

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Скиба Екатерина Анатольевна

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

1.5.6. – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора технических наук

Научный консультант:
академик РАН
Сакович Геннадий Викторович

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР. СОСТОЯНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ, БАЗИРУЮЩИХСЯ НА ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЮЩЕМ СЫРЬЕ.....	40
1.1 Классификация целлюлозосодержащего сырья	40
1.2 Химический состав целлюлозосодержащего сырья	44
1.3 Методы предварительной обработки целлюлозосодержащего сырья.....	48
1.4 Гидролиз целлюлозосодержащего сырья.....	61
1.5 Перспективы использования целлюлозосодержащего сырья для производства продуктов микробиологического синтеза.....	68
1.6 Классическое биотехнологическое производство этилового спирта и пути его развития.....	72
1.6.1 Продуценты биоэтанола	72
1.6.2 Свойства и применение биоэтанола.....	75
1.6.3 Сырьё и технология получения биоэтанола.....	77
1.6.4 Конфигурации проведения биокаталитических стадий в технологии биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья...	80
1.6.5 Примеры действующих производств биоэтанола второго поколения.....	85
1.6.6 Экологические аспекты производства биоэтанола.....	88
1.7 Передовое биотехнологическое производство бактериальной наноцеллюлозы.....	91
1.7.1 Продуценты бактериальной наноцеллюлозы и их метаболизм.....	91
1.7.1.1 Продуценты и сборка бактериальной наноцеллюлозы.....	91
1.7.1.2 Метаболизм <i>Komagataeibacter xylinus</i> и биосинтез бактериальной наноцеллюлозы.....	94
1.7.1.3 Повышение продуктивности продуцентов бактериальной наноцеллюлозы.....	97
1.7.1.4 Продуцент <i>Medusomyces gisevii</i>	101
1.7.2 Структура и свойства бактериальной наноцеллюлозы.....	105
1.7.2.1 Химия бактериальной наноцеллюлозы.....	105
1.7.2.2 Строение бактериальной наноцеллюлозы.....	107
1.7.2.3 Свойства бактериальной наноцеллюлозы.....	110
1.7.3 Композиты на основе бактериальной наноцеллюлозы.....	115
1.7.4 Основные направления применения бактериальной наноцеллюлозы.....	120
1.7.4.1 Применение в пищевой промышленности.....	121
1.7.4.2 Биомедицинское применение.....	122
1.7.4.3 Применение в биотехнологической	

	промышленности.....	132
1.7.4.4	Применение в защите окружающей среды.....	133
1.7.4.5	Применение в целлюлозно-бумажной промышленности.....	133
1.7.4.6	Применение в легкой промышленности.....	134
1.7.4.7	Применение в химической промышленности.....	134
1.7.4.8	Применение в электронике и энергетике.....	136
1.7.5	Сырьё и технология получения бактериальной наноцеллюлозы.....	137
1.7.5.1	Сырьё для получения бактериальной наноцеллюлозы.....	137
1.7.5.2	Технологические стадии получения бактериальной наноцеллюлозы.....	142
1.7.5.3	Оптимизация условий биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы	144
1.7.5.4	Инженерно-аппаратурное оформление процесса биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы.....	145
1.7.6	Примеры коммерциализации технологии бактериальной наноцеллюлозы.....	151
1.8	Обоснование выбора направления исследования.....	155
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ.....		169
2.1	Организация выполнения работы	169
2.2	Материалы и оборудование.....	173
2.2.1	Характеристика сырья	173
2.2.2	Характеристика ферментных препаратов	173
2.2.3	Характеристика микроорганизмов.....	174
2.2.4	Используемое оборудование.....	176
2.3	Методы исследований.....	178
2.3.1	Предварительная химическая обработка целлюлозосодержащего сырья	178
2.3.2	Ферментативный гидролиз субстратов	180
2.3.3	Приготовление питательных сред и получение инокулята..	181
2.3.4	Микробиологический синтез	184
2.3.5	Очистка целевых продуктов	185
2.3.6	Расчёт выхода целевых продуктов	186
2.3.7	Методики анализа.....	188
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ХИМИЧЕСКОЙ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ И ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ПРЕДОБРАБОТАННОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ.....		190
3.1	Предварительная химическая обработка сырья	190
3.2	Ферментативный гидролиз полученных субстратов.....	192
3.3	Азотнокислая обработка легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья: проблемы, решения, перспективы	194

3.3.1	Зависимость эффективности азотнокислой обработки от концентрации азотной кислоты в растворе.....	194
3.3.2	Критическая точка азотнокислой обработки.....	196
3.3.3	Множественное использование отработанного раствора азотной кислоты.....	200
3.3.4	Использование отработанного раствора азотной кислоты.....	206
3.3.5	Вопрос экологии при предобработке с помощью азотной кислоты.....	211
3.3.6	Соответствие азотнокислого способа мировым критериям.....	213
3.4	Кинетика ферментативного гидролиза при различных концентрациях субстрата.....	214
3.5	Оптимизация состава мультиэнзимной композиции.....	220
3.6	Исследование побочных продуктов ферментативного гидролиза...	223
ГЛАВА 4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ БИОЭТАНОЛА НА СРЕДАХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ		234
4.1	Спиртовое брожение в зависимости от способа предварительной химической обработки сырья.....	234
4.2	Совмещение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения.....	240
4.3	Оптимизация продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза перед ее совмещением со спиртовым брожением.....	244
4.4	Оптимизация состава питательной среды на основе ферментативного гидролизата стимуляторами биосинтеза этанола.....	251
4.5	Выбор штамма <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	256
4.6	Применение метода фермент-субстратной подпитки при получении биоэтанола.....	257
4.7	Переработка барды для получения кормового белка.....	259
4.8	Опытные-промышленные испытания технологий биоэтанола.....	261
4.8.1	Разработка аппаратурно-технологической схемы получения биоэтанола.....	261
4.8.2	Масштабирование получения биоэтанола из шелухи овса, предобработанной двумя одностадийными способами.....	264
4.8.3	Масштабирование получения биоэтанола из мискантуса, предобработанного азотнокислым способом.....	270
4.9	Применение биоэтанола для получения этилена методом каталитической дегидратации.....	277
4.10	Технико-экономическая оценка разработанной технологии биоэтанола из шелухи овса и мискантуса.....	279
ГЛАВА 5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА СРЕДАХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ.....		283

5.1	Исследование влияния условий культивирования <i>Medusomyces gisevii</i> Sa-12 на выход бактериальной наноцеллюлозы.....	283
5.2	Особенности биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы в зависимости от способа предварительной химической обработки сырья.....	295
5.2.1	Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы на средах, полученных из шелухи овса.....	295
5.2.2	Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы на средах, полученных из мискантуса.....	302
5.2.3	Сравнение процесса биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы на ферментативных гидролизатах шелухи овса и мискантуса.....	305
5.2.4	Сравнение полученных результатов с мировым опытом	307
5.3	Физико-химический анализ бактериальной наноцеллюлозы.....	307
5.3.1	Характеристики образцов бактериальной наноцеллюлозы, полученных на питательных средах из шелухи овса.....	307
5.3.2	Характеристики образцов бактериальной наноцеллюлозы, полученных на ферментативных средах из мискантуса.....	320
5.3.3	Сравнение характеристик образцов бактериальной наноцеллюлозы, полученных из шелухи овса и мискантуса.	325
5.4	Скрининг продуцентов бактериальной наноцеллюлозы.....	327
5.4.1	Скрининг продуцентов бактериальной наноцеллюлозы на синтетических средах.....	327
5.4.2	Скрининг продуцентов бактериальной наноцеллюлозы на питательных средах из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья.....	328
5.4.3	Исследование зависимости физико-химических свойств бактериальной наноцеллюлозы от вида используемого продуцента.....	333
5.5	Получение бактериальной наноцеллюлозы из целлюлозосодержащего сырья в условиях опытно-промышленного производства.....	341
5.6	Применение бактериальной наноцеллюлозы в ветеринарии и медицине.....	348
5.7	Технико-экономическая оценка разработанной технологии бактериальной наноцеллюлозы из шелухи овса и мискантуса.....	351
	РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	354
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	358
	БЛАГОДАРНОСТИ	358
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	359
	ПРИЛОЖЕНИЯ	456
1	Технологические прописи получения биоэтанола и его предшественников из целлюлозосодержащего сырья.....	456

2	Техническое задание на проектирование установки.....	462
3	Акты испытания, применения и внедрения образцов биоэтанола для процесса каталитической дегидратации в этилен	463
4	Программы и методики (биосинтез и анализ бактериальной наноцеллюлозы).....	468
5	Технические условия, зарег. в ФБУ «Алтайский ЦСМ» (бактериальная наноцеллюлоза)	481
6	Технологические инструкции (бактериальная наноцеллюлоза).....	484
7	Технологическая пропись получения бактериальной наноцеллюлозы.....	486
8	Технологический регламент получения бактериальной наноцеллюлозы.....	487
9	Акты внедрения и испытания бактериальной наноцеллюлозы.....	488

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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

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

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

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

эффективных технологических решений трансформации целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты крайне актуальна.

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

Степень разработанности

Технология производства биоэтанола хорошо проработана на пищевых видах сырья, мощно представлена в гидролизном производстве (СССР), в тоже время она остается наукоёмкой и непрерывно развивается в силу востребованности данного продукта в пищевых и технических целях. В настоящее время биоэтанол рассматривается не только как топливо или топливная добавка, но как универсальный растворитель, прекурсор для синтеза широкого круга химических веществ, сырьё для водородной энергетики. Для России является актуальной возрождение гидролизной промышленности, при этом в данной работе впервые предлагается для этой цели вместо древесины использовать целлюлозосодержащее сырьё, полученное за один вегетационный период в местных условиях.

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

основе БНЦ спектр применения непрерывно расширяется. В России в настоящее время нет производства БНЦ.

Цель и задачи исследований

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

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

2. Исследовать ферментативный гидролиз продуктов химической предобработки целлюлозосодержащего сырья.

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

4. Разработать промышленную технологию биоэтанола, а именно:

– технологию получения;

– техническую документацию;

– реализовать масштабирование в условиях опытно-промышленного производства;

– провести технико-экономические расчёты производства;

– осуществить применение опытных образцов (в сторонних организациях).

