию тяжело перемешивать, и эта концентрация является предельной для субстратов, полученных из шелухи овса. Кроме этого, снижение выхода биоэтанола обусловлено субстратным ингибированием [19] и явлением непродуктивной адсорбции ферментов на лигнине [173]. Чтобы преодолеть эти ограничения и повысить эффективность биоконверсии целлюлозы и был применен метод фермент-субстратной подпитки.

Несмотря на работу с вязкой и в тоже время рыхлой реакционной массой, во всех опытах с фермент-субстратной подпиткой достигнуты рабочие режимы перемешивания и подпитка позволила существенно увеличить концентрацию субстрата при использовании исходного оборудования.

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 %.

Далее при апробации технологии получения биоэтанола на опытно-промышленном производстве был найден компромисс между повышением концентрации биоэтанола в бражке и снижением его выхода, и была применена схема подпитки опыта 4.

### 3.6 Апробация оптимизированной технологии получения биоэтанола на опытно-промышленном производстве

Получение биоэтанола из ПАО шелухи овса на опытно-промышленном производстве было проведено с учетом всех оптимизированных в работе параметров.

Процесс проведен с применением метода фермент-субстратной подпитки до достижения общей концентрации субстрата 150 г/л по сухим веществам (п. 3.5.2), оптимизированной МЭК (п. 3.1), оптимизированного питательного раствора (п. 3.3). Момент внесения засевных дрожжей определялся с учетом степени гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз субстрата (п. 3.2 и п. 3.5.2). В качестве продуцента этанола использовался штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-3136 (п. 3.4).

На рисунке 3.20 представлена аппаратурно-технологическая схема проведения этого процесса, начиная со стадии предварительной обработки шелухи овса.

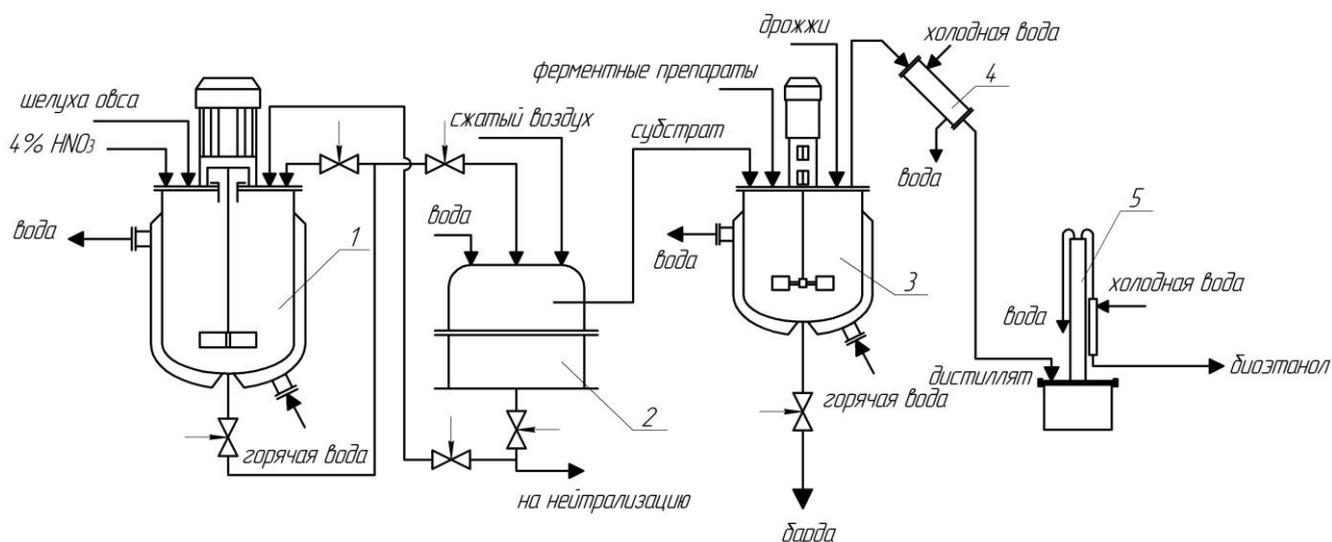


Рисунок 3.20 – Аппаратурно-технологическая схема получения биоэтанола на опытно-промышленном производстве: 1 – аппарат с перемешивающим устройством, 2 – вакуумный фильтр, 3 – реактор с перемешивающим устройством, 4 – холодильник, 5 – бражная колонна

Получение субстрата (ПАО шелухи овса) (п. 2.1.1) проводилось в аппарате 1 объемом 250 л, субстрат промывался на вакуумном фильтре 2.

Для начала отдельной стадии ферментативного гидролиза проводилась загрузка расчетного количества деионизированной воды в реактор 3 объемом 63 л. В рубашку реактора 3 подавалась горячая вода (теплоноситель) для нагрева и поддержания температуры  $(46 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Далее с вакуумного фильтра 2 загружался взвешенный на технических весах влажный субстрат из расчета 60 г/л по сухим веществам через люк реактора 3 при работающем перемешивании. Начальный объем

реакционной массы 35 л. Активная кислотность реакционной массы регулировалась с помощью подачи в реакционную массу через люк реактора 3 расчетного количества реактивов (водные растворы ортофосфорной кислоты (17 %) или аммиака (25 %)). При выходе на уровень активной кислотности равный  $(4,8 \pm 0,2)$  ед. рН через люк ферментера 3 вносилась МЭК из расчета на сухие вещества субстрата («Целлолюкс-А» – 54 мг/г субстрата, «Ультрафло Коре» – 165 мг/г субстрата (п. 3.1)), и начиналась отдельная стадия ферментативного гидролиза. Затем через 4 ч, 8 ч и 16 ч от начала гидролиза вносилось еще 3 порции по 30 г/л субстрата по сухим веществам и МЭК из расчета на количество субстрата. Перемешивание во время отдельной стадии ферментативного гидролиза изменялось от 500 до 150 об/мин по мере разжижения реакционной массы. Отдельная стадия ферментативного гидролиза проводилась в течение 32 ч, далее реакционная масса охлаждалась до 32 °С, в тот же реактор 3 вносились засевные дрожжи, и начиналась совмещенная стадия ферментативного гидролиза и спиртового брожения без перемешивания. Предварительно засевные дрожжи готовились в ферментере объемом 11 л культивированием *Saccharomyces cerevisiae* Y-3136 на смешанной питательной среде: 50 % солодового суслу и 50 % супернатанта ферментативного гидролизата ПАО с концентрацией РВ 30 г/л; продолжительность культивирования 24 ч, температура 32 °С. Объем засевных дрожжей составил 15 % от объема реакционной массы, одновременно с дрожжами в реакционную массу реактора 3 вносился питательный раствор на основе дрожжевого экстракта, сульфата аммония, монофосфата калия, сульфата магния и кальция хлористого (согласно п. 3.3.). Каждые 24 ч в реакционную массу вносился антибиотик (бензилпенициллин) в расчете 3 тыс. ЕД/л реакционной массы. Общая продолжительность процесса (от начала ферментативного гидролиза) составила 116 ч.

Для выделения биоэтанола из бражки содержимое реактора 3 нагревалось при перемешивании, а в холодильник 4 подавалась холодная вода. В холодильнике 4 биоэтанол конденсировался и поступал в бражную колонну 5 с объемом перегонного куба 25 л (GS-2, производство компании «Гоним Спирт», г. Щелково) для

фракционного разделения. Температуры и скорости отбора фракций устанавливались согласно рекомендациям производителя бражной колонны.

В ходе проведения ферментативного гидролиза и спиртового брожения контролировалась активная кислотность, определялись концентрации РВ, глюкозы, СВ, биоэтанола и проводился микробиологический анализ реакционной массы.

На стадии предварительной обработки получен ПАО с выходом 36,0 % и следующим химический составом, массовые доли в % на а.с.в.: целлюлозы по Кюршнеру ( $81,6 \pm 0,1$ ), пентозанов ( $8,1 \pm 0,1$ ), лигнина ( $6,6 \pm 0,1$ ), золы ( $3,7 \pm 0,05$ ).

На рисунке 3.21 показано изменение концентраций РВ, глюкозы и биоэтанола в ходе получения биоэтанола.

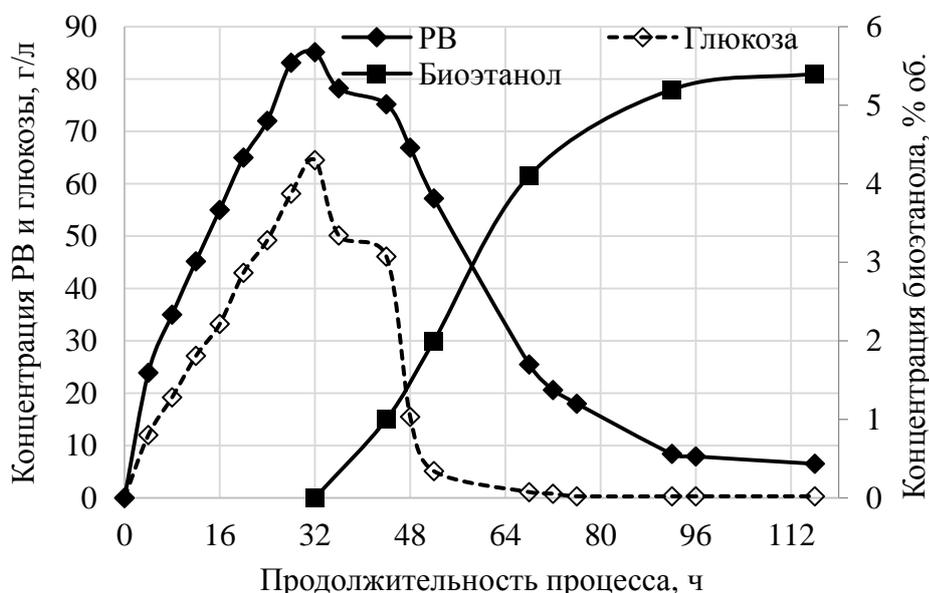


Рисунок 3.21 – Зависимости концентраций РВ и биоэтанола от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения

На момент внесения засевных дрожжей концентрация РВ составила 85,1 г/л, из них концентрация глюкозы – 64,5 г/л. Остаточная концентрация РВ на конец процесса была равна 6,5 г/л, пентоз – 6,5 г/л, остаточная концентрация глюкозы не определялась количественно.

Концентрация биоэтанола на конец процесса составила 5,4 % об., это соответствует выходу биоэтанола 61,4 %, 13,0 дал/т шелухи овса.

Значения концентрации СВ в ходе ферментативного гидролиза и спиртового брожения отражены на рисунке 3.22.

Массовая доля СВ возрастала по мере внесения порций субстрата, после внесения дрожжей концентрация СВ сразу же начала убывать, что свидетельствует о начале процесса брожения с образованием из СВ спирта и углекислоты. Остаточная концентрация СВ в реакционной массе была равна 4,5 %.

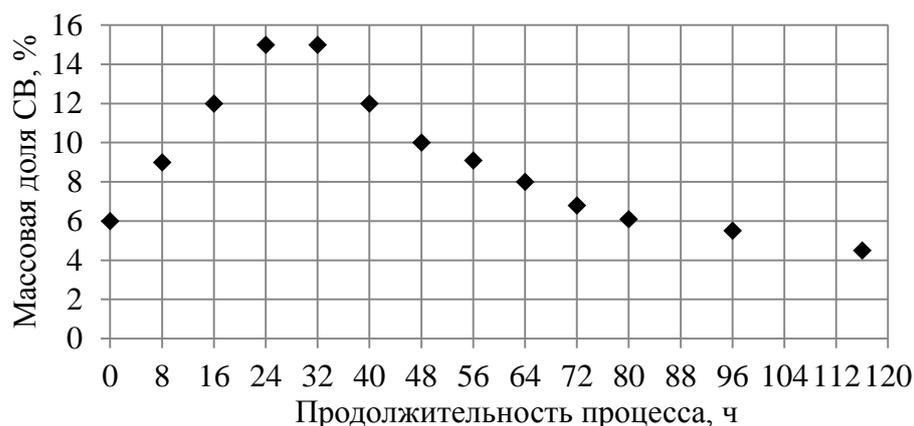


Рисунок 3.22 – Зависимость концентрации СВ от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения

Подсчитанные в камере Горяева значения количества клеток дрожжей в пробах реакционной массы внесены в таблицу 3.6.

Таблица 3.6– Количество клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-3136

Продолжительность процесса, ч	Общая численность дрожжей, млн КОЕ/мл	Доля почкующихся клеток, %
32	13,0	22
44	30,0	26
52	36,5	23
68	38,0	20
76	36,0	20
92	28,5	20
116	26,0	18

Максимальное количество клеток дрожжей наблюдалось на вторые сутки брожения. Начиная с первых суток брожения, доля почкующихся клеток дрожжей медленно убывала.

На рисунке 3.23 показаны микрофотографии реакционной массы, разведенной в 10 раз, в разные моменты времени. Видны клетки дрожжей и ребристые частицы субстрата, которые истончаются с течением времени.

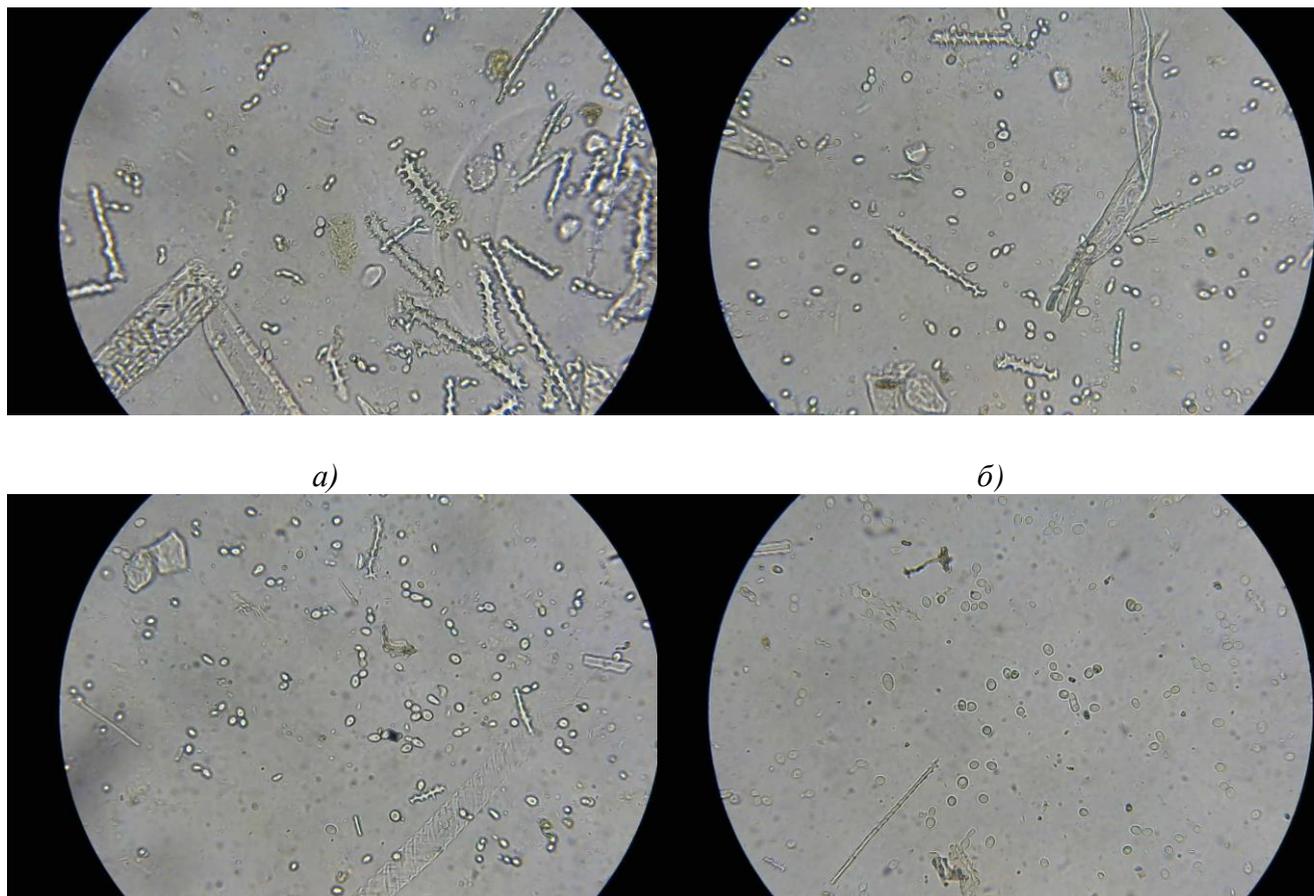


Рисунок 3.23 – Микрофотографии реакционной массы, разведенной в 10 раз,  $\times 400$ ; от начала гидролиза: а) 40 ч, б) 56 ч, в) 80 ч, з) 116 ч

Обычно при масштабировании биотехнологических процессов выход целевого продукта снижается, но при описанном здесь масштабировании технологии биоэтанола показано небольшое увеличение концентрации биоэтанола и соответственно его выхода. Отличие данного опыта от опыта получения биоэтанола из ПАО в ферментере объемом 11 л при той же концентрации субстрата (опыт 4, п.

3.5.2) состояло только в продуценте биоэтанола (здесь *S. cerevisiae* Y-3136, в опыте 4 – штамм *S. cerevisiae* Y-1693) и в конструкции реактора, имеющего более мощное перемешивающее устройство, которое и интенсифицировало процесс на отдельной стадии ферментативного гидролиза [172].

В таблице 3.7 представлены результаты анализа полученного биоэтанола.

Таблица 3.7 – Результаты анализа на примеси в опытных образцах биоэтанола

Показатель	Фракция		
	головная	основная	хвостовая
Массовая концентрация альдегидов, в пересчёте на безводный спирт, мг/л	14000	103	9
Массовая концентрация эфиров, в пересчёте на безводный спирт, мг/л	2640	2	1
Массовая концентрация сивушного масла, в пересчёте на безводный спирт, мг/л	1500	3000	2400
Содержание метанола в пересчёте на безводный спирт, % об.	0,025	0,015	0,022
Объёмная доля этанола, % об.	90,0	92,6	81,0

Головная фракция представлена ацетальдегидом, этиловым эфиром, ацетоном, этилацетатом. Основными промежуточными примесями являются изобутанол, 1-пропанол, изоамилол, а также туда входят: 2-бутанон, 2-пропанол, 2-бутанол, 1-пропанол, изобутанол, кротональдегид, 1-бутанол, 1-пентанол, изоамилол. Такие типичные хвостовые примеси, как уксусная кислота и фурфурол не обнаружены; а этиллактат, бензальдегид, гексанол выявлены в следовых количествах. Метанол – характерная концевая примесь, но в опытных образцах его содержание ничтожно мало.

В сравнительной таблице 3.8 приведены показатели качества, нормируемые для этилового спирта-сырца из пищевого сырья [174] и для этилового спирта технического [175].

Фракционное разделение в используемой бражной колонне GS-2 позволил качественно удалить летучие примеси (альдегиды и эфиры), то есть эта колонна

работает как бражная и эспираторная одновременно. По качеству основной фракции опытного биоэтанола можно сказать, что оно превышает многократно требования к качеству этилового спирта-сырца из любых видов пищевого сырья. В сравнении с требованиями к качеству технического этилового спирта опытный биоэтанол проигрывает из-за высокой концентрации сивушного масла. Но не вызывает сомнения, что применение брагоректификационной установки, включающей спиртовую колонну, позволит удалить сивушные масла и получить высококачественный ректифицированный биоэтанол.

Таблица 3.8 – Содержание примесей в этиловом спирте из пищевого и непищевого сырья в сравнении с опытным биоэтанолом

Показатель	Этиловый спирт-сырец из пищевого сырья		Этиловый спирт технический		Опытный биоэтанол (основная фракция)
	спирт-сырец из всех видов сырья (за исключением мелассы) или их смеси	спирт-сырец из мелассы	марки А ОКП 91 8213 1100	марки Б ОКП 91 8213 1200	
Массовая концентрация альдегидов, в пересчёте на безводный спирт, мг/л	< 300	< 500	< 200	< 350	103
Массовая концентрация эфиров, в пересчёте на безводный спирт, мг/л	< 500	< 700	< 80	< 180	2
Массовая концентрация сивушного масла, в пересчёте на безводный спирт, мг/л	< 5000	< 5000	< 500	< 1000	3000
Содержание метанола в пересчёте на безводный спирт, % об.	< 0,13	–	< 0,1	< 0,1	0,015
Объёмная доля этанола, % об.	88,0	88,0	95,0	94,0	92,6

Образец биоэтанола (основная фракция) с концентрацией 92,6 % об. объемом 1 л был передан в Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН для его применения в процессе каталитической дегидратации в этилен. Выполнялась работа в соответствии с Соглашением о сотрудничестве между ИПХЭТ СО РАН и Институтом катализа им. Г.К. Борескова СО РАН. Этилен получен из биоэтанола путем

каталитической дегидратации при 400°C в лабораторном проточном реакторе с использованием алюмооксидного катализатора [176]. Выход этилена составил 51 г в расчете на 1 кг безводного биоэтанола, что соответствует выходу этилена из образца коммерчески доступного этанола в этих же условиях. В приложении 2 приведен Акт внедрения образца биоэтанола, предоставленного ИПХЭТ СО РАН, в качестве сырья для процесса каталитической дегидратации в этилен.