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

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

Научная новизна работы

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

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

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

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

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

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

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

Показаны высокая эффективность одностадийной обработки HNO_3 для последующих ферментативного гидролиза и получения биоэтанола и двухстадийной обработки – для получения БНЦ.

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

Научно обоснована и разработана технология получения биоэтанола, включающая предварительную обработку целлюлозосодержащего сырья

разбавленным раствором азотной кислоты, совмещение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения, подпитку субстратом и ферментными препаратами, выделение и очистку биоэтанола. Выход биоэтанола из шелухи овса составил 18,1-20,2 дал/т, из мискантуса – 25-26 дал/т.

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

Научно обоснована и разработана технология получения БНЦ, включающая двухстадийную предварительную обработку целлюлозосодержащего сырья разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия; ферментативный гидролиз; стандартизацию питательной среды по глюкозе и экстрактивным веществам чёрного чая; биосинтез БНЦ с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12; выделение, очистку, стерилизацию и упаковывание БНЦ. Выход БНЦ влажностью 99,0 % из 1 т шелухи овса составил 1,94 т.

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

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

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

Теоретическая значимость работы

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

Практическая значимость работы

Экспериментально подтверждены, разработаны и масштабированы на опытно-промышленном производстве ИПХЭТ СО РАН технологии переработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в биоэтанол и БНЦ. Новизна технических решений подтверждена 7 патентами РФ.

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

Разработана техническая документация:

– технологические прописи химической предобработки (2 шт.),

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

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

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

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

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

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

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

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

Связь работы с научными программами

Работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ ИПХЭТ СО РАН: проект V.40.2.1 «Разработка физико-химических основ технологии получения полупродуктов и биотоплив из недревесного растительного сырья», 2010-2012; проект V.47.1.2 «Фундаментальные исследования химических и биотехнологических процессов получения новых материалов и компонентов топлив из недревесного сырья», 2013-2016; совместный интеграционный проект № 11 фундаментальных исследований ИПХЭТ СО РАН и ИХ Коми НЦ УрО РАН «Химическая, механохимическая и ферментативная деструкция целлюлозосодержащего сырья для получения ценных продуктов», 2013-2014; Проект № 5 Программы РАН 3 «Химическое обогащение возобновляемого «концентрированного» целлюлозосодержащего сырья в различных средах в реакторах под давлением», 2012-2014; технологический проект «Технологическое оборудование для комплексной переработки растительного сырья в целлюлозосодержащие продукты и исходные компоненты для химического синтеза и биотопливо», 2014-2015; Базовый проект «Фундаментальные технологические основы биорефайнинга возобновляемого недревесного сырья», 2017-2020; проект ФНИ № 15 «Фундаментальные основы получения этилена из мискантуса» II.1 Комплексной программы фундаментальных исследований СО РАН «Междисциплинарные интеграционные исследования» на 2018-2020 гг.», блок № 15.3 «Разработка упрощенной технологии получения биоэтанола из мискантуса для синтеза этилена»; базовый проект «Фундаментальные основы создания интегрированной технологии переработки легковозобновляемого непищевого растительного сырья в востребованные экономикой РФ продукты», 2021-2023. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-48-220983 р_а «Создание установки получения серии востребованных

продуктов из недревесного растительного сырья», гранта РФФИ 17-19-01054 «Фундаментальные инженерные аспекты технологии получения бактериальной наноцеллюлозы из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья», 2017-2021 гг., гранта РФФИ 22-13-00107 «Фундаментальные подходы к переработке технической культуры мискантус в ценные материалы и биопродукты для снижения углеродного следа», 2022-2024 гг.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Высокоэффективный способ предобработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья 4 %-ной азотной кислотой с получением двух продуктов: субстрата для последующей биотехнологической трансформации и комбинированного лигногуминового удобрения.
2. Промышленная технология получения безметанольного биоэтанола из шелухи овса и мискантуса.
3. Технология получения высококачественной БНЦ из шелухи овса и мискантуса с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12.

Личный вклад автора

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

Апробация результатов

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

Публикации

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

Структура и объем работы

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

Публикации, в которых представлены основные результаты диссертационной работы

Статьи в журналах, входящих в базы данных WoS и Scopus Q1, Q2

1. Skiba E.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V. Yield and quality of bacterial cellulose from agricultural waste // Cellulose. – 2022. – P. 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04372-x>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.

2. Aleshina L.A., Gladysheva E. K., Budaeva V.V., Mironova G.F., **Skiba E.A.**, Sakovich G.V. X-ray diffraction data on the bacterial nanocellulose synthesized by *Komagataeibacter xylinus* B-12429 and B-12431 microbial producers in miscanthus-and oat hull-derived enzymatic hydrolyzates // Crystallography Reports. 2022. – V. 67. –№ 3. –P. 391-397. <https://doi.org/10.1134/S1063774522030026>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q2**.

3. **Skiba E.A.**, Ovchinnikova E.V., Budaeva V.V., Banzaraktsaeva S.P., Kovgan M.A., Chumachenko V. A., Mironova G.F., Kortusov A.N., Parmon V.N., Sakovich, G. V. Miscanthus bioprocessing using HNO₃-pretreatment to improve productivity and quality of bioethanol and downstream ethylene // Industrial Crops and Products. – 2022. – 177. – 114448. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114448>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.

4. Ovchinnikova E.V., Mironova G.F., Banzaraktsaeva S.P., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Kovgan M.A., Chumachenko V.A. Bioprocessing of oat hulls to ethylene: Impact of dilute HNO₃- or NaOH pretreatment on process efficiency and sustainability // ACS Sustainable Chemistry & Engineering – 2021.– V. 9. – № 49. – P. 16588–16596. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05112>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.

5. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., **Skiba E.A.**, Mironova G.F., Bychin N.V., Gismatulina Y.A., Kashcheyeva E.I., Sitnikova A.E., Shilov A.I., Kuznetsov P.S.,

Sakovich G.V. Scale-up of biosynthesis process of bacterial nanocellulose // Polymers. – 2021. V.13 (12). – P. 1920; <https://doi.org/10.3390/polym13121920> WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.

6. Skiba E.A., Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Sitnikova A.E., Korchagina A.A., Bychin N.V., Gladysheva E.K., Pavlov I.N., Zharikov A.N., Lubyansky V.G., Semyonova E.N., Sakovich G.V. Biosynthesis of bacterial cellulose by extended cultivation with multiple removal of BC pellicles // Polymers. – 2021. – V. 13 (13). – P. 2118. <https://doi.org/10.3390/polym13132118>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.

7. Shavyrkina N.A., **Skiba E.A.**, Kazantseva A. E., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Bychin N.V., Gismatulina Yu.A., Kashcheyeva E.I., Mironova G.F., Korchagina A.A., Pavlov I.N., Sakovich G.V. Static culture combined with aeration in biosynthesis of bacterial cellulose // Polymers. – 2021. – V. 13 (23). – P. 4241. <https://doi.org/10.3390/polym13234241>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**

8. **Skiba E.A.**, Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V., Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from Miscanthus biomass // Carbohydrate Polymers. – 2021. – V. 252 – P. 117178, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.

9. **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Ovchinnikova E.V., Gladysheva E.K., Kashcheyeva E.I., Pavlov I.N., Sakovich G.V. A technology for pilot production of bacterial cellulose from oat hulls // Chemical Engineering Journal. – 2020. – V. 383. – P. 123128. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123128>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.

10. Kashcheyeva E.I., **Skiba E.A.**, Zolotukhin V.N., Budaeva V.V. Recycling of nitric acid solution in chemical pretreatment of oat hulls for biorefining // BioResources. – 2020. – V. 15 (1). – P. 1575-1586. <https://doi.org/10.15376/biores.15.1.1575-1586>. WoS, **Q2**. Scopus, **Q2**.

11. Aleshina L.A., Gladysheva E.K, Budaeva V.V., Golubev D.S., **Skiba E.A.**, Sakovich G.V. X-ray diffraction study of bacterial nanocellulose produced by *Medusomyces gisevii* Sa-12 cultured in enzymatic hydrolysates of miscanthus // Crystallography Reports. – 2019. – V. 64. – №.6. – P. 914–919. <https://doi.org/10.1134/S1063774519060026>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q2**.

12. Kashcheyeva E.I., Gladysheva E.K., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V. A study of properties and enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose // Cellulose. – 2019 – V. 26. –P. 2255–2265. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-02242-7>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.

13. Mironova G.F., **Skiba E.A.**, Kukhlenko A.A. Optimization of pre-saccharification time during dSSF process in oat-hull bioethanol technology // 3 Biotech. – 2019. – V. 9. – P. 455. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1988-x>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q2**.

14. Budaeva V.V.; Gismatulina Y.A.; Mironova G.F.; **Skiba E.A.**; Gladysheva E.K.; Kashcheyeva E.I.; Baibakova O.V.; Korchagina A.A.; Shavyrkina N.A.; Golubev D.S.; Bychin N.V.; Pavlov I.N.; Sakovich G.V. Bacterial nanocellulose nitrates // Nanomaterials. – 2019. –V. 9. –P. 1694. <https://doi.org/10.3390/nano9121694>. WoS, **Q2**. Scopus, **Q1**.

15. Zharikov A.N., Lubyansky V.G., Gladysheva E.K., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Semyonova E.N., Zharikov A.A., Sakovich G.V. Early morphological changes in tissues when replacing abdominal wall defects by bacterial nanocellulose in experimental trials // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2018. – V. 29 (7). – P. 95. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6111-z>. WoS, **Q2**. Scopus, **Q2**.

16. Aleshina L.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., **Skiba E.A.**, Arkharova N.A., Sakovich G.V. X-ray diffraction study of bacterial nanocellulose produced by the *Medusomyces gisevii* Sa-12 culture in enzymatic hydrolysates of oat hulls // *Crystallography Reports*. – 2018. – V. 63. – №. 6. – P. 955–960. <http://dx.doi.org/10.1134/S1063774518050024>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q2**.

17. **Skiba E.A.**, Baibakova O.V., Budaeva V.V., Pavlov I.N., Vasilishin M.S., Makarova E.I., Sakovich G.V., Ovchinnikova E.V., Banzaraksaeva S.P., Vernikovskaya N.V., Chumachenko V.A. Pilot technology of ethanol production from oat hulls for subsequent conversion to ethylene // *Chemical Engineering Journal*. – 2017. – V. 329. – P. 178–186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.05.182>.

18. Tarabanko V.E., Kaygorodov K.L., **Skiba E.A.**, Tarabanko N., Chelbina Y.V., Baybakova O.V., Kuznetsov B.N., Djakovich L. Processing pine wood into vanillin and glucose by sequential catalytic oxidation and enzymatic hydrolysis // *Journal of Wood Chemistry and Technology*. – 2017. – V. 37(1). – P. 43-51. <http://dx.doi.org/10.1080/02773813.2016.1235583>. WoS, **Q1**. Scopus, **Q1**.

19. **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Baibakova O.V., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Dilute nitric-acid pretreatment of oat hulls for ethanol production // *Biochemical Engineering Journal*. – 2017. – V. 126. – P. 118-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.003>. WoS, **Q2**. Scopus, **Q1**.

Q3, Q4

20. **Skiba E.A.**, Skiba M.A., Pyatunina O.I. Nitric acid solution after treating miscanthus as a growth regulator of seed peas (*Pisum sativum* L.) in vitro // *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. – 2021. – T. 11. – № 3. – P. 413–420. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-413-420>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**

21. Baibakova O.V., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Gismatulina Y.A., Sakovich G.V. Producing bioethanol from miscanthus: experience of primary scale-up // *Catalysis in Industry*. – 2020. – V. 12. – №. 2. – P. 155–161. <https://doi.org/10.1134/S2070050420020038>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.

22. Mironova G.F., Skiba E.A., Kukhlenko A.A. Preparing nutrient media from lignocellulose: optimizing the composition of a multienzyme compound // *Catalysis in Industry*. – 2020. – V.12. – №. 2. – P. 162–168. <https://doi.org/10.1134/S2070050420020063>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.

23. Mironova G.F., **Skiba E.A.** Synthesis of bioethanol from oat hulls via enzyme-substrate feeding // *Catalysis in Industry*. – 2020. – V. 12. – № 4. – P. 359-363. <https://doi.org/10.1134/S2070050420040054>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.

24. Sakovich G.V., **Skiba E.A.**, Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V. *Miscanthus* as a feedstock for the production of bacterial nanocellulose //

Doklady Chemistry. – 2020. – T. 495. – № 2. – P. 205-208. <https://doi.org/10.1134/S0012500820120034>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q3**.

25. Gladysheva E.K., Golubev D.S., **Skiba E.A.** Investigation of bacterial nanocellulose biosynthesis by *Medusomyces gisevii* Sa-12 from enzymatic hydrolyzate obtained by alkaline delignification of miscanthus // Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. – 2019. – V. 9. – №. 2. – P. 260–269. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-260-269>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.

26. **Skiba E.A.**, Baibakova O.V., Gladysheva E.K., Budaeva V.V. Study of the influence of *Medusomyces gisevii* Sa-12 inoculum dosage on bacterial cellulose yield and degree of polymerization // Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. – 2019. V. 9. – №. 3, P. 420–429. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-420-429>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.

27. Gladysheva E.K., **Skiba E.A.**, Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the conditions for the biosynthesis of bacterial cellulose by the producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – V. 54. – №. 2. – P. 179–187. <https://doi.org/10.1134/S0003683818020035>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q3**.

28. Zemnukhova L.A., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Panasenko A.E, Polyakova N.V. Composition of inorganic components of oat husks and products of their chemical and enzymatic transformation // Russian Journal of Applied Chemistry. – 2018. – V. 91. – №. 2. –P. 230–234. <https://doi.org/10.1134/S1070427218020106>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q3**.

29. Zharikov, A.N., Lubyansky, V.G., Gladysheva, E.K., **Skiba, E.A.**, Budaeva, V.V., Semenova, E.N., Motin, Yu.G., Zharikov, A.A. Prosthetic hernioplasty using bacterial nanocellulose: An experimental study // Clinical and Experimental Surgery. – 2018. – 6 (2). –P. 59-66. <https://doi.org/10.24411/2308-1198-2018-12008>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.

30. **Skiba E.A.**, Mironova G.F., Kukhlenko A.A., Orlov S.E. Enhancing the yield of bioethanol from the lignocellulose of oat hulls by optimizing the composition of the nutrient medium // Catalysis in Industry. – 2018. – V. 10. – №. 3. – P. 257–262. <https://doi.org/10.1134/S207005041803008X>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.

31. **Skiba E.A.** Biosynthesis of bacterial nanocellulose in media obtained from cellulose containing materials // Izvestiya vuzov-prikladnaya khimiya i biotekhnologiya [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 41-47 (in Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-3-41-47>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.

32. Sakovich G.V., **Skiba E.A.**, Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Aleshina L.A. Chemical aspects of bacterial nanocellulose // J. Sib. Fed. Univ. Chem. – 2018. – V. 11 (4) – P. 531-542. <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0097>. WoS, **Q4**. Scopus, **Q4**.

33. Baibakova O.V., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Sakovich G.V. Preparing bioethanol from oat hulls pretreated with a dilute nitric acid: scaling of the production

process on a pilot plant // *Catalysis in Industry*. – 2017. – V. 9. – №. 3. – P. 257–263. <https://doi.org/10.1134/S2070050417030023>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

34. Sakovich G.V., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Aleshina L.A. Technological fundamentals of bacterial nanocellulose production from zero prime-cost feedstock // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – V. 477. – P. 357-359. <https://doi.org/10.1134/S1607672917060047>. WoS, Q4. Scopus, Q3.

35. Gladysheva E.K., **Skiba E.A.** Biosynthesis of bacterial cellulose on enzymatic hydrolyzate of oat hull pulp // *Izvestiya vuzov-prikladnaya khimiya i biotekhnologiya*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 141-147 (in Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-141-147>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

36. **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Makarova E.I., Baibakova O.V., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Bioethanol from oat hulls pretreated by alkaline delignification. I. Chemical and enzymatic material conversion // *Biotekhnologiya*. – 2017. – Vol.33. – №. 2. – P. 68-75. <https://doi.org/10.1016/0234-2758-2017-33-2-68-75>. WoS, Q4. Scopus, Q4.

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

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

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

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

41. **Скиба Е.А.** Методика определения биологической доброкачественности гидролизатов из целлюлозосодержащего сырья с помощью штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-1693 // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2016. – № 1 (16). – С. 34-44. ISSN 2227-2925. WoS, Q4. Scopus, Q4.

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

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

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

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

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

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

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

Статьи в журналах, входящих в список ВАК

1. Голубев Д.С., Бычин Н.В., Будаева В.В., **Скиба Е.А.** Методика испытаний на растяжение гидратированных гель-плёнок бактериальной целлюлозы // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2019. – Т. 85. № 10. – С. 64-69. DOI: 10.26896/1028-6861-2019-85-10-64-69

2. Жариков А.Н., Лубянский В.Г., Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Семенова Е.Н. Укрепление тонкокишечного шва с помощью бактериальной наноцеллюлозы: экспериментально-морфологическое исследование // Бюллетень медицинской науки. – 2018. – № 4 (12). – С. 48-53.

3. Миронова Г.Ф., **Скиба Е.А.** Опыт получения биоэтанола из продукта азотнокислой обработки шелухи овса неизотермическим способом с подпиткой // Ползуновский вестник. – 2018. – № 4. – С.160-163. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2018.04.032

4. Бычин Н.В., Голубев Д.С., **Скиба Е.А.** Термогравиметрические и механические характеристики бактериальной наноцеллюлозы в зависимости от способа получения питательных сред – ферментативных гидролизатов из плодовых оболочек овса // Ползуновский вестник. . – 2018. – № 3. – С. 109-115.

5. Байбакова О.В., **Скиба Е.А.**, Павлов И.Н., Будаева В.В., Крюков Ю.А., Золотухин В.Н., Кашеева Е.И., Гисматулина Ю.А., Миронова Г.Ф., Гладышева

Е.К., Корчагина А.А., Сакович Г.В. Одностадийная обработка плодовых оболочек овса для получения биоэтанола – прекурсора этилена // Ползуновский вестник. – 2018. – № 3. – С. 90-95

6. Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.** Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы на альтернативных питательных средах: обзор // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2018. – Т. 14, № 1. – С. 92-101.

7. Будаева В.В., Павлов И.Н., **Скиба Е.А.**, Байбакова О.В., Василишин М.С., Гисматулина Ю.А., Денисова М.Н., Иванов О.С., Макарова Е.И., Золотухин В.Н. Фундаментальные основы реализации комплексной переработки недревесного растительного сырья в востребованные продукты в технологическом оборудовании малого объёма // Ползуновский вестник. – 2016. – № 2. – С. 186-191.

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

9. Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.**, Алешина Л.А. Особенности структурных характеристик бактериальной целлюлозы, синтезированной на ферментативном гидролизате лигноцеллюлозного материала плодовых оболочек овса // Ползуновский вестник. – 2016. – № 4. – Т.1. – С. 152-156.

10. Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.** Биосинтез бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* // Вестник ВГУИТ – 2015. – № 3. – С. 137-144.

11. **Скиба Е.А.**, Байбакова О.В. О влиянии условий сбраживания на выход биоэтанола, получаемого из мискантуса через химическую стадию щелочной делигнификации // Ползуновский вестник. – 2015. – № 4-2. С. 112-116.

12. Сакович Г.В., Будаева В.В., Денисова М.Н., Макарова Е.И., Павлов И.Н., Якушева А.А., Золотухин В.Н., **Скиба Е.А.**, Обрезкова М.В., Берещинова М.Н. Фундаментальные исследования гидротропной целлюлозы: способ получения, характеристики, ферментативный гидролиз // Вестник Алтайской науки. – 2014. – № 1 (19). – С. 170-174.

13. Байбакова О.В., **Скиба Е.А.** Превращение лигноцеллюлозного материала из плодовых оболочек овса в биоэтанол // Ползуновский вестник. – 2014. – № 3. – С. 181-185

14. Гладышева Е.К., Скиба Е.А. Влияние углеродного состава питательных сред на продуктивность целлюлозосинтезирующих бактерий (обзор) // Ползуновский вестник. – 2014. – № 3. – С. 168-173.

15. **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Орлов С.Е., Золотухин В.Н., Хмелев В.Н., Цыганок С.Н., Удоратина Е.В., Щербакова Т.П. О влиянии ультразвукового воздействия на кинетику ферментативного гидролиза целлюлозы мискантуса // Ползуновский вестник. – 2013. – № 3. – С. 234-238.