### 3.7 Сравнительная оценка технологий биоэтанола

Сравнивая результаты данной работы с результатами получения биоэтанола по базовой технологии [122] (п. 1.7, таблица 1,4), можно сделать вывод о повышении эффективности процесса получения биоэтанола из продукта азотнокислой обработки шелухи овса за счет повышения концентрации биоэтанола от 2,3 % об. до 5,4 % об, не смотря на снижение выхода на 5,2 % (выход биоэтанола от теоретического в данной работе составил 61,4 %, в работе [122] – 66,7 %). Но в пересчете на сырье выход биоэтанола остался практически на том же уровне (13,0 дал/т в данной работе и 12,8 дал/т в работе [122]).

Объемная доля биоэтанола 5,4 % об. соответствует массовой концентрации биоэтанола 42,6 г/л. Сравнивая данные результаты с мировыми показателями выхода биоэтанола из шелухи овса и другого целлюлозосодержащего сырья, приведенными в таблице 1.4, можно заключить, что настоящие результаты превышают результаты получения биоэтанола из шелухи овса и близки к мировому уровню в сравнении с другим сырьем.

Заключительным этапом проведенных исследований является оценка экономической эффективности применения оптимизированной технологии. Был произведен примерный расчет себестоимости и цены биоэтанола по базовой и оптимизированной технологии. В таблице 3.9 приведена проектная производственная калькуляция согласно [177] для предприятия ООО «РУДО-НД» (Рязанская область) в связи с обращением директора от 21.04.2020 г. о заинтересованности в технологии ИПХЭТ СО РАН для ее реализации на предприятии (Приложение 3).

Таблица 3.9 – Проектная производственная калькуляция себестоимости биоэтанола на единицу продукции и годовой выпуск по базовой и оптимизированной технологии

Статьи затрат	Базовая технология, валовый выпуск биоэтанола 1 288 640 дал /год		Оптимизированная технология, валовый выпуск биоэтанола 3 028 160 дал /год	
	Затраты на 1 дал биоэтанола, руб.	Стоимость годового выпуска, руб.	Затраты на 1 дал биоэтанола, руб.	Стоимость годового выпуска, руб.
Сырье и материалы на технологические нужды	598,2	770 910 167	668,35	2 023 870 736
Электроэнергия на технологические нужды	17,00	21 914 611	13,20	39 910 088
Водоснабжение и водоотведение на технологические нужды	67,60	87 140 929	61,71	186 882 288
Заработная плата сотрудников	68,70	88 560 000	29,20	88 560 000
Отчисления на социальное страхование ОПР	20,61	26 568 000	8,76	26 568 000
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	123,70	159 408 000	52,60	159 408 000
Цеховые расходы	41,20	53 091 968	17,50	52 992 800
Общезаводские расходы	48,10	61 983 584	20,40	61 774 464
Себестоимость производства	985,11	1 269 577 259	871,72	2 639 707 635
Попутная продукция (углекислый газ) (вычит.)	67,50	86 983 200	67,50	204 400 800
Попутная продукция (удобрение) (вычит.)	392,60	505 920 064	383,40	1 160 996 544
Производственная себестоимость	525,01	676 548 886	420,82	1 274 310 291
Коммерческие расходы	105,00	135 307 200	84,16	254 849 945
Коммерческая себестоимость	630,01	811 856 086	504,98	1 529 160 236
Цена (без НДС и акциза)	<b>756,01</b>	974 227 819	<b>605,98</b>	1 835 004 397

Таким образом, цена биоэтанола составит около 606 руб./дал, 3,03 \$/галлон (на сентябрь 2020 г). Она ниже на 19,8 %, чем в базовой технологии (цена по актуализированному расчету 756 руб./дал, 3,78 \$/галлон (на сентябрь 2020 г)) [122], и

сопоставима с ценой биоэтанола из сельскохозяйственных отходов в некоторых странах (таблица 3.10).

Таблица 3.10 – Цена целлюлозного биоэтанола в некоторых странах

Поз.	Сырьевой источник, компания, страна, год	Цена, \$/галлон биоэтанола
1	Солома и жом сахарного тростника, «Raizen», Бразилия, 2016 [178]	2,17 2,35*
2	Кукурузная солома, «Abengoa», США, 2016 [178]	4,55 4,92*
3	Кукурузная солома, «DuPont», США, 2016 [178]	3,31 3,58*
4	Солома пшеницы, Мексика, 2013 (проект) [179]	3,75 4,14*
5	Солома пшеницы и других зерновых, «Clariant», Румыния, 2018 [180]	2,65 2,74*
Примечание: * – цена на сентябрь 2020 г., расчет проведен с помощью калькулятора инфляции: <a href="https://fxtop.com/">https://fxtop.com/</a>		

Судя по таблице, оптимизированная технология немного уступает лишь технологиям биоэтанола из соломы и жома сахарного тростника (поз. 1) и соломы пшеницы и других зерновых (поз. 5).

За помощь при выполнении диссертационной работы автор выражает искреннюю благодарность к.т.н., доценту Е.А. Скиба; к.х.н., доценту В.В. Будаевой; к.т.н., доценту А.А. Кухленко; коллективу лаборатории биоконверсии ИПХЭТ СО РАН; академику Г.В. Саковичу.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1) На модели ПАО методом симплекс-центроидного планирования выявлено оптимальное соотношение «Целлолюкс-А», «Ультрафло Коре» и «Брюзайм ВGX» в мультиэнзимной композиции (Целлолюкс-А) – 18 мг/г субстрата, «Ультрафло Коре» – 55 мг/г субстрата). Оптимизированный состав МЭК позволяет повысить выход редуцирующих веществ в 1,95 раз. Установлено, что при трехкратном увеличении концентрации МЭК («Целлолюкс-А» – 54 мг/г субстрата, «Ультрафло Коре» – 165 мг/г субстрата) достигается повышение выхода РВ от массы субстрата и выхода глюкозы от массы целлюлозы в субстрате на 13 %.

2) По результатам получения биоэтанола из субстрата из шелухи овса с варьированием времени совмещения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения построена математическая модель. На основе модели решена задача оптимизации продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза перед ее совмещением со спиртовым брожением. Установлено, что минимальная продолжительность совместного проведения двух процессов, при котором достигается требуемый выход биоэтанола составляет 72 ч, а оптимальное время совмещения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения составляет 24 ч от начала ферментативного гидролиза. Определены условия применения данной модели для других субстратов. Стадия ферментативного гидролиза должна проводиться столько времени, чтобы обеспечить гидролиз на 84 % от максимально возможных для данного субстрата в данных условиях РВ.

3) В результате реализации плана полного трехфакторного эксперимента оптимизирован состав питательной среды стимуляторами биосинтеза этанола и установлено, что внесение в ферментативный гидролизат сульфата аммония – 1,82 г/л, монофосфата калия – 0,98 г/л, дрожжевого экстракта – 6,47 г/л, сульфата магния – 1 г/л, кальция хлористого – 0,2 г/л позволяет повысить выход биоэтанола на 8,4 %.

4) Протестированы штаммы из Коллекции микроорганизмов для спиртовой, уксусной, ферментной и дрожжевой промышленности *S. cerevisiae* Y-3137 и *S. cerevisiae* Y-3136 в сравнении со штаммом *S. cerevisiae* Y-1693 (ВКПМ), который

использован в качестве контрольного. Концентрация биоэтанола в опыте с Y-3137 была равна 2,1 % об., в опыте с Y-3136 – 2,4 % об., в контрольном опыте с Y-1693 – 2,2 % об., т.е. штамм *S. cerevisiae* Y-3136 показал наибольшую эффективность.

5) Исследовано получение биоэтанола с применением фермент-субстратной подпитки.

На примере продукта щелочной делигнификации шелухи овса показано, что схема подпитки системы свежими порциями субстрата (по 30 г/л) и ферментными препаратами каждые 12 ч до общей концентрации субстрата 120 г/л является избыточной, выход биоэтанола составил всего 29,1 %.

На примере продукта азотнокислой обработки проведено 3 опыта с применением фермент-субстратной подпитки до концентрации субстрата 90 г/л, 120 г/л и 150 г/л в сравнении с опытом без подпитки при концентрации субстрата 60 г/л. Несмотря на работу с вязкой и в тоже время рыхлой реакционной массой, во всех опытах с фермент-субстратной подпиткой достигнуты рабочие режимы перемешивания и подпитка позволила существенно увеличить концентрацию субстрата при использовании исходного оборудования.

В результате повышения концентрации субстрата в 2,5 раза было достигнуто повышение концентрации биоэтанола в 2,1 раза (от 2,4 % об. до 5,1 % об.), но при этом выход биоэтанола снизился на 10,3 % (от 68,3 % до 58,0 %).

б) Проведена апробация оптимизированной технологии получения биоэтанола на опытно-промышленном производстве. Получение биоэтанола из продукта азотнокислой обработки шелухи овса было проведено с учетом всех оптимизированных в работе параметров (процесс проведен с применением метода фермент-субстратной подпитки до концентрации субстрата 150 г/л, оптимизированной МЭК, оптимизированного питательного раствора; момент внесения засевных дрожжей определялся с учетом степени гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз субстрата; в качестве продуцента этанола использовался штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-3136).

Концентрация биоэтанола на конец процесса составила 5,4 % об., что соответствует выходу биоэтанола 61,4 % или 13,0 дал/т шелухи овса.

В Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН из образца биоэтанола получен этилен, что подтверждено актом внедрения.