16. **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Макарова Е.И., Павлов И.Н., Золотухин В.Н., Сакович Г.В. Биоэтанол из целлюлозы плодовых оболочек овса // Вестник Казан. технол. ун-та. – 2013. – Т. 16, № 22. – С. 202-205.

17. **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Макарова Е.И., Павлов И.Н., Золотухин В.Н., Сакович Г.В. Ферментативный гидролиз технических целлюлоз плодовых оболочек овса // Вестник Казан. технол. ун-та. – Т.16, № 20. – С. 195-198.

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

19. **Скиба Е.А.**, Момот Т.О., Бычин Н.В., Золотухин В.Н. Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозных материалов в зависимости от способа их подготовки // Ползуновский вестник. – 2013. – № 3. – С. 197-202.

20. Будаева В.В., Макарова Е.И., **Скиба Е.А.**, Золотухин В.Н., Сакович Г.В., Удоратина Е.В., Кувшинова Л.А., Щербакова Т.П., Кучин А.В. Получение лигноцеллюлозных материалов из недревесного сырья и исследование их в качестве субстратов ферментативного гидролиза // Ползуновский вестник. – 2013. – № 1. – С. 215–219.

21. Сакович Г.В., Будаева В.В., **Скиба Е.А.**, Макарова Е.И., Павлов И.Н., Кортусов А.Н., Золотухин В.Н. Опыт масштабирования ферментативного гидролиза технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса // Ползуновский вестник. – 2012. – № 4. – С. 173–176.

22. **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю. Сбраживание нецелевых гидролизатов с помощью *Saccharomyces cerevisiae* (штамм У-1693) // Ползуновский вестник, № 4, 2010. – С. 180-183.

23. Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н., Обрезкова М.В., **Скиба Е.А.**, Ильясов С.Г., Сакович Г.В., Опарина Л.А., Высоцкая О.В., Колыванов Н.А., Гусарова Н.К., Трофимов Б.А. Пути полной и экологически чистой переработки возобновляемого растительного сырья // Ползуновский вестник, 2010. – № 4. – С. 158-167.

24. Пельтек С.Е., Брянская А.В., Горячковская Т.Н., Шумный В.К., Колчанов Н.А., Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н., **Скиба Е.А.**, Сакович Г.В. К вопросу биологической переработки российского мискантуса // Ползуновский вестник, 2010. – № 4. – С. 138-144.

Патенты

1. Пат. 2533921, Российская Федерация, МПК С13К1/02. Способ предварительной обработки целлюлозосодержащего сырья для ферментативного гидролиза / Будаева В.В., Макарова Е.И., **Скиба Е.А.**, Золотухин В.Н., Сакович Г.В. – № 2013140699/20, заявл. 03.09.2013; опубл. 27.11.2014, Бюл. № 33 – 10 с.

2. Пат. 2581799, Российская Федерация, МПК С12Р7/10. Способ получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья / **Скиба Е.А.**, Байбакова О.В., Будаева В.В., Сакович Г.В. – № 2015108958/10; заявл. 13.03.2015; опубл. 20.04.2016, Бюл. № 11. – 9 с.

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

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

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

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

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

Прочие издания, материалы конференций и тезисы докладов (российские издательства)

1. **Скиба Е.А.** Использование *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 для оценки доброкачественности гидролизатов из нетрадиционного недревесного растительного сырья / Технология и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 4-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (27-29 апреля 2011 г., г. Бийск). – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2011–С. 176-182.

2. **Скиба Е.А., Дьякова Н.Н.** Особенности метаболизма *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 при высоких концентрациях солей азота и фосфора / Технология и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 4-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (27-29 апреля 2011 г., г. Бийск). – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2011. – С. 182-185.

3. **Скиба Е.А., Будаева В.В., Золотухин В.Н., Макарова Е.И., Сакович Г.В., Удоратина Е.В., Щербакова Т.П., Кучин А.В.** Результаты гидролиза

лигноцеллюлозных материалов различными ферментными препаратами / Новые достижения в химии и химической техно-логии растительного сырья: материалы V Всерос. конф., Барнаул, 24-26 апреля 2012 г. / Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 53-55.

4. **Скиба Е.А.**, Щербакова Т.П., Удоратина Е.В., Кучин А.В., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование ультразвукового воздействия на лигноцеллюлозную матрицу / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всерос. конф., Барнаул, 24-26 апреля 2012 г. / Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 100-101.

5. **Скиба Е.А.** Масштабирование ферментативного гидролиза технической целлюлозы мискантуса / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всерос. конф., Барнаул, 24-26 апреля 2012 г. / Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 384-385.

6. **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Сакович Г.В., Золотухин В.Н., Макарова Е.И., Павлов И.Н. Биоэтанол из мискантуса и отходов злаков / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всерос. конф., Барнаул, 24-26 апреля 2012 г. / Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 386-387.

7. **Скиба Е.А.**, Кортусов А.Н., Будаева В.В. Исследование зависимости эффективности ферментативного гидролиза технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса от способа их получения / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: Материалы 5-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с Международным участием (24-26 мая 2012 г., г. Бийск). Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2012. – С. 264-267.

8. **Скиба Е.А.** Проблемы сбраживания гидролизатов из нетрадиционного целлюлозосодержащего сырья / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: Материалы 5-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с Международным участием (24-26 мая 2012 г., г. Бийск). Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2012. – С. 280-284.

9. **Скиба Е.А.**, Момот Т.О. Кинетика клеточного роста и утилизации субстрата штаммами *Pachysolen tannophilus* Y-1532 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 на синтетических питательных средах / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: Материалы 5-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с Международным участием (24-26 мая 2012 г., г. Бийск). Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2012. – С. 259-264.

10. **Скиба Е.А.**, Байбакова О.В. Получение биоэтанола штаммами *Pachysolen tannophilus* Y-1532 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 на гидролизной среде / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: Материалы 5-й

Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых уче-ных с Международным участием (24-26 мая 2012 г., г. Бийск). Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2011. – С. 284-287.

11. Байбакова О.В., *Скиба Е.А.* Влияние биологически активных веществ на биосинтез этанола на среде ферментативного гидролизата технической целлюлозы плодовых оболочек овса / Химия биологически активных веществ: межвузовский сборник научных трудов Всерос. школы-конф. молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием (24-28 сентября 2012 г., г. Саратов) – Саратов: Изд-во «КУБиК», 2012. – С. 228-229.

12. **Скиба Е.А.**, Момот Т.О. Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозного материала в ацетатном буфере и в водной среде / Химия биологически активных веществ: межвузовский сборник научных трудов Всерос. школы-конф. молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием (24-28 сентября 2012 г., г. Саратов) – Саратов: Изд-во «КУБиК», 2012. – С. 253-254.

13. Момот Т.О., Байбакова О.В., **Скиба Е.А.** Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозных материалов в зависимости от частоты перемешивания / Биокаталитические технологии и технологии возобновляемых ресурсов в интересах рационального природопользования: тезисы международной молодежной конференции, г. Кемерово, 10-12 сентября 2012 г. (под общ. ред. В.П. Юстратова). – Кемерово: ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», 2012. – С. 147-150.

14. Байбакова О.В., Момот Т.О., **Скиба Е.А.** Влияние активной кислотности на скорость сбраживания штамма *Pachysolen tannophilus* Y-1532 / Биокаталитические технологии и технологии возобновляемых ресурсов в интересах рационального природопользования: тезисы международной молодежной конференции, Ке-мерово, 10-12 сентября 2012 г. (под общ. ред. В.П. Юстратова). – Кемерово: ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический ин-ститут пищевой промыш-ленности», 2012. – С. 83-88.

15. Байбакова О.В., **Скиба Е.А.** Обоснование выбора продуцента биоэтанола для сбраживания ферментативных гидролизатов целлюлозы мискантуса / Достижения и перспективы развития биотехнологии: материалы международной научной конференции, (3-5 октября 2012г., г. Саранск). – Саранск: Типография ООО «Мордовия-Экспо», 2012. – С. 135.

16. Байбакова О.В., **Скиба Е.А.**, Будаева В.В. Последовательный и одновременный процессы осахаривания-спиртового брожения при получении биоэтанола из целлюлозы мискантуса / Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов: те-зисы докладов IV Международной конференции РХО им. Д.И. Менделеева: в 2 т. – Т. 2, г. Москва, 24-25 октября 2012. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева: ИФХЭ им. А.Н.Фрумкина РАН, 2012 г. – С. 18-20.

17. Момот Т.О., **Скиба Е.А.** Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозных материалов из плодовых оболочек овса различными ферментными комплексами / Химическая технология и биотехнология новых

материалов и продуктов: тезисы докладов IV Международной конференции РХО им. Д.И. Менделеева: в 2 т. – Т. 2, г. Москва, 24-25 октября 2012. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева: ИФХЭ им. А.Н. Фрумкина РАН, 2012 г. – С. 121-123.

18. Макарова Е.И., Будаева В.В., **Скиба Е.А.**, Кувшинова Л.А., Щербакова Т.П., Удоратина Е.В. Результаты ферментации порошковых целлюлоз из различного сырья / Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов: тезисы докладов IV Международной конференции РХО им. Д.И. Менделеева: в 2 т. – Т. 2, г. Москва, 24-25 октября 2012. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева: ИФХЭ им. А.Н. Фрумкина РАН, 2012 г. – С.112-114.

19. Макарова Е.И., Будаева В.В., **Скиба Е.А.** Влияние химической обработки мискантуса на реакционную способность к ферментации / Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов: тезисы докладов IV Международной конференции РХО им. Д.И. Менделеева: в 2 т. – Т. 1, г. Москва, 24-25 октября 2012. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева: ИФХЭ им. А.Н. Фрумкина РАН, 2012 г. – С. 54-56.

20. Будаева В.В., Макарова Е.И., **Скиба Е.А.**, Золотухин В.Н. Оценка реакционной способности лигноцеллюлозного материала и целлюлозы из плодовых оболочек овса / Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов: тезисы докладов IV Международной конференции РХО им. Д.И. Менделеева: в 2 т. – Т. 2, г. Москва, 24-25 октября 2012. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева: ИФХЭ им. А.Н. Фрумкина РАН, 2012 г. – С. 31-33.

21. Гисматулина Ю.А., Байбакова О.В., Момот Т.О., **Скиба Е.А.** Лигноцеллюлозный материал из мискантуса – перспективный субстрат / Научная дискуссия: вопросы физики, химии, биологии: материалы IV международной заочной научно-практической конференции / М.: Изд-во «Международный центр науки и образования», 2012 – С. 26-30.

22. **Скиба Е.А.** Зависимость продуктивности штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-1693 от условий брожения на ферментативном гидролизате мискантуса / Молодежь и наука на Севере: материалы докладов II Всероссийской молодежной научной конференции, 22-26 апреля 2013 г., г. Сыктывкар. – В 2 т. / Коми научный центр УрО РАН. – Сыктывкар: Редакционно-издательский отдел Коми научного центра УрО РАН, 2013. – Т 2. – С. 58-59.

23. **Скиба Е.А.**, Будаева В.В. Факторы, влияющие на осахаривание продуктов обработки плодовых оболочек овса азотной кислотой / Молодежь и наука на Севере: материалы докладов II Всероссийской молодежной научной конференции, 22-26 апреля 2013 г., г. Сыктывкар. – В 2 т. / Коми научный центр УрО РАН. – Сыктывкар: Редакционно-издательский отдел Коми научного центра УрО РАН, 2013. – Т 2. – С. 59-60.

24. Байбакова О.В., **Скиба Е.А.** Биоэтанол из технических целлюлоз, полученных комбинированным способом / Технологии и оборудование

химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (22-25 мая 2013 г., г. Бийск). – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. – С. 252-256.

25. Капатилова А.В., Одинцова Е.Л., **Скиба Е.А.** Культивирование *Pichia stipitis* Y-3263 и *Debariomyces castellii* Y-968 на синтетических углеводных средах / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (22-25 мая 2013 г., г. Бийск). – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. – С. 289-290.

26. Момот Т.О., **Скиба Е.А.** Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозных материалов из растительного недревесного сырья и спиртовое брожение полученных гидролизатов / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (22-25 мая 2013 г., г. Бийск). – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. – С. 249-252.

27. **Скиба Е.А.**, Капатилова А.В. Сбраживание ферментативного гидролизата волокнистого материала из мискантуса / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (22-25 мая 2013 г., г. Бийск). – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. – С. 293-295.

28. **Скиба Е.А.**, Кузнецова Ю.И. Масштабирование процессов ферментативного гидролиза и спиртового брожения волокнистого продукта из мискантуса / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (22-25 мая 2013 г., г. Бийск). – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. – С. 291-293.

29. **Скиба Е.А.**, Шахматов Е.Г., Удоратина Е.В. Ферментативные гидролизаты лигноцеллюлозных материалов как питательная среда для синтеза биоэтанола / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VI Всероссийской конференции с международным участием, г. Барнаул, 22-24 апреля 2014 г. / Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2014. – С. 416-418.

30. Студеникина С.А., Макарова Е.И., **Скиба Е.А.** Результаты ферментации технической целлюлозы, полученной щелочной делигнификацией мискантуса, в диапазоне pH 3,5-5,5 / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VI Всероссийской конференции с международным участием, г. Барнаул, 22-24 апреля 2014 г. / Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2014. – С. 408-410.

31. Будаева В.В., **Скиба Е.А.**, Макарова Е.И., Щербакова Т.П., Удоратина Е.В., Кучин А.В. ММР образцов целлюлоз из нетрадиционного сырья / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VI Всероссийской конференции с международным участием, г. Барнаул, 22-24 апреля 2014 г. / Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2014. – С. 24-26.

32. Студеникина С.А., **Скиба Е.А.**, Орлов С.Е., Кухленко А.А. Построение математической модели ферментолиза целлюлозы, полученной из мискантуса / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, 21-23 мая 2014 г., г. Бийск. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2014. – С. 276-279.

33. Кузнецова Ю.И., **Скиба Е.А.** Масштабирование ферментолиза лигноцеллюлозных материалов из мискантуса и плодовых оболочек овса / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, 21-23 мая 2014 г., г. Бийск. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2014. – С. 281-283.

34. Ведерникова Е.В., **Скиба Е.А.** Влияние ультразвуковых колебаний на отмывку лигноцеллюлозного материала из мискантуса от ингибитора ферментолиза / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, 21-23 мая 2014 г., г. Бийск. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2014. – С. 273-276.

35. Капатилова А.В., **Скиба Е.А.** Сбраживание ферментативного гидролизата волокнистого продукта из плодовых оболочек овса / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, 21-23 мая 2014 г., г. Бийск. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2014. – С. 279-281.

36. Удоратина Е.В., Щербакова Т.П., Кучин А.В., Будаева В.В., **Скиба Е.А.**, Сакович Г.В. Биокаталитические превращения химически модифицированной лигноцеллюлозы / Биотехнология: состояние и перспективы развития: сборник материалов VIII Московского Международного Конгресса. ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2015. – С. 380-381.

37. Казанина С.А., Байбакова О.В., **Скиба Е.А.** Получение биоэтанола из трудногидролизуемого субстрата / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и

молодых ученых с международным участием (20-22 мая 2015 г., г. Бийск) / Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. – С. 258-260.

38. Богомолова Ю.С., Байбакова О.В., **Скиба Е.А.** Влияние активной кислотности на рост продуцентов кормового белка / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (20-22 мая 2015 г., г. Бийск) / Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. – С. 268-270.

39. Степанов А.С., Павлов И.Н., Байбакова О.В., **Скиба Е.А.** Исследование зависимости эффективности ферментативного гидролиза от режимов гидротермобарической обработки целлюлозосодержащего сырья / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (20-22 мая 2015 г., г. Бийск) / Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. – С. 270-274.

40. Кошечкина Н.О., Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.** Культивирование *Medusomyces gisevii* при различных концентрациях глюкозы / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (20-22 мая 2015 г., г. Бийск) / Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. – С. 264-268.

41. **Скиба Е.А.**, Богомолова Ю.С. Биосинтез кормовых дрожжей на послеспиртовой барде из целлюлозосодержащего сырья (Biosynthesis of fodder yeasts on distillery dreg from lignocellulosic raw materials) / Биотехнология и общество в XXI веке: сборник статей по материалам Международного биотехнологического симпозиума «Bio-Asia 2015», 15-18 сентября 2015 г., г. Барнаул. – С. 272-275.

42. **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Байбакова О.В., Макарова Е.И., Павлов И.Н., Золотухин В.Н., Крюков Ю.А. Получение биоэтанола из плодовых оболочек овса на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН (Bioethanol production from oat hulls at ipcet sb ras pilot facility) / Биотехнология и общество в XXI веке: сборник статей по материалам Международного биотехнологического симпозиума «Bio-Asia 2015», 15-18 сентября 2015 г., г. Барнаул. – С. 90-93 (275-277).

43. Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.** Биотехнологические основы синтеза бактериальной целлюлозы продуцентом *Medusomyces gisevii* (Biotechnological fundamentals for synthesis of bacterial cellulose by the medusomyces gisevii producer) / Биотехнология и общество в XXI веке: сборник статей по материалам Международного биотехнологического симпозиума «Bio-Asia 2015», 15-18 сентября 2015 г., г. Барнаул. – С. 150-153.

44. Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.** Возможность получения бактериальной целлюлозы на средах из легко возобновляемого растительного сырья / Перспективы развития химических и биологических технологий в XXI веке: материалы всероссийской научной конференции с международным участием, г. Саранск, 23-25 сентября 2015 г. – С. 27.

45. Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.** Получение бактериальной целлюлозы на синтетической питательной среде в реакторе объемом 16 литров / Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке: материалы VII международной научно – технической конференции (г. Санкт-Петербург, 17-20 ноября 2015 г.) Ч. II: Материалы конференции. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – С. 297-300.

46. Гладышева Е.К. **Скиба Е.А.** Изучение влияния различных условий на синтез бактериальной целлюлозы, продуцентом *Medusomyces gisevii* / Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулева (25-29 мая 2015 г., г. Томск) / Томский политехнический университет. В 2 томах. Том 1. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – С. 277-278. ISBN 978-5-4387-0570-3.

47. Байбакова О.В., **Скиба Е.А.** Биотехнологическая переработка недревесного сырья в биоэтанол / Теория, практика и перспективы применения биологически активных соединений в сельском хозяйстве: сборник материалов XI Международной научно-практической конференции daRostim 2015, Сыктывкар, 2015. – С. 19-21. ISBN 978-5-89606-541-8.

48. Будаева В.В., **Скиба Е.А.**, Байбакова О.В., Павлов И.Н., Макарова Е.И., Крюков Ю.А., Сакович Г.В. Опыт масштабирования полного цикла получения этанола из недревесного сырья/ Химия и технология растительных веществ: тезисы докладов IX Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых, 28-30 сентября 2015 г., Сыктывкар-Москва: Институт химии Коми НЦ УрО РАН, 2015. – С. 217. ISBN 978-5-89606-542-5.

49. **Скиба Е.А.**, Павлов И.Н. Изучение фракционного разделения на бражной колонне биоэтанола из плодовых оболочек овса / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 9-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, 18-20 мая 2016 г., г. Бийск. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2016. – С. 367-371.

50. Таранова Е.С., Павлов И.Н., **Скиба Е.А.**, Будаева В.В. Исследование режимов гидротропной варки целлюлозы из мискантуса в универсальной термобарической установке / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 9-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, 18-20 мая 2016 г., г. Бийск. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2016. – С. 396-400.

51. Алешина Л.А., Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.**, Будаева В.В. Исследование структуры бактериальной целлюлозы методом рентгеноструктурного анализа / Структура и физико-химические свойства целлюлоз и нанокompозитов на их основе: материалы 2-ой Всероссийской научно-практической интернет-конференции с международным участием, 6-7 октября 2016 г., г. Петрозаводск. – Петрозаводск: Изд-во Петрозав. гос. ун-та, 2016. – С. 132-136.

52. **Скиба Е.А.**, Павлов И.Н., Байбакова О.В., Будаева В.В. Качество этанола, полученного из плодовых оболочек овса на опытном производстве / Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии: Материалы XXX Международной научно-технической конференции «Реактив-2016», г. Уфа, 14-16 ноября 2016 г.– Уфа: Издательство «Реактив», 2016. – С. 192-193. ISBN 978-5-9905793-2-3.

53. Тарабанько В.Е., Кайгородов К.Л., **Скиба Е.А.**, Челбина Ю.В., Байбакова О.В. Новый процесс конверсии сосновой древесины в ванилин, глюкозу и этанол / XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: тезисы докладов в 5 томах. Уральское отделение Российской академии наук. – 2016. – С. 81.