В сравнении с базовой технологией повышена эффективность процесса получения биоэтанола из продукта азотнокислой обработки шелухи овса за счет повышения концентрации биоэтанола от 2,3 % об. до 5,4 % об., экономия от внедрения оптимизированной технологии составит 19,8 %.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ПЩД – продукт щелочной делигнификации
- ПАО – продукт азотнокислой обработки
- а.с.в. – абсолютно сухое вещество
- ФП – ферментный препарат
- РВ – редуцирующие вещества
- СВ – сухие вещества
- МЭК – мультиэнзимная композиция
- ГЖХ – газожидкостная хроматография
- $C_P(t)$  – концентрация редуцирующих веществ, г/л
- $C_S(t)$  – концентрация субстрата, г/л
- $C_S(0)$  – начальная концентрация субстрата, г/л
- $C_{ES}(t)$  – концентрация фермент-субстратного комплекса, г/л
- $C_m$  – конечная концентрация редуцирующих веществ после 72-часового проведения ферментативного гидролиза, г/л
- $C_n(t_0)$  – конечная концентрация редуцирующих веществ, не утилизируемых в биоэтанол, г/л
- $C_0(t, t_0)$  – концентрация редуцирующих веществ, не утилизируемых в биоэтанол, г/л
- $C_{ps}(t, t_0)$  – концентрация редуцирующих веществ, утилизируемых в биоэтанол, г/л
- $C_k$  – концентрация утилизируемых в биоэтанол редуцирующих веществ, г/л
- $K$  – концентрация биоэтанола, % об.
- $k_0$  – коэффициент, характеризующий долю не утилизируемых в биоэтанол редуцирующих веществ
- $k_1$  – константа образования фермент-субстратного комплекса, ч<sup>-1</sup>
- $k_2$  – константа распада фермент-субстратного комплекса, г/(л ч)
- $k_3$  – константа образования редуцирующих веществ, г/(л ч)

$k_4$  – коэффициент характеризующий скорость сбраживания утилизируемых в биоэтанол редуцирующих веществ, ч<sup>-1</sup>

$k_5$  – коэффициент (теоретический выход биоэтанола из глюкозы), л/г

$t$  – общая продолжительность процесса, ч

$t_0$  – продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза (время внесения дрожжей), ч

$Y$  – выход биоэтанола, % от массы субстрата

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Agricultural Production (Circular Series WAP 8-20) [Electronic resource]. – URL: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> (date of treatment: 02.04.2020).
2. Zwer, P. Oats: grain-quality characteristics and management of quality requirements // In: Wrigley C. Cereal Grains: Assessing and Managing Quality, second ed. / C. Wrigley, I. Batey, D. Miskelly [et al.]. – Cambridge: Woodhead Publishing, 2017. – P. 235–256. doi: 10.1016/b978-0-08-100719-8.00010-3.
3. Chaud, L.C.S. Evaluation of oat hull hemicellulosic hydrolysate fermentability employing *Pichia stipites* / L.C.S. Chaud, D.D.V.d. Silva, R.T.d. Mattos, M.d.G.d.A. Felipe // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2012. – Vol. 55, № 5. – P. 771–777. doi: 10.1590/S1516-89132012000500017.
4. Lawford, H.G. Comparative ethanol productivities of different *Zymomonas* recombinants fermenting oat hull / H.G. Lawford, J.D. Rousseau, J.S. Tolan // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2001. – Vol. 91. – P. 133–146. doi: 10.1385/ABAB:91-93:1-9:133.
5. Cortivo, P.R.D. Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments / P.R.D. Cortivo, L.R. Hickert, R. Hector, M.A.Z. Ayub // Industrial Crops and Products. – 2018. – Vol. 113. – P. 10–18. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.010.
6. Сакович, Г.В. Опыт масштабирования ферментативного гидролиза технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса / Г.В. Сакович, В.В. Будаева, Е.А. Скиба [и др.] // Ползуновский вестник. – 2012. – № 4. – С. 173–176.
7. Пат. 2581799 Российская Федерация, МПК С12Р7/10. Способ получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья / Скиба Е.А., Байбакова О.В., Будаева В.В., Сакович Г.В.; заявитель и патентообладатель ФГБУН Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН. – № 2015108958/10; заявл. 13.03.2015; опубл. 20.04.2016, Бюл. № 11. – 9 с.

8. Пат. 2593724 Российская Федерация, МПК С12Р7/06, С12Р7/10. Способ получения биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья / Скиба Е.А., Байбакова О.В., Будаева В.В., Сакович Г.В.; заявитель и патентообладатель ФГБУН Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН. – № 2015125195/10; заявл. 25.06.2015; опубл. 10.08.2016, Бюл. № 22. – 8 с.
9. Gao, J. Thermodynamic analysis of ethanol synthesis from hydration of ethylene coupled with a sequential reaction / J. Gao, Z. Li, M. Dong // *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. – 2019. – Vol. 14. – P. 847–856. doi:10.1007/s11705-019-1848-6.
10. Химия биомассы: биотоплива и биопластики / под ред. С.Д. Варфоломеева. – М.: Научный мир, 2017. – 790 с.
11. Sharma, B. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production / B. Sharma, C. Larroche, C.-G. Dussap // *Bioresource Technology*. – 2020. – Vol. 313. – № 123630. doi:10.1016/j.biortech.2020.123630.
12. Гельфанд, Е.Д. Технология биотоплив: учебное пособие / Е.Д. Гельфанд. – Архангельск: Архангельск, 2012. – 57 с.
13. Aro, E. From first generation biofuels to advanced solar biofuels // *Ambio*. – 2016. – Vol. 45. – P. 24–31. doi: 10.1007/s13280-015-0730-0.
14. Demirel, Y. 1.22 Biofuels // In: Dincer, I. (ed.) *Comprehensive Energy Systems*. – Oxford: Elsevier, 2018. – P. 875–908. doi: 10.1016/b978-0-12-809597-3.00125-5.
15. Fish, W.W. Water melon juice: a promising feed stock supplement, diluent, and nitrogen supplement for ethanol biofuel production / W.W. Fish, B.D Bruton, V.M. Russo // *Biotechnology for Biofuels*. – 2009. – Vol. 2. – № 18. doi: 10.1186/1754-6834-2-18.
16. Hossain, A.B.M.S. Comparative Studies of Bio-ethanol Production from Different Fruits Biomasses / A.B.M.S. Hossain, A. Hadeel, K. Mseddi [et al.] // *Global Journal of Life Sciences and Biological Research*. – 2015. – Vol. 1, № 2. – P. 1–6.

17. Туршатов, М.В. Технологические аспекты получения биоэтанола и кормов из крахмального молока и отрубей, образующихся при глубокой переработке зерновых культур / М.В. Туршатов, В.П. Леденев, В.В. Кононенко [и др.] // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. – 2016. – С. 413–419.
18. Abdullah, B. Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies / B. Abdullah, S. A. F. Syed Muhammad, Z. Shokravi // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2019. – Vol. 107. P. 37–50. doi: 10.1016/j.rser.2019.02.018.
19. Hu, F. Pretreatment and lignocellulosic chemistry / F. Hu, A. Ragauskas // Bioenergy Research. – 2012. – № 5. – № P. 1043–1066. doi: 10.1007/s12155-012-9208-0.
20. Bhatia, S.K. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges / S.K. Bhatia, S.S. Jagtap, A.A. Bedekar // Bioresource Technology. – 2020. – Vol. 300. – № 122724. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122724.
21. Харина, М.В. Ресурсы лигноцеллюлозосодержащей биомассы на территории Российской Федерации / М.В. Харина, И.В. Логинова // Вестник Казанского технологического университета. – 2015. – Т. 18, № 19. – С. 265–269.
22. Кировский биохимический завод [Электронный ресурс]. – URL: <https://biohimzavod.kmarket43.ru/> (дата обращения: 02.04.2020).
23. Sankaran, R. Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review / R. Sankaran, R. Andres Parra Cruz, H. Pakalapati [et al.] // Bioresource Technology. – 2020. – Vol. 298. – № 122476. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122476 .
24. Zabed, H. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches / H. Zabed, J.N. Sahu, A.N. Boyce, G. Faruq // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2016. – Vol. 66. – P. 751–774. doi:10.1016/j.rser.2016.08.038.
25. Khan, M.I. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other

products/ M.I. Khan, J.H. Shin, J.D. Kim // *Microbial Cell Factories*. – 2018. – Vol. 17. – № 36. doi: 10.1186/s12934-018-0879-x.

26. Синицын, А.П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов / А.П. Синицын, А.В. Гусаков, В.М. Черноглазов. – М.: Изд-во Московского университета, 1995. – 224 с.

27. Wang, H. From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects / H. Wang, Y. Pu, A. Ragauskas, B. Yang // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 271. – P. 449–461. doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.072.

28. Kohli, K. Bio-Based Chemicals from Renewable Biomass for Integrated Biorefineries / K. Kohli, R. Prajapati, B.K. Sharma // *Energies*. 2019. – Vol. 12(2). – № 233. doi: 10.3390/en12020233.

29. Liu, C.G. Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions / C.G. Liu, Y. Xiao, X.X. Xia // *Biotechnology Advances*. – 2019. – Vol. 37, № 3. – P. 491–504. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.03.002.

30. Bychkov, A. Current achievement in the mechanically activated processing of plant raw materials / A. Bychkov, E. Podgorbunskikh, O. Lomovsky, E. Bychkova // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2019. – Vol. 116, № 5. – P. 1231–1244. doi: 10.1002/bit.26925.

31. Харина, М.В. Ресурсы лигноцеллюлозосодержащей биомассы на территории Российской Федерации / М.В. Харина, И.В. Логинова // *Вестник Казанского технологического университета*. – 2015. – Т. 18, № 19. – С. 265–269.

32. Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Часть II. – СПб.: АНО НПО «Профессионал», 2006. – 1142 с.

33. Saha, B. C. Alkaline Peroxide Pretreatment of Corn Stover for Enzymatic Saccharification and Ethanol Production / B. C. Saha, M. A. Cotta // *Industrial Biotechnology*. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 34–41. doi: 10.1089/ind.2013.0022.

34. Aruwajoye, G. S. Valorisation of cassava peels through simultaneous saccharification and ethanol production: Effect of prehydrolysis time, kinetic assessment and

preliminary scale up / G. S. Aruwajoye, Y. Sewsynker-Sukai, E. B. G. Kana // *Fuel*. – 2020. – Vol. 278. – № 118351. doi: 10.1016/j.fuel.2020.118351.

35. Keshav, P. K. Bioconversion of alkali delignified cotton stalk using two-stage dilute acid hydrolysis and fermentation of detoxified hydrolysate into ethanol / P. K. Keshav, N. Shaik, S. Koti, V. R. Linga // *Industrial Crops and Products*. – 2016. – Vol. 91. – P. 323–331. doi:10.1016/j.indcrop.2016.07.031.

36. Tan, L. Production of bioethanol from unwashed-pretreated rapeseed straw at high solid loading / L. Tan, J. Zhong, Y.-L. Jin [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2020. – Vol. 303. – № 122949. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122949.

37. Бюллетени о состоянии сельского хозяйства (электронные версии) [Электронный ресурс]. URL: <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13277> (дата обращения: 02.04.2020).

38. Яровенко, В.Л. Технология спирта / В.Л. Яровенко, В.А. Маринченко, В.А. Смирнов [и др.]; под ред. В.Л. Яровенко. – М.: Колос, 2002. – 464 с.

39. Santos, J. Thermochemical conversion of agricultural wastes applying different reforming temperatures / J. Santos, M. Ouadi, H. Jahangiri, A. Hornung // *Fuel Processing Technology*. 2020. – Vol. 203. – № 106402. doi: 10.1016/j.fuproc.2020.106402.

40. Chopda, R. Biorefining Oat Husks into High-Quality Lignin and Enzymatically Digestible Cellulose with Acid-Catalyzed Ethanol Organosolv Pretreatment / Chopda, R., Ferreira, J. A., & Taherzadeh, M. J. // *Processes*. – 2020. – Vol. 8(4). – № 435. doi: 10.3390/pr8040435.

41. Tamanini, C. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xylitol / C. Tamanini, A.S.d. Oliveira, M.d.G.d.A. Felipe [et al.] // *Acta Scientiarum Technology*. – 2004. – Vol. 26, № 2. – P. 117–125.

42. Debiagi, F. Pretreatment Efficiency Using Autoclave High-Pressure Steam and Ultrasonication in Sugar Production from Liquid Hydrolysates and Access to the Residual Solid Fractions of Wheat Bran and Oat Hulls / F. Debiagi, T.B. Madeira, S.L. Nixdorf, S. Mali // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 190. P. 166–181. doi: 10.1007/s12010-019-03092-0.

43. Вураско, А.В. Получение целлюлозы щелочно-окислительно-органо-сольвентным способом / А.В. Вураско, Б.Н. Дрикер, Э.В. Мертин, Г.В. Астратова // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 11 (часть 3) – С. 586–592.
44. Abedi, A. Study on the quality of oat hull fuel pellets using bio-additives / A. Abedi, A.K. Dalai // *Biomass and Bioenergy*. – 2017. – Vol. 106. – P. 166–75. doi: 10.1016/j.biombioe.2017.08.024.
45. Abedi, A. Steam gasification of oat hull pellets over Ni-based catalysts: Syngas yield and tar reduction / A. Abedi, A.K. Dalai // *Fuel*. – 2019. – Vol. 254. – № 115585. doi: 10.1016/j.fuel.2019.05.168.
46. Paschoala, G.B. Isolation and characterization of nanofibrillated cellulose from oat hulls / G.B. Paschoala, C.M.O. Muller, G.M. Carvalho [et al.] // *Quimica Nova*. – 2015. – Vol. 38, № 4. – P. 478–482. doi: 10.5935/0100-4042.20150029.
47. Valdebenito F. On the nanofibrillation of corn husks and oat hulls fibres / F. Valdebenito, M. Pereira, G. Ciudad [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2017. – Vol. 95. – P. 528–534. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.11.006.
48. Oliveira, J.P. Cellulose nanocrystals from rice and oat husks and their application in aerogels for food packaging / J.P. de Oliveira, G.P. Bruni, S.L.M. el Halal [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – Vol. 124. – P. 175–184. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.205.
49. Sakovich, G.V. Oat-hull cellulose nitrates for explosive compositions / G.V. Sakovich, V.V. Budaeva, A.A. Korchagina [et al.] // *Doklady Chemistry*. – 2019. Vol. 487, № 2. – P. 221–225. doi: 10.1134/S0012500819080020.
50. Banerjee, S. Removal of malachite green, a hazardous dye from aqueous solutions using *Avena sativa* (oat) hull as a potential adsorbent / S. Banerjee, G.C. Sharma, R. Gautam [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2016. – Vol. 213. P. 162–172. doi: 10.1016/j.molliq.2015.11.011.
51. Huang, Q. Production of anhydrous biobutanol using a biosorbent developed from oat hulls / Q. Huang, C.H. Niu, A. K. Dalai // *Chemical Engineering Journal*. – 2019. – Vol. 356. – P. 830–838. doi: 10.1016/j.cej.2018.09.067.

52. Chuang, C.L. Adsorption of arsenic (V) by activated carbon prepared from oat hulls / C.L. Chuang, M. Fan, M. Xu [et al.] // *Chemosphere*. – 2005. – Vol. 61. – P. 478–483. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.03.012.
53. Ferraz, F.M. Performance of oat hulls activated carbon for COD and color removal from landfill leachate / F.M. Ferraz, Q. Yuan // *Journal of Water Process Engineering*. – 2020. – Vol. 33. – № 101040. doi: 10.1016/j.jwpe.2019.101040.
54. Germec, M. Microwave-assisted dilute acid pretreatment of different agricultural bioresources for fermentable sugar production / M. Germec, F. Demirel, N. Tas [et al.] // *Cellulose*. – 2017. – Vol. 24. – P. 4337–4353. doi: 10.1007/s10570-017-1408-5.
55. Demirel, F. Optimization of dilute acid pretreatment of barley husk and oat husk and determination of their chemical composition / F. Demirel, M. Germec, H.B. Coban, I. Turhan // *Cellulose*. – 2018. – Vol. 25. – P. 6377–6393. doi: 10.1007/s10570-018-2022-x.
56. Kashcheyeva, E.I. Recycling of nitric acid solution in chemical pretreatment of oat hulls for biorefining / E.I. Kashcheyeva, E.A. Skiba, V.N. Zolotukhin, V.V. Budaeva // *BioResources*. – 2020. – Vol. 15, № 1. – P. 1575–1586.
57. Sakovich, G.V. Technological fundamentals of bacterial nanocellulose production from zero prime-cost feedstock / G.V. Sakovich, E.A. Skiba, V.V. Budaeva // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – Vol. 477. – P. 357–359. doi: 10.1134/S1607672917060047.
58. Santos, V. T. de O. Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids / V. T. de O. Santos, G. Siqueira, A. M. F. Milagres, A. Ferraz // *Industrial Crops and Products*. – 2018. – Vol. 111. – P. 722–730. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.11.053
59. Григорьева, О.Н. Кислотный гидролиз лигноцеллюлозосодержащего сырья в технологии получения биоэтанола / О.Н. Григорьева, М.В. Харина // *Вестник технологического университета*. – 2016. – Т. 19, № 10. – С. 128–132.

60. Пат. 18882 Евразийский Союз, МПК C07H3/02, C07H1/08, C07P1/00, C07P3/00. Способ непрерывного кислотного гидролиза целлюлозосодержащих материалов / Чернявская Н.А.; заявитель и патентообладатель БИО ТЕХ ЛТД. – № 201001438; заявл. 17.03.2008; опубл. 29.11.2013, Бюл. № 11. – 6 с.
61. Jordan, D.B. Plant cell walls to ethanol / D.B. Jordan, M.J. Bowman, J.D. Braker [et al.] // *Biochemical Journal*. –2012. – № 442. – P. 247–252.
62. Silveira, M. H. L. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries / M. H. L. Silveira, A. R. C. Morais, A.M. da Costa Lopes [et al.] // *ChemSusChem*. – 2015. – Vol. 8. – P. 3366–3390. doi: 10.1002/cssc.201500282
63. Zhang, H. The multi-feedstock biorefinery – Assessing the compatibility of alternative feedstocks in a 2G wheat straw biorefinery process / H. Zhang, P.C. Lopez, C. Holland [et al.] // *GCB Bioenergy*. – 2018. – Vol. 10, № 12. – P. 946–959. doi: 10.1111/gcbb.12557.
64. Zhao, Y. Bioethanol from corn stover – Integrated environmental impacts of alternative biotechnologies / Y. Zhao, A. Damgaard, S. Liu [et al.] // *Resources, Conservation and Recycling*. – 2020. – Vol. 155, № 104652. – P. 1–12. doi: 10.1016/j.resconrec.2019.104652.
65. Smichi, N. Steam explosion (SE) and instant controlled pressure drop (DIC) as thermo-hydro-mechanical pretreatment methods for bioethanol production / N. Smichi, Y. Messaoudi, K. Allaf, M. Gargouri // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2020. – Vol. 43. – P. 945–957. doi: 10.1007/s00449-020-02297-6.
66. Сушкова, В.И. Методы подготовки растительного сырья к биоконверсии в кормовые продукты и биоэтанол / В.И. Сушкова, Л.В. Устюжанинова, О.В. Березина, С.В. Яроцкий // *Химия растительного сырья*. – 2016. – № 1. – С. 93–119.
67. Brodeur, G. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review / G. Brodeur, E. Yau, K. Badal [et al.] // *Enzyme Research*. – 2011. – Vol. 2011. – №. 787532. doi:10.4061/2011/787532.
68. Murnen, H.K. Optimization of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus x giganteus* to fermentable sugars / H.K.

Murnen, V. Balan, Sh.P.S. Chundawat // *Biotechnology Progress*. – 2007. – № 23. – P. 846–850.

69. Chiranjeevi, T. Assisted Single-Step Acid Pretreatment (ASAP) process for enhanced delignification of rice straw for bioethanol production / T. Chiranjeevi, A.J. Mattam, K.K. Vishwakarma [et al.] // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2018. – Vol. 6, № 7. – P. 8762–8774. doi: 10.1021/acssuschemeng.8b01113.

70. Kusmiyati, K. Effect of dilute acid and alkaline pretreatments on enzymatic saccharification of palm tree trunk waste for bioethanol production / K. Kusmiyati, S. Anarki, S. Nugroho [et al.] // *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*. – 2019. – Vol. 14, № 3. – P. 705–714. doi: 10.9767/bcrec.14.3.4256.705-714.

71. Stoumpou, V. Assessing straw digestate as feedstock for bioethanol production / V. Stoumpou, J. Novakovic, N. Kontogianni [et al.] // *Renewable Energy*. – 2020. – Vol. 153. – P. 261–269. doi: 10.1016/j.renene.2020.02.021.

72. Zoubiri, F.Z. Golden section algorithm to optimise the chemical pretreatment of agro-industrial waste for sugars extraction / F.Z. Zoubiri, R. Rihani, F. Bentahar // *Fuel*. – 2020. – Vol. 266. – № 117028. doi: 10.1016/j.fuel.2020.117028.