54. Тарабанько В.Е., Кайгородов К.Л., **Скиба Е.А.**, Черняк М.Ю., Челбина Ю.В., Байбакова О.В., Тарабанько Н.В., Дубынин Е.В. Последовательный процесс каталитического окисления и ферментативного гидролиза древесины сосны в ванилин и глюкозу / Лесной и химический комплексы - проблемы и решения: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции. – 2016. – С. 235-238.

55. **Скиба Е.А.**, Земнухова Л.А., Бычин Н.В., Панасенко А.Е., Будаева В.В. Исследование твердого остатка после ферментативного гидролиза шелухи овса методами рентгенофазового анализа и ИК-спектроскопии/ Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VII Всероссийской конференции с международным участием, 25-27 апреля 2017 г., г. Барнаул. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2017. – С. 397-398.

56. Тарабанько В.Е., Кайгородов К.Л., **Скиба Е.А.**, Байбакова О.В., Челбина Ю.В., Тарабанько Н.В. Новый процесс переработки хвойной древесины в ванилин, глюкозу и этанол / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VII Всероссийской конференции с международным участием, 25-27 апреля 2017 г., г. Барнаул. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2017. – С. 298-300.

57. Лубянский В.Г., Жариков А.Н., Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Семенова Е.Н. Экспериментальное исследование возможности применения бактериальной целлюлозы в хирургии / Альманах Института хирургии им. А.В. Вишневского: материалы Национального хирургического конгресса совместного с 20 юбилейным съездом РОЭХ, 4-7 апреля 2017 г., г. Москва. – С. 226-227.

58. **Скиба Е.А.** Скрининг модельных систем для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы / Технологии и оборудование химической,

биотехнологической и пищевой промышленности: материалы X Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (24-26 мая 2017 г., г. Бийск), Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2017. – С. 332-336. ISBN 978-5-9257-0312-0.

59. Будаева В. В., **Скиба Е.А.**, Гладышева Е.К., Кашеева Е.И., Гисматулина Ю.А., Павлов И.Н., Байбакова О.В., Корчагина А.А., Миронова Г.Ф., Сакович Г.В. Бактериальная наноцеллюлоза: результаты собственных исследований / От биопродуктов к биоэкономике: материалы II Межрегиональной научно-практической конференции (с международным участием) (12-13 апреля 2018 г.) / под ред. А.Н. Лукьянова; Алт. гос. техн. ун-т им. И.И. Ползунова. – Барнаул: Изд-во АлтГТУ, 2018. – С. 18-22.

60. Миронова Г.Ф., Кашеева Е.И., **Скиба Е.А.**, Кухленко А.А. Оптимизация состава мультиэнзимной композиции для получения питательных сред из целлюлозосодержащего сырья / Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы Международного форума, 23-25 мая 2018, Москва. – М.: ООО «РЭД ГРУПП». – С. 747-748.

Mironova G.F., Kashcheyeva E.I., **Skiba E.A.**, Kukhlenko A.A. Optimizing the composition of multi-enzyme cocktail to prepare nutrient broths from cellulosic feedstocks / Biotechnology: state of the art and perspectives: the proceedings of International forum, May 23-25, 2018, Moscow. – Moscow: LLC «RED GROUP». – P. 748-749. ISBN 978-5-9909118-0-2-6. ISSN: 2312-640X

61. Голубев Д.С., Бычин Н.В., **Скиба Е.А.** Разработка методики подготовки бактериальной целлюлозы к растровой электронной микроскопии/ Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы XI Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – г. Бийск, 23-25 мая 2018 г. – Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2018. – С. 386-390.

62. Голубев Д.С., Бычин Н.В., **Скиба Е.А.** Разработка методики определения толщины гидратированной бактериальной целлюлозы / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы XI Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – г. Бийск, 23-25 мая 2018 г. – Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2018. – С. 390-392.

63. Миронова Г.Ф., Кашеева Е.И., **Скиба Е.А.**, Кухленко А.А. Оптимизация состава мультиэнзимной композиции для получения питательных сред из целлюлозосодержащего сырья / Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы Международного форума, 23-25 мая 2018, Москва. – М.: ООО «РЭД ГРУПП». – С. 748-749.

Mironova G.F., Kashcheyeva E.I., **Skiba E.A.**, Kukhlenko A.A. Optimizing the composition of multi-enzyme cocktail to prepare nutrient broths from cellulosic feedstocks / Biotechnology: state of the art and perspectives: the proceedings of

International forum, May 23-25, 2018, Moscow. – Moscow: LLC «RED GROUP». – P. 748-749.

64. Голубев Д.С., **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Шавыркина Н.А., Гладышева Е.К. Исследование культивирования бактериальной целлюлозы на средах с антибиотиками / Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы Международного форума, 25-27 февраля 2019, Москва. – М.: ООО «РЭД ГРУПП». – С. 88-90.

Golubev D.S., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Shavyrkina N.A., Gladysheva E.K. A study of cultivation of bacterial cellulose in media with antibiotics / Biotechnology: state of the art and perspectives: the proceedings of International forum, February 25-27, 2019, Moscow. – Moscow: LLC «RED GROUP». P. 88-90.

65. Ситникова А.Е., Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Шавыркина Н.А. Влияние аэрации на эффективность выращивания бактериальной наноцеллюлозы / Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы Международного форума, 25-27 февраля 2019, Москва. – М.: ООО «РЭД ГРУПП». – С. 76-77.

A.E. Sitnikova, E.K. Gladysheva, **E.A. Skiba**, V.V. Budaeva, N.A. Shavyrkina Aeration effect on cultivation efficiency of bacterial nanocellulose / Biotechnology: state of the art and perspectives: the proceedings of International congress, February 25-27, 2019, Moscow. – Moscow: LLC «RED GROUP». – P. 76-77.

66. Байбакова О.В., **Скиба Е.А.**, Будаева В.В. Разработка технологии получения биоэтанола из мискантуса / Химия и технология растительных веществ: тезисы докладов XI Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых, 27-31 мая 2019 г., Сыктывкар: Институт химии Коми НЦ УрО РАН, 2019. – С. 46.

67. Кащеева Е.И., **Скиба Е.А.**, Золотухин В.Н., Будаева В.В. Исследование энергоэффективной химической трансформации шелухи овса в субстраты для ферментативного гидролиза / Химия и технология растительных веществ: тезисы докладов XI Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых, 27-31 мая 2019 г., Сыктывкар: Институт химии Коми НЦ УрО РАН, 2019. – С. 118.

68. Будаева В.В., Миронова Г.Ф., Кащеева Е.И., Гладышева Е.К., Гисматулина Ю.А., Жариков А.Н., **Скиба Е.А.** Фундаментальные свойства бактериальной наноцеллюлозы / Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания: тез. Всероссийской научной конференции с международным участием. Иркутск, 4–7 июня 2019 г. / [отв. ред. В. К. Войников]; СИФИБР СО РАН. – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2019. – С. 177-179.

69. Ситникова А.Е., Шавыркина Н.А., Гладышева Е.К., **Скиба Е.А.**, Бычин Н.В. Изучение толщины и прочности образцов БЦ в зависимости от продолжительности культивирования *Medusomyces gisevii* SA-12 / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы XII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – г. Бийск, 22-24

мая 2019 г. – Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2019. – С. 417-421.

70. Голубев Д.С., Шавыркина Н.А., **Скиба Е.А.**, Бычин Н.В. Влияние способа высушивания на механические характеристики бактериальной целлюлозы / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы XII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – г. Бийск, 22-24 мая 2019 г. – Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2019. – С. 415-417.

71. Миронова Г.Ф., **Скиба Е.А.** Способы интенсификации технологии биоэтанола из шелухи овса / Новые каталитические процессы глубокой переработки углеводородного сырья и биомассы. Третья школа молодых учёных [Электронный ресурс]: сборник тезисов докладов, 1–3 октября 2019, Красноярск / Институт катализа СО РАН – Новосибирск: ИК СО РАН, 2019. – С. 13.

72. Будаева В.В., Кашеева Е.И., **Скиба Е.А.**, Гисматулина Ю.А. Химическая и биотехнологическая переработка недревесного сырья / Новые каталитические процессы глубокой переработки углеводородного сырья и биомассы. Третья школа молодых учёных [Электронный ресурс]: сборник тезисов докладов, 1–3 октября 2019, Красноярск / Институт катализа СО РАН – Новосибирск: ИК СО РАН, 2019. – С. 26.

73. Кашеева Е.И., **Скиба Е.А.**, Золотухин В.Н., Будаева В.В. Рециклизация раствора азотной кислоты в предварительной обработке шелухи овса / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VIII Всероссийской конференции с международным участием / под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. 5-9 октября 2020 г. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2020. – С. 300-302.

74. **Скиба Е.А.**, Овчинникова Е.В., Миронова Г.Ф., Банзаракцаева С.П., Будаева В.В., Чумаченко В.А., Кашеева Е.И. Влияние способа предобработки шелухи овса на качество этанола, предназначенного для его дегидратации в этилен / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VIII Всероссийской конференции с международным участием / под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. 5-9 октября 2020 г. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2020. – С. 296-297.

75. Голубев Д.С., Шавыркина Н.А., **Скиба Е.А.**, Гладышева Е.К. Исследование возможности биосинтеза бактериальной целлюлозы индивидуальными штаммами на средах с ферментативными гидролизатами / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (20-22 мая 2020 года, г. Бийск). – Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2020. – С. 241-244.

76. **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Гладышева Е.К., Шавыркина Н.А., Павлов И.Н., Голубев Д.С., Миронова Г.Ф., Кашеева Е.И., Гисматулина Ю.А.,

Корчагина А.А., Сакович Г.В. Основные технологические стадии получения бактериальной наноцеллюлозы из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 / Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы Международного форума, 28-30 октября 2020, Москва. – М.: ООО «Экспо-Биохим-Технологии». – С. 290-291.

Skiba E.A., Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Shavyrkina N.A., Pavlov I.N., Golubev D.S., Mironova G.F., Kashcheyeva E.I., Gismatulina Yu.A., Korchagina A.A., Sakovich G.V. Main technological stages of bacterial cellulose synthesis from easily renewable cellulosic feedstocks by *Medusomyces gisevii* SA-12 symbiotic culture / Biotechnology: state of the art and perspectives: the proceedings of International congress, 28-30 October, 2020, Moscow. – Moscow: LTD «Expo-Biohim-Tehnologies». – P. 291-293.