73. Yan, X. Enhanced lignin removal and enzymolysis efficiency of grass waste by hydrogen peroxide synergized dilute alkali pretreatment / X. Yan, J.-R. Cheng, Y.-T. Wang, M.-J. Zhu // *Bioresource Technology*. – 2020. – Vol. 301. – №. 122756. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122756.

74. Chen, X. Mixing alkali pretreated and acid pretreated biomass for cellulosic ethanol production featuring reduced chemical use and decreased inhibitory effect / X. Chen, R. Zhai, K. Shi [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2018. – Vol. 124. – P. 719–725. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.08.056.

75. Tekin, K. Ethanol: A Promising Green Solvent for the Deconstruction of Lignocellulose / K. Tekin, N. Hao, S. Karagoz, A.J. Ragauskas // *ChemSusChem*. – 2018. – Vol. 11. – P. 3559–3575. doi: 10.1002/cssc.201801291.

76. Tang, C. Organic amine catalytic organosolv pretreatment of corn stover for enzymatic saccharification and high-quality lignin / C. Tang, J. Shan, Y. Chen [et al.] //

Bioresource Technology. – 2017. – Vol. 232. – P. 222–228. doi: 10.1016/j.biortech.2017.02.041.

77. Zabed, H.M. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production / H.M. Zabed, S. Akter, J. Yun [et al.] // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2019. – Vol. 105. – P. 105–128. doi: 10.1016/j.rser.2019.01.048.

78. Rajak, R.C. An innovative approach of mixed enzymatic venture for 2G ethanol production from lignocellulosic feedstock / R.C. Rajak, R. Banerjee // Energy Conversion and Management. – 2020. – Vol. 207. – № 112504. doi: 10.1016/j.enconman.2020.112504.

79. Байбакова, О.В. Щелочная делигнификация недревесного целлюлозосодержащего сырья в условиях опытного производства / О.В. Байбакова, Е.А. Скиба, В.В. Будаева, В.Н. Золотухин // Ползуновский вестник. – 2016. – № 4(1). – С. 147–151.

80. Гисматулина, Ю. А. Азотнокислый способ получения целлюлозы (обзор) / Ю.А. Гисматулина, В.В. Будаева // Ползуновский вестник. – 2016. – № 4(1). – С. 174–178.

81. Павлов, И.Н. Эффект автогидролитической предварительной обработки мискантуса на реакционную способность к ферментативному гидролизу / И.Н. Павлов // Ползуновский вестник. – 2018. – № 1. – С. 148–152.

82. Пат. 2456394 Российская Федерация, МПК D21C1/02. Способ переработки целлюлозосодержащего сырья / Будаева В.В., Денисова М.Н., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н., Сакович Г.В.; заявитель и патентообладатель ФГБУН Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН. – № 2010150360/05; заявл. 08.12.2010; опубл. 20.07.2012, Бюл. № 20. – 12 с.

83. Sun, S. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials / S. Sun, S. Sun, X. Cao, R. Su // Bioresource Technology. – 2016. – Vol. 199. – P. 49–58. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.061.

84. Karimi, K. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity / K. Karimi, M.J. Taherzadeh // *Bioresource Technology*. – 2016. – Vol. 200. – P. 1008–1018. doi: 10.1016/j.biortech.2015.11.022.
85. Skiba, E.A. Dilute nitric-acid pretreatment of oat hulls for ethanol production / E.A. Skiba, V.V. Budaeva, O.V. Baibakova [et al.] // *Biochemical Engineering Journal*. – 2017. – Vol. 126. – P. 118–125. doi: 10.1016/j.bej.2016.09.003.
86. Paramjeet, S. Biofuels: Production of fungal-mediated ligninolytic enzymes and the modes of bioprocesses utilizing agro-based residues / S. Paramjeet, P. Manasa, N. Korrapati // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2018. – Vol. 14. – P. 57–71. doi:10.1016/j.bcab.2018.02.007.
87. Rani, V. Beta-glucosidase: key enzyme in determining efficiency of cellulase and biomass hydrolysis / V. Rani, S. Mohanram, R. Tiwari [et al.] // *Bioprocessing and Biotechniques*. – 2014. – Vol. 5. – № 197. doi: 10.4172/2155-9821.1000197.
88. Денисенко, Ю.А. Сравнительная характеристика ксиланаз XylA и XylE из гриба *Penicillium canescens* / Ю.А. Денисенко, Д.А. Мерзлов, А.В. Гусаков [и др.] // *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. – 2015. – № 6. – P. 348–353.
89. Almeida, J.R. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae* / J.R. Almeida, T. Modig, A. Petersson [et al.] // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2007. – Vol. 82, № 4. – P. 340–349. doi: 10.1002/jctb.1676.
90. Choi, K. R. Metabolic engineering strategies toward production of biofuels / K. R. Choi, S. Jiao, S. Y. Lee // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2020. – Vol. 59. – P. 1–14. doi:10.1016/j.cbpa.2020.02.009.
91. Steensels, J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity / J. Steensels, T. Snoek, E. Meersman [et al.] *FEMS Microbiology Reviews*. – 2014. – Vol. 38, № 5. – P. 947–995. doi: 10.1111/1574-6976.12073.
92. Пермякова, Л.В. Классификация стимуляторов жизненной активности дрожжей / Л.В. Пермякова // *Техника и технология пищевых производств*. – 2016. – Т. 42. – № 3. – С. 46–55.

93. Пат. 2534880 Российская Федерация, МПК C12N1/20, C12P7/06, C12R1/01. Штамм бактерии *Geobacillus stearothermophilus* – продуцент биоэтанола / Розанов А.С., Малуп Т.К., Брянская А.В., Пельтек С.Е.; заявитель и патентообладатель ФГБУН Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. – № 2013142985/10; заявл. 23.09.13; опубл. 10.12.14, Бюл. № 34. – 6 с.
94. Kvist, T. Thermophilic *Thermoanaerobacter italicus* subsp. *marato* having high alcohol productivity / T. Kvist, M.J. Mikkelsen, R.L. Andersen. Patent of EP № EP2516621 A1, 2012.
95. Guss, A. *Clostridium thermocellum* strains for enhanced ethanol production and method of their use / A. Guss, L.R. Lynd. Patent of WO № WO2012109578 A3, 2012.
96. Ballesteros, I. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production / I. Ballesteros, M. Ballesteros, P. Manzanares [et al.] // Biochemical Engineering Journal. – 2008. – Vol. 42. – № 1. – P. 84–91.
97. Du, C. The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345 / C. Du, Y. Li, X. Zhao [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2019. – Vol. 103. – P. 2845–2855. doi: 10.1007/s00253-019-09625-1
98. Liu, Z.L. *Clavispora* spp. strain / Z.L. Liu, S.A. Weber. Patent of USA № US8673604 B1, 2014.
99. Пат. 2393213 Российская Федерация, МПК C12N1/20, C12P7/00, C12R1/145. Штамм бактерий *Clostridium acetobutylicum* – продуцент н-бутилового спирта, ацетона и этанола / Поляков В.А., Римарева Л.В., Галкина Г.В., Илларионова В.И., Куксова Е.В., Горбатова Е.В., Волкова Г.С.; заявитель и патентообладатель ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии Российской академии сельскохозяйственных наук. – № 2008149763/13; заявл. 17.12.08; опубл. 27.06.10, Бюл. № 18. – 5 с.
100. Розанов, А.С. Рекомбинантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* для получения этанола из растительной биомассы / А.С. Розанов, А.В. Котенко, И.Р.

Акбердин [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. – № 4/2. – С. 989–998.

101. Oh, E. J. Overexpression of RCK1 improves acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* / E. J. Oh, N. Wei, S. Kwak [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2019. – Vol. 292. – P. 1–4. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.12.013.

102. Song, X. Metabolic engineering strategies for improvement of ethanol production in cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae* / Song, X., Li, Y., Wu, Y [et al] // FEMS Yeast Research. – 2018. – Vol 18, № foy090. – P. 1–10. doi: 10.1093/femsyr/foy090.

103. Jetti, K. D. Improved ethanol productivity and ethanol tolerance through genome shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipites* / K. D. Jetti, R.R. Gns, D. Garlapati, S. K. Nammi // International Microbiology. – 2018. – Vol. 22, № 2. – P. 247–254. doi: 10.1007/s10123-018-00044-2

104. Sant'Anna, L.M.M. Process for producing ethanol from a hydrolysate of the hemicellulose fraction of sugarcane bagasse in a press reactor / L.M.M. Sant'Anna, N. Pereira, G.J.V. Bitancur [et al]. Patent of USA № US20100273228 A1, 2010.

105. Hafiz O. Abubaker. Utilization of *Schizosaccharomyces pombe* for Production of Ethanol from Cane Molasses / Hafiz O. Abubaker, Abdel Moneim E. Sulieman, Hassan B. Elamin // Journal of Microbiology Research. – 2012. – № 2 (2). – P. 36–40.

106. Kim, J. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* improves co-conversion of lignocellulose-derived sugars / J. Kim, M. Tremaine, J. A. Grass [et al.] // Biotechnology Journal. – 2019. – Vol 14. – № 1800441. doi: 10.1002/biot.201800441

107. Mohagheghi, A. Improving a recombinant *Zymomonas mobilis* strain 8b through continuous adaptation on dilute acid pretreated corn stover hydrolysate / A. Mohagheghi, J.G. Linger, S. Yang [et al.] // Biotechnol Biofuels. – 2015. – Vol. 8. – № 55. doi: 10.1186/s13068-015-0233-z.

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

109. Пат. № 2288262 Российская Федерация, МПК C12N1/16, C12N13/00. Способ активации спиртовых дрожжей / Бодрова О.Ю., Кречетникова А.Н., Ильяшенко Н.Г., Шабурова Л.Н., Гернет М.В.; заявитель и патентообладатель ГОУВПО Московский государственный университет пищевых производств Министерства образования Российской Федерации. – № 2005123867/13; заявл. 28.07.2005; опубл. 27.11.2006, Бюл. № 33. – 5 с.

110. Скиба, Е.А. Получение, отбор и идентификация биохимических мутантов дрожжей-сахаромицетов: лабораторный практикум для студентов / сост. Е.А. Скиба; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2016. – 58 с.

111. Римарева, Л. В. Влияние ионного состава воды на качество концентрированного пшеничного сусла и жизнедеятельность осмофильных рас спиртовых дрожжей / Л. В. Римарева, М. Б. Оверченко, Е. М. Сербя [и др.] // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2017. – № 9. – С.32–37.