77. Будаева В.В., **Скиба Е.А.**, Гладышева Е.К., Шавыркина Н.А., Павлов И.Н., Миронова Г.Ф., Кащеева Е.И., Гисматулина Ю.А., Корчагина А.А., Ситникова А.Е., Голубев Д.С., Шилов А.И., Кузнецов П.С., Сакович Г.В. Инжиниринг стадии биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы с помощью *Medusomyces gisevii* SA-12 / Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы Международного форума, 28-30 октября 2020, Москва. – М.: ООО «Экспо-Биохим-Технологии». – С. 272.

Budaeva V.V., **Skiba E.A.**, Gladysheva E.K., Shavyrkina N.A., Pavlov I.N., Mironova G.F., Kashcheyeva E.I., Gismatulina Yu.A., Korchagina A.A., Sitnikova A.E., Golubev D.S., Shilov A.I., Kuznetsov P.S., Sakovich G.V. Engineering of biosynthesis stage of bacterial nanocellulose using *Medusomyces gisevii* SA-12 / Biotechnology: state of the art and perspectives: the proceedings of International congress, 28-30 October, 2020, Moscow. – Moscow: LTD «Expo-Biohim-Tehnologies». – P. 273.

78. Миронова Г.Ф., **Скиба Е.А.** Особенности биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы индивидуальными штаммами *Komagataeibacter xylinus* на питательных средах из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья // Актуальная биотехнология. – 2021. – № 1 (35). – С. 300-303. ISSN 2304-4691. <https://actbio.ru/conference/proceedings>.

79. Алешина Л.А., Гладышева Е.К., Будаева В.В., **Скиба Е.А.**, Сакович Г.В. Структурные характеристики бактериальной наноцеллюлозы, синтезированной продуцентом *Komagataeibacter xylinus* В-12431 на ферментативных гидролизатах мискантуса и шелухи овса // Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни: материалы IV Международная научная конференция, г. Красноярск, 10–13 октября 2021 г. / отв. за вып. : А. Г. Суковатый. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2021. – С. 49-50. ISBN: 978-5-7638-4564-8.

80. Химическая и биотехнологическая переработка недревесного сырья в высокостойкие продукты / В.В. Будаева, **Е.А. Скиба**, Ю.А. Гисматулина [и др.] // Фундаментальные исследования и практические разработки в области технической химии: к 20-летию Института проблем химико-энергетических

технологий СО РАН: монография / под ред. В.В. Малыгина. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2021. – Гл. 8. – С. 220-266. DOI 10/5398/9785925703335_8. ISBN 978-5-9257-0333-5.

Материалы конференций и тезисы докладов (международные издательства)

81. Будаева В.В., Макарова Е.И., **Скиба Е.А.**, Павлов И.Н., Сакович Г.В., Кувшинова Л.А., Щербакова Т.П. Химическая, механохимическая и ферментативная деструкция целлюлозосодержащего сырья для получения ценных продуктов / Альтернативные источники сырья и топлива: тезисы докладов IV Международной научно-технической конференции «АИСТ – 2013», Минск, 28-30 мая 2013 г. // Под ред. В.Е. Агабекова [и др.]. – Минск: Изд-во института химии новых материалов НАН Беларуси, 2013. – С. 73.

82. **Скиба Е.А.**, Будаева В.В., Золотухин В.Н., Павлов И.Н. Биоэтанол из недревесных целлюлоз, полученных азотнокислым способом / Альтернативные источники сырья и топлива: тезисы докладов IV Международной научно-технической конференции «АИСТ – 2013», Минск, 28-30 мая 2013 г. // Под ред. В.Е. Агабекова [и др.]. – Минск: Изд-во института химии новых материалов НАН Беларуси, 2013. – С. 76.

83. Udoratina E.V., Sherbakova T.P., Kuchin A.V., Budaeva V.V., **Skiba E.A.**, Sakovich G.V. Chemical, Mechanochemical and enzymatic destruction of lignocellulose to obtain valuable products / Catalysis for Renewable Sources: fuel, energy, chemicals: book of abstracts of Second International conference, Lund, Sweden, July 22-28, 2013. – p. 152-153.

84. Байбакова О.В., **Скиба Е.А.** Получение биоэтанола из мискантуса / Альтернативные источники сырья и топлива: сборник докладов V Международной научно-технической конференции «АИСТ-2015», Минск, 26-28 мая 2015 г. – Минск: Изд-во института химии новых материалов НАН Беларуси, 2015. – С. 54. ISBN 978-985-530-075-6.

85. Baybakova O.V., **Skiba E.A.**, Budaeva V.V., Vasilishin M.S., Makarova E.I., Ovchinnikova E.V., Vernikovskaya N.V., Chumachenko V.A. Production of bio-ethanol from cellulose-containing agricultural residues on the pilot setup / Chemical Reactors: abstracts of the XXII International conference (CHEMREACTOR-22), London, United Kingdom, September 19-23, 2016. – P. 188. ISBN 978-5-906376-14-5.

86. **Скиба Е.А.**, Байбакова О.В., Макарова Е.И., Василишин М.С., Павлов И.Н., Овчинникова Е.В., Банзаракцаева С.П., Чумаченко В.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Масштабирование технологии получения биоэтанола из плодовых оболочек овса с последующим каталитическим превращением в этилен / Альтернативные источники сырья и топлива: тезисы докладов VI Международной научно-технической конференции «АИСТ-2017», 30 мая-1 июня 2017 г., г. Минск, Беларусь. – Минск: Изд-во «Белорусская наука», 2017. – С. 50.

87. **E.A. Skiba**, V.V. Budaeva, E.V. Ovchinnikova, E. K. Gladysheva, I.N. Pavlov, G.V. Sakovich Production technology of bacterial cellulose from oat hulls / Chemical Reactors: abstracts of the XXIII International conference (CHEMREACTOR-23), Ghent, Belgium, November 5-9, 2018. – P. 374-375.

88. E.V. Ovchinnikova, S.P. Banzaraktsaeva, V. Yu. Kruglyakov, Chumachenko V.A., **E.A. Skiba**, O.V. Baibakova, V.V. Budaeva, G.V. Sakovich Applied aspects of processing the oat-hullsethanol to bioethylene: effect of impurities / Chemical Reactors: abstracts of the XXIII International conference (CHEMREACTOR-23), Ghent, Belgium, November 5-9, 2018. – P. 350-351.

89. Миронова Г.Ф., **Скиба Е.А.** Повышение эффективности процесса получения биоэтанола из шелухи овса // Химия и химическая технология переработки растительного сырья: материалы докладов Международной научно-технической конференции. – Минск: БГТУ, 2018. – С. 87-91.

90. Миронова Г.Ф., **Скиба Е.А.** Скрининг штаммов спиртовых дрожжей для получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья / Альтернативные источники сырья и топлива: тезисы докладов VII Международной научно-технической конференции «АИСТ-2019», 28-30 мая 2019 г., Минск: Институт химии новых материалов НАН Беларуси, 2019. – С. 105.

91. Budaeva V.V., Mironova G.F., Gismatulina Y.A., **Skiba E.A.**, Gladysheva E.K., Kashcheyeva E.I., Baibakova O.V., Korchagina A.A., Golubev D.S., Bychin N.V., Sakovich G.V. Biosynthesis of BNC and BNC-based nitrocellulose / 4th International Symposium on Bacterial Nano-Cellulose. – Porto, Portugal, 3-4th October 2019

92. **Скиба Е.А.** Получение бактериальной наноцеллюлозы из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья с помощью индивидуальных штаммов *Komagataeibacter xylinus* / Тезисы докладов VIII Международной научно-технической конференции Альтернативные источники сырья и топлива (АИСТ-2021), 12-14 октября 2021 г., г. Минск, Беларусь. – С. 25-28.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР. СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ, БАЗИРУЮЩИХСЯ НА ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЮЩЕМ СЫРЬЕ

1.1 Классификация целлюлозосодержащего сырья

Согласно Справочнику химика (первое издание вышло в 1944 г и после этого несколько раз дополнялось и переиздавалось), растительное сырьё в целом делят на гексозансодержащее (целлюлозосодержащее, крахмалосодержащее, сахаросодержащее (имеется в виду сахароза), пентозансодержащее, масличное, эфиромасличное, канифольсодержащее, таннинсодержащее. Целлюлозосодержащее сырьё делят на длинноволокнистое (применяемое для производства текстильных изделий: хлопок и лубяные промышленные культуры, такие как лён, конопля, кенаф и джут) и коротковолокнистое (применяемое для производства бумаги) [[Новый справочник химика...2006](#)]. Для биотехнологической переработки подходит только коротковолокнистое сырьё.

Хорошую классификацию индустриального целлюлозосодержащего сырья для биотехнологической переработки предложил Забед [[Zabed, 2016](#)], согласно ей всё сырьё можно разделить на 4 большие группы:

- а) биомасса специализированных растений (энергетические, то есть быстрорастущие, культуры и водный гиацинт);
- б) сельскохозяйственные отходы (солома злаков, листья, шелуха, жмых);
- в) древесная биомасса и отходы лесопереработки (древесина хвойных и лиственных пород, опилки, лесосечные отходы, кора);
- г) целлюлозная фракция твердых бытовых отходов (ТБО).

Все перечисленные виды сырья во всем мире производятся в промышленных масштабах, не конкурируют с пищевым сырьём, не снижают производства волокнистых культур [[Sims, 2010](#)].

Биомасса специализированных растений

Энергетические культуры считаются наиболее перспективным целлюлозосодержащим сырьём. Их делят на C_3 или C_4 растения (они отличаются путем связывания углерода, первым продуктом которого могут быть трёхуглеродная 3-фосфоглицериновая кислота (у C_3 растений) или четырёхуглеродная щавелевоуксусная кислота (у C_4 растений). К энергетическим культурам относят мискантус (*Miscanthus spp.*, C_4), просо (*Panicum virgatum*, C_4), тростниковую канареечную траву (*Phalaris arundinacea*, C_3), гигантский тростник (*Arundo donax*, C_3) и люцерну (*Medicago sativa*, C_3). От другого целлюлозосодержащего сырья энергетические культуры отличаются повышенной эффективностью фотосинтеза, благодаря чему их продуктивность по биомассе в два раза превышает древесное и сельскохозяйственное сырьё в регионах с теплым и умеренным климатом [Lewandowski, 2013]. Урожай биомассы составляет 0,9–37 т/га. Сельскохозяйственное возделывание многолетних энергетических культур упрощено, кроме того, они отличаются высоким содержанием целлюлозы [Lewandowski, 2013; van der Weijde, 2013; 2012; Rengsirikul, 2013; Будаева. 2011].