112. Русфермент [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.rusferment.com>. – (дата обращения: 03.03.2020).

113. Mishra, A. Bioethanol production from various lignocellulosic feedstocks by a novel “fractional hydrolysis” technique with different inorganic acids and co-culture fermentation // A. Mishra, S. Ghosh // Fuel. – 2019. – Vol. 236. P. 544–553. doi:10.1016/j.fuel.2018.09.024.

114. Bala, A. Development of an environmental-benign process for efficient pre-treatment and saccharification of *Saccharum* biomasses for bioethanol production / A. Bala, B. Singh // Renewable Energy. – 2019. – Vol. 130. – P. 12–24. doi:10.1016/j.renene.2018.06.033.

115. Kamzon, M. A. Promising bioethanol processes for developing a biorefinery in the Moroccan sugar industry / M.A. Kamzon, S. Abderafi, T. Bounahmidi // International Journal of Hydrogen Energy. – 2016. – Vol. 41(45). – P. 20880–20896. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.07.035.

116. Stepanov, N. Immobilised cells of *Pachysolen tannophilus* yeast for ethanol production from crude glycerol / N. Stepanov, E. Efremenko // New Biotechnology. – 2017. – Vol. 34. P. 54–58. doi:10.1016/j.nbt.2016.05.002.

117. He, B. Sequential co-immobilization of  $\beta$ -glucosidase and yeast cells on single polymer support for bioethanol production / B. He, X. Zhu, C. Zhao [et al.] // *Science China Chemistry*. – 2018. – Vol. 61. – P. 1600–1608. doi: 10.1007/s11426-018-9319-1.

118. Nguyen, D.T.T. Co-culture of *Zymomonas mobilis* and *Scheffersomyces stipitis* immobilized in polymeric membranes for fermentation of glucose and xylose to ethanol // D.T.T. Nguyen, P. Praveen, K-C. Loh. // *Biochemical Engineering Journal*. – 2019. – Vol. 145. – P. 145–152. doi: 10.1016/j.bej.2019.02.019.

119. Ramachandran, K.B. Simulation studies on simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol / K.B. Ramachandran, M.A. Hashim // *The Chemical Engineering Journal*. – 1990. – Vol. 45(2). – P. B27–B34. doi: 10.1016/0300-9467(90)80038-e.

120. Olofsson, K. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks / K. Olofsson, M. Bertilsson, G. Lidén // *Biotechnology for Biofuels*. – 2008. – Vol. 1, № 7. – P. 1–14. doi: 10.1186/1754-6834-1-7.

121. Kadhum, H.J. A comparative account of glucose yields and bioethanol production from separate and simultaneous saccharification and fermentation processes at high solids loading with variable PEG concentration / H.J. Kadhum, D.M. Mahapatra, G.S. Murthy // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 283. – P. 67–75. doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.060.

122. Байбакова, О.В. Разработка технологии получения биоэтанола из нетрадиционного целлюлозосодержащего сырья: дис. ... канд. техн. наук. Щелково, 2017. 150 с.

123. Huang, C. Co-production of bio-ethanol, xylonic acid and slow-release nitrogen fertilizer from low-cost straw pulping solid residue / C. Huang, A.J. Ragauskas, X. Wu [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2018. – Vol. 250. – P. 365–373. doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.060.

124. Paulová, L. High solid fed-batch SSF with delayed inoculation for improved production of bioethanol from wheat straw / L. Paulová, P. Patáková, M. Rychtera, K. Melzoch // *Fuel*. – 2014. – Vol. 122. – P. 294–300. doi: 10.1016/j.fuel.2014.01.020.

125. Liu, Y. Sequential bioethanol and biogas production from sugarcane bagasse based on high solids fed-batch SSF / Y. Liu, J. Xu, Y. Zhang [et al.] // *Energy*. – 2015. – Vol. 90. – P. 1199–1205. doi: 10.1016/j.energy.2015.06.066.
126. Sewsynker-Sukai, Y. Simultaneous saccharification and bioethanol production from corn cobs: process optimization and kinetic studies / Y. Sewsynker-Sukai, E.B. Gueguim Kana // *Bioresource Technology*. – 2018. – Vol. 262. – P. 32–41. doi: 10.1016/j.biortech.2018.04.056.
127. Dimos, K. Effect of Various Pretreatment Methods on Bioethanol Production from Cotton Stalks / K. Dimos, T. Paschos, A. Louloudi [et al.] // *Fermentation*. – 2019. – Vol. 5. – № 5. doi: 10.3390/fermentation5010005.
128. Aruwajoye, G. S. Valorisation of cassava peels through simultaneous saccharification and ethanol production: Effect of prehydrolysis time, kinetic assessment and preliminary scale up / G. S. Aruwajoye, Y. Sewsynker-Sukai, E. B. G. Kana // *Fuel*. – 2020. – Vol. 278. – №. 118351. doi: 10.1016/j.fuel.2020.118351
129. Пат. 2486235 Российская Федерация, МПК С12N1/22, С12P19/14, С12P19/16, С12P7/10, С13К1/02. Способ получения продуктов ферментации / Смит М.Т., Кауард-Келли Д., Нилльсон Д., Канг Ч., Айер П., Дейнхаммер Р.; заявитель и патентообладатель Новозимс А/С (DK). – № 2010102522/10; заявл. 27.06.2008, опубл. 27.06.2013, Бюл. № 18. – 45 с.
130. Ballesteros, I. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol / I. Ballesteros, M. Ballesteros, A. Cabañas [et al.] // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 1991. – Vol. 28. – P. 307–315. doi: 10.1007/bf02922610.
131. Guss A. *Clostridium thermocellum* strains for enhanced ethanol production and method of their use / A. Guss, L.R. Lynd // Patent of WO no. WO2012109578 A3, 2012.
132. Joshi, B. Currently Used Microbes and Advantages of Using Genetically Modified Microbes for Ethanol Production / B. Joshi, J. Joshi, T. Bhattarai, L. Sreerama // In: *Bioethanol Production from Food Crops*. – Elsevier Inc., 2019. – P. 293–316. doi: 10.1016/b978-0-12-813766-6.00015-1.

133. Unrean, P. Systematic optimization of fed-batch simultaneous saccharification and fermentation at high-solid loading based on enzymatic hydrolysis and dynamic metabolic modeling of *Saccharomyces cerevisiae* / P. Unrean, S. Khajeeram, K. Laoteng // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – № 100. – C. 2459–2470. doi: 10.1007/s00253-015-7173-1.
134. Moreno A.D. Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase / A.D. Moreno, D. Ibarra, I. Ballesteros [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2013. – Vol. 135. – P. 239–245. doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.095.
135. López-Linares, J.C. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations / J.C. López-Linares, I. Romero, C. Cara [et al.] // *Fuel*. – 2014. – Vol. 122. – P. 112–118. doi: 10.1016/j.fuel.2014.01.024.
136. Liu, Y. Sequential bioethanol and biogas production from sugarcane bagasse based on high solids fed-batch SSF / Y. Liu, J. Xu, Y. Zhang [et al.] // *Energy*. – 2015. – Vol. 90. – P. 1199–1205. doi: 10.1016/j.energy.2015.06.066.
137. Öhgren, K. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production / K. Öhgren, J. Vehmaanperä, M. Siika-Aho [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2007. – Vol. 40, № 4. – P. 607–613. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.05.014.
138. De Souza, C.J.A. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse / C.J.A. de Souza, D.A. Costa, M.Q.R.B. Rodrigues [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2012. – Vol. 109. – C. 63–69. doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.024.
139. Mesa, L. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse / L. Mesa, E. González, I. Romero [et al.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2011. – Vol. 175. – P. 185–191. doi: 10.1016/j.cej.2011.09.092.

140. Modenbach, A.A. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – a review / A.A. Modenbach, S.E. Nokes // *Biomass Bioenergy*. – 2013. – Vol. 56. – P. 526–544. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.05.031.
141. Seifollahi, M. Enzymatic post-hydrolysis of water-soluble cellulose oligomers released by chemical hydrolysis for cellulosic butanol production / M. Seifollahi, H. Amiri // *Cellulose*. – 2019. – Vol. 26. – P. 4479–4494. doi: 10.1007/s10570-019-02397-x.
142. Fan, Z. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor / Z. Fan, C. South, K. Lyford [et al.] // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2003 – № 26. – P. 93–101.
143. Romani, A. Combined alkali and hydrothermal pretreatments for oat straw valorization within a biorefinery concept / A. Romani, P.D. Tomaz, G. Garrote [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2016. – Vol. 220. – P. 323–332. doi:10.1016/j.biortech.2016.08.077.
144. Оболенская, А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы / А.В. Оболенская, З.П. Ельницкая, А.А. Леонович. – М.: Экология, 1991. – 320 с.
145. Kurschner, K. Cellulose and cellulose derivative / K. Kurschner, A. Hoffer // *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. – 1993. – Vol. 92, № 3. – P. 145–154.
146. ГОСТ 10820-75. Целлюлоза. Метод определения массовой доли пентозанов. – Введ. 1991-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1991. – 8 с.
147. TAPPI method T222 om-83. Acid-insoluble lignin in wood and pulp [Text]. – In: *Test methods 1998–1999*. – Atlanta. – TAPPI Press, 1999.
148. TAPPI method T211 om-85. Ash in wood, pulp, paper, and paperboard. – In: *Test methods*. – Atlanta. – TAPPI Press, 1985.
149. ЦеллоЛюкс–А [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.sibbio.ru/catalog/spirtoproizvodstvo/tsellolyuks-a> (дата обращения: 29.04.2020).
150. Ультрафло Коре [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.rusferment.com/preparaty-dlya-proizvodstva/gemitsellyulaza/ultraflo-kore.html> (дата обращения: 29.04.2020).

151. Брюзайм ВГХ [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.rusferment.ru/krakhmalopatochnoe-proizvodstvo/2-uncategorised/104-bryuzajm-bgx-dru-gie.html>. – (дата обращения: 03.04. 2018).

152. Скиба, Е.А. Изучение устойчивости штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-1693 к ферментативным гидролизным средам / Е.А. Скиба, О.В. Байбакова // Ползуновский вестник. – 2013. – № 3. – С. 214–219.

153. Пат. 2331667 Российская Федерация, МПК С12N1/16, С12P7/06, С12R1/865. Применение штамма *Saccharomyces cerevisiae* У-3137, в качестве средства, снижающего образование побочных метаболитов в процессе получения спирта / Римарева Л. В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Мартыненко Н.Н., Коновалова Е.Ю.; заявитель и патентообладатель Римарева Л.В. – № 2005137212/13; заявл. 30.11.2005; опубл. 20.08.2008, Бюл. № 23. – 4с.

154. Патент РФ № 2331666. Применение штамма *Saccharomyces cerevisiae* У-3136, в качестве средства, снижающего образование побочных метаболитов в процессе получения спирта / Римарева Л. В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Мартыненко Н.Н., Коновалова Е.Ю.; заявитель и патентообладатель Римарева Л.В. – № 2005137211/13; заявл. 30.11.2005; опубл. 20.08.2008, Бюл. № 23. – 4с.

155. Серба, Е.М. Биотехнологические основы микробной конверсии концентрированного зернового сусла в этанол / Е.М. Серба, М.Б. Оверченко, Л.В. Римарева. – М.: Библио-Глобус, 2017. – 120 с. doi: 10.18334/9785950050169.

156. Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar // *Analytical Chemistry*. – 1959. Vol. 31, № 3. – P. 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030.

157. Dotsenko, A. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using synthetic mixtures of purified cellulases bioengineered at N-glycosylation sites / A. Dotsenko, A. Gusakov, A. Rozhkova [et al.] // *3 Biotech*. – 2018. – Vol 8, № 9. – P. 1–8. doi: 10.1007/s13205-018-1419-4.

158. ГОСТ 3639-79. Растворы водно-спиртовые. Методы определения концентрации этилового спирта. – Введ. 1982-01-01. – М.: ИПК Издательство стандартов, 1994. – 12 с.
159. Градова, Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н.Б. Градова; Рос. хим.-технол. ун-т им. Д.И. Менделеева. – М.: Дели принт, 2001. – 130 с.
160. ГОСТ 32039-2013. Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности. – Введ. 2014-01-07. – М.: Стандартинформ, 2014. – 12 с.
161. Makarova, E.I. Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis of *Miscanthus* and oat hulls / E.I. Makarova, V.V. Budaeva, A.A. Kukhlenko, S.E. Orlov // 3 Biotech. – 2017. – Vol. 7. – № 317. doi: 10.1007/s13205-017-0964-6.
162. Зедгенидзе, И.Г. Планирование эксперимента для исследования многокомпонентных систем. – М.: Наука, 1976. – 390 с.
163. Mironova, G.F. Preparing nutrient media from lignocellulose: optimizing the composition of a multienzyme compound / G.F. Mironova, E.A. Skiba, A.A. Kukhlenko // Catalysis in Industry. – 2020. – Vol. 12, № 2. – P. 162–168. doi: 10.1134/S2070050420020063.
164. Skiba, E.A., Pilot Technology Of Ethanol Production From Oat Hulls For Subsequent Conversion To Ethylene / E.A. Skiba, O.V. Baibakova, V.V. Budaeva [et al] // Chemical Engineering Journal. – 2017. – Vol. 329. – P. 178–186. doi: 10.1016/j.cej.2017.05.182.
165. Hastie, T. The Elements of Statistical Learning: data mining, inference, and prediction / T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman. – Springer, New York, 2009. – 745 p.
166. Ioelovich, M. Study of kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose materials / M. Ioelovich // ChemXpress. – 2015. – Vol. 8. – P. 231–239. doi: 10.13140/RG.2.1.3185.6806.
167. Mironova, G.F. Optimization of pre-saccharification time during dSSF process in oat-hull bioethanol technology / G.F. Mironova, E.A. Skiba, A.A. Kukhlenko // 3Biotech. – 2019. – Vol 9 (12). – № 455. DOI: 10.1007/s13205-019-1988-x.

168. Pavlov, I.N. A setup for studying the biocatalytic conversion of products from the processing of Nonwood Raw Materials / I.N. Pavlov // *Catalysis Industry*. – 2014. – № 6(4). – P. 350–360.

169. Skiba, E.A. Enhancing the Yield of Bioethanol from the Lignocellulose of Oat Hulls by Optimizing the Composition of the Nutrient Medium / E.A. Skiba, G.F. Mironova, A.A. Kukhlenko, S.E. Orlov // *Catalysis in Industry*. – 2018. – Vol. 10, № 3. – С. 257–262. doi: 10.1134/S207005041803008X.

170. Миронова, Г.Ф. Исследование возможности повышения выхода биоэтанола из продукта щелочной делигнификации плодовых оболочек овса с применением метода подпитки / Г.Ф. Миронова, И.Н. Павлов, Е.И. Кащеева // *Ползуновский вестник*. – 2018. – № 1. – С. 111–116. doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2018.01.021.

171. Hallac, B.B. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol / B.B. Hallac, A.J. Ragauskas // *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. – 2010. – № 5. – P. 215–225.

172. Raj, K. Improved high solid loading enzymatic hydrolysis of low-temperature aqueous ammonia soaked sugarcane bagasse using laccase-mediator system and high concentration ethanol production / K. Raj, C. Krishnan // *Industrial Crops and Products*. – 2019. – Vol. 131. – P. 32–40. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.01.032.

173. Yu, Z. Evaluation of the factors affecting avicel reactivity using multi-stage enzymatic hydrolysis / Z. Yu, H. Jameel, H. Chang [et al.] // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2011. – Vol. 109. – № 5. – P. 1131–1139. doi: 10.1002/bit.24386.

174. ГОСТ 131-2013. Спирт этиловый-сырец из пищевого сырья. Технические условия. – Введ. 2014-01-07. – М.: Стандартинформ, 2014. – 6 с.

175. ГОСТ 17299-78. Спирт этиловый технический. Технические условия. Введ. 1980-01-01. – М.: Стандартинформ, 2006. – 4 с.

176. Пат. 2609263 Российская Федерация, МПК В01J21/04, В01J37/04, С07С1/24. Катализатор процесса дегидратации этанола в этилен, способ его приготовления и способ получения этилена / Исупова Л.А., Данилевич В.В., Кругляков

В.Ю., Глазырин А.В., Овчинникова Е.В., Чумаченко В.А.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук. – № 2015137678; заявл. 03.09.2015; опубл. 31.01.2017, Бюл. № 4. – 12 с.

177. Миляева, Л.Г. Основы планирования на предприятии: учебное пособие / Л.Г. Миляева; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – 2-е изд., изм. и доп. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2007. – 72 с.

178. Lux: Cellulosic ethanol price hinges on feedstock cost [Electronic resource]. – Available from: <http://biomassmagazine.com/articles/12958/lux-cellulosic-ethanol-price-hinges-on-feedstock-cost>. – (accessed April 20 2020).

179. Sanchez, A. Parametric analysis of total costs and energy efficiency of 2G en-zymatic ethanol production / A. Sanchez, V. Sevilla-Güitron, G. Magaña // Fuel. – 2013. – Vol. 113. –P. 165–179 doi:10.1016/j.fuel.2013.05.034.

180. Scott A. Clariant bets big on cellulosic ethanol [Electronic resource]. – Available from: <https://cen.acs.org/business/agriculture/Clariant-bets-big-cellulosic-ethanol/96/i39>. – (accessed April 20 2020).

# ПРИЛОЖЕНИЯ

## Приложение 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2701643

### СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН) (RU)*

Авторы: *Миронова Галина Федоровна (RU), Скиба Екатерина Анатольевна (RU), Будаева Вера Владимировна (RU), Кащеева Екатерина Ивановна (RU), Байбакова Ольга Владимировна (RU)*

Заявка № 2018134393

Приоритет изобретения 27 сентября 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 30 сентября 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 27 сентября 2038 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ильев



УТВЕРЖДАЮ

Директор Института катализа  
им. Г.К. Борескова СО РАН,  
Академик РАН  
В.И. Бухтияров



«09» декабря 2019 г.

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ

**образца биоэтанола, предоставленного ИПХЭТ СО РАН, в качестве сырья для процесса каталитической дегидратации этанола в этилен**

В соответствии с Соглашением о сотрудничестве между ИПХЭТ СО РАН и Институтом катализа СО РАН при выполнении инициативной научно-исследовательской работы «Исследование возможности применения биоэтанола, получаемого из непищевого сырья, в процессах каталитической дегидратации биоэтанола в этилен» (2015–2017 гг.) и проекта 15.3 «Фундаментальные основы получения этилена из мискантуса» Комплексной программы ФИ СО РАН П.1 «Междисциплинарные интеграционные исследования» (2018–2019 гг.), ИПХЭТ СО РАН предоставил ИК СО РАН образец биоэтанола.

Образец биоэтанола получен на опытно-промышленном производстве ИПХЭТ СО РАН путем азотнокислой обработки шелуха овса и последующих стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения.

В ИК СО РАН из указанного образца биоэтанола был получен этилен путем каталитической дегидратации при 400°C в лабораторном проточном реакторе, с использованием алюмооксидного катализатора. Выход этилена составил 0,51 кг в расчете на 1 кг безводного этанола, что соответствует выходу этилена из образца коммерчески доступного этанола в этих же условиях.

Руководитель группы комплексных  
технологических проектов, к.т.н.

Чумаченко В.А.

С.н.с. группы комплексных  
технологических проектов, к.т.н.

Овчинникова Е.В.



Общество с ограниченной ответственностью

«РУДО-НД»

Рязанская обл., Путятинский р-он, пос. Новая Деревня

Телефон: (49146) 2-55-05

ИНН 6212000050

р/сч 40702810753000162272 в Отделении № 8606 Сбербанка России г. Рязань, кор.сч. 3010181050000000614,  
БИК 046126614, ОКОНХ 18141, ОКПО 12183224, КПП 621201001

№5  
От 21.04.2020г

Директору ИПХЭТ СО РАН  
Чл-корр. Сысолятину С.В.  
Научному руководителю  
ИПХЭТ СО РАН  
Академику Саковичу Г.В.

Уважаемые Сергей Викторович и Геннадий Викторович!

Наше предприятие имеет опыт производства спирта из пищевого сырья (картофель, зерно и т.п.), производственная мощность предприятия составляет 1000 дал спирта в сутки. В настоящее время предприятие не работает.

Ознакомившись с публикациями сотрудников ИПХЭТ СО РАН по получению этанола из мискантуса, просим консультационной помощи по возможности реализации технологии на нашем предприятии. Экономически целесообразно считаем производство от 10000 дал спирта в сутки.

Также мы готовы рассмотреть строительство принципиально нового производства

Директор

Ретинский Л.М.

Конт. лицо  
Гл. технолог Авдеева Н.А  
Тел. 8 900 607 27 21