Водный гиацинт (*Eichhornia crassipes*) – энергетическое водное растение, произрастает на поверхности водоёмов в странах с тропическим и субтропическим климатом, является ядовитым сорняком [Ganguly, 2012; Gaurav, 2020]. Высокие скорости роста позволяют использовать его для очистки сточных вод (фиторемедиации) даже в условиях России [Горбунова, 2009; Минаева, 2009; Холодова, 2019]. Преимуществами использования водного гиацинта являются: экономически выгодное использование сорняка, обилие произрастания в своей климатической зоне, быстрый рост и высокая продуктивность биомассы. Урожайность водного гиацинта составляет до 39,5 т/га в год [Kumar, 2009; Aswathy, 2010; Lay, 2016].

Сельскохозяйственные отходы

Отходы сельского хозяйства, не имеющие пищевой ценности представляют приоритетный интерес. Они глобально распространены, доступны; их переработка одновременно решает экологические вопросы и позволяет получить продукты с высокой добавочной стоимостью из бросового сырья; это однолетнее сырьё, имеющий короткий период от посева до сбора урожая; производство биотехнологической продукции не будет зависеть от древесной биомассы и влиять на обезлесение земного шара. Глобальные пожнивные остатки оцениваются в 2802 млн. тонн в год для зерновых культур и 3758 млн. тонн в год для основных 27 продовольственных культур [Limayem, 2012; Kim, 2004; Kreith, 2013]. Прогнозируется, что в ближайшем будущем это сырьё станет основным целлюлозосодержащим сырьём для биотехнологической переработки [Mussatto, 2010; Somerville, 2010; Jordan, 2012; Ravindran, 2016; Velásquez-Riaño, 2017].

Основными валовыми мировыми сельскохозяйственными культурами являются рис, пшеница, кукуруза и сахарный тростник, поэтому отходы именно этих культур имеют наибольшее технологическое значение.

При выращивании риса целлюлозосодержащими отходами являются солома, листья и шелуха, их общий объём составляет 731 млн. тонн в год [Saini, 2015]. При уборке пшеницы остается в количестве 10,4-1,2 тонны с гектара. Очень перспективны отходы кукурузы: это стебли, листья, початки, в западной литературе всё это вместе называется соломой; отходов образуется 1,0 кг/кг кукурузного зерна или 1,6 т/га [Kim, 2004]. Багасса — это целлюлозный остаток, другими словами, жом, получаемый при переработке сахарного тростника. Расчетный мировой урожай багассы составляет 317–380 млн. тонн в год [Sánchez, 2009; de Souza, 2012]. Большая часть рисовой и пшеничной соломы производится в Азии, а кукурузная солома и жмых сахарного тростника в основном производятся в Америке [Zabed, 2016].

В России в больших объёмах возделываются пшеница (преимущественно мягких сортов), ячмень, кукуруза, овёс, по покритосеменному овсу Россия

занимает первое место в мире [United..., 21.03.2021]. Солому нельзя назвать высокотехнологичным сырьём, так как при сборе она загрязняется землей, от которой достаточно сложно избавиться в силу природы сырья. Гораздо перспективнее использование шелухи или жома, так как на предварительном этапе (с целью производства пищевых продуктов) это сырьё уже было очищено.

Древесная биомасса

Древесная биомасса делится на лиственную и хвойную. Отходы включают опилки, обрезки, кору, щепу, ветки [Limayem, 2012]. Общая площадь лесов планеты составляет 3,44 млрд. га с запасом древесины 350 млрд. м³ [Новый справочник химика, 2006]. Лидерами по запасам древесины являются Бразилия, Россия и США, далее следуют Канада, Китай, вместе они составляют более половины общей площади лесов мира [Hadar, 2013]. На долю России приходится 22 % мировой площади лесов, из них 79,6 % занимают хвойные леса [Новый справочник химика, 2006]. Хвойные породы относят к вечнозеленым, они представлены сосной, кедром, елью, кипарисом, пихтой, болиголовом, они обладают меньшей плотностью и более быстрым ростом. Лиственные породы в основном встречаются в северном полушарии, преимущественно они представлены ивой, дубом, тополем, осиной, березой [Zabed, 2016]. Преимуществами использования древесной биомассы является высокая плотность биомассы, что делает транспортировку экономичной и гибкое время сбора урожая [Galbe, 2002; Gonzalez, 2011; Zhu, 2011].

Твердые бытовые отходы

ТБО – это целлюлозные материалы, потенциально пригодны для повторного использования. ТБО подразделяют на жилые бытовые отходы (мусор) и промышленные (пищевые отходы, шлам бумажных фабрик). Это глобальные отходы. Расчетное общее мировое производство ТБО составляло $1,3 \times 10^9$ тонн в 1990 г., оно почти удвоилось через 10 лет, и составило $2,3 \times 10^9$

тонн. Таким образом, объём ТБО составил 20,7 млн. т/год для городской территории с населением 217 млн. человек [Hadar, 2013]. Есть примеры использования органической фракции ТБО для производства этанола, но это нежелательное сырьё из-за нестабильности состава и большого количества загрязнений [Schmitt, 2012]. Тем не менее, технологии переработки ТБО перспективны для управления отходами и для развития энергетики [Li, 2012; Prasad, 2007; Buah, 2007; Харина, 2015; Brown, 2007].

1.2 Химический состав целлюлозосодержащего сырья

Лигноцеллюлозная биомасса представляет собой гетерогенную полимерную композитную матрицу, которая состоит из полисахаридов (целлюлозы и гемицеллюлозы), лигнина, экстрактивных и зольных веществ [Kim, 2016; Bhatia, 2020]. Схематически строение целлюлозосодержащего сырья приведено на рис. 1.1. Полисахариды составляют примерно 2/3 от массы сырья в пересчёте на сухое вещество. Содержание в сырье полисахаридов и лигнина сильно варьирует в зависимости от ботанических особенностей растений и условий их произрастания (табл. 1.1).

Композитная матрица чрезвычайно устойчива, так как целлюлоза и гемицеллюлозы прочно связаны с лигнином ковалентными и водородными связями [Limayem, 2012]. Прочности матрицы способствуют гетерогенность структуры, кристалличность целлюлозы, малая площадь поверхности, повышенная устойчивость лигнина, биологической функцией которого является придание жесткости растительной биомассы и защита её от микроорганизмов и физико-химических воздействий внешней среды [Mosier, 2005, Chang, 2000]. Таким образом, целлюлозосодержащее сырьё – это крайне сложный объект.

Целлюло́за, клетча́тка (фр. cellulose от лат. cellula — «клетка») — это линейные цепочки из остатков β -глюкозы, соединённых β -(1→4) гликозидными связями. Ансельм Пайен, французский химик в 1838 году обнаружил и

Таблица 1.1 – Химический состав целлюлозосодержащего сырья

Сырьевой источник	Массовая доля компонента, %			Ссылка
	Ц	Г	Л	
<i>Биомасса специализированных растений</i>				
мискантус	38-50	18-24	18-25	Brosse, 2010
эспарто	33-38	27-32	17-19	Sánchez, 2009
люцерна	49	7	17	Chandel, 2007
просо	42-48	29-30	1	Mohammed, 2015
тростник	42	29	21	Крылов, 1993; Шарков, 1976
сахарный тростник целый	25	17	12	Saxena, 2009
слоновья трава	22	24	24	Sánchez, 2009
бермудская трава	25	36	6	Prasad, 2007
сено	25-40	25-50	10-30	Saini, 2015
водный гиацинт	18-19	48-49	3-4	Kumar, 2009; Nigam, 2002
<i>Сельскохозяйственные отходы</i>				
солома риса	28-36	23-28	12-14	Saini, 2015
шелуха риса	25-35	18-21	26-31	Ludueña, 2011
солома пшеницы	33-38	26-32	17-19	Saini, 2015
стебли кукурузы	38-40	24-26	7-19	Saini, 2015; Zhu, 2005
початки кукурузы	42-45	35-39	14-15	Prasad, 2007; Kuhad, 1993
багасса (жом сахарного тростника)	42-48	19-25	20-42	Saini, 2015, Kim, 2011
солома ячменя	31-45	27-38	14-19	Saini, 2015
солома ржи	33-35	27-30	16-19	Sánchez, 2009
солома овса	31-37	27-38	16-19	Sánchez, 2009
шелуха овса	25-31	21-39	18-22	Debiagi, 2020; Chopda, 2020
бамбук	26-43	15-26	21-31	Sánchez, 2009
кокосовая койра	36-43	0,3	41-45	Reddy, 2005
кофейная шелуха	43	7	9	Gouvea, 2009
солома льна-межеумка	49-56	10-22	17-23	Гисматулина, 2016
<i>Лубяные культуры и листовые волокна</i>				
хлопковый пух (линт)	80-90	5-20	0	Prasad, 2007
стебли хлопчатника (гуза-пая)	37-40	18-19	21-25	Крылов, 1993; Шарков, 1976; Keshav, 2016
волокно кенафа	31-39	22-23	15-19	Sánchez, 2009
волокно джута	45-53	18-21	21-26	Sánchez, 2009
волокно льна-долгунца	78	6	5	Buranov, 2008
костра льна-долгунца	34-54	13-26	23-30	Buranov, 2008; Lugovoy, 2021
конопля целая	32-51	11-25	13-29	Ji, 2021
волокно конопли	58	5	16	Singh, 2018
костра конопли	43	20	24	Singh, 2018
волокна листьев ананаса	70-82	18-19	1-5	Reddy, 2005
листовое волокно агавы	78	4-8	13	Sánchez, 2009
сизаль из листового волокна агавы	43-56	21-24	7-9	Sánchez, 2009

листовое волокно абаки (манильская конопля)	61	17	9	Sánchez, 2009
<i>Древесная биомасса, глобально</i>				
хвойная древесина	35-40	27-30	25-30	McKendry, 2002
лиственная древесина	45-50	20-25	20-25	McKendry, 2002
кора хвойных пород	18-38	15-33	30-60	Saini, 2015
кора лиственных пород	22-40	20-38	30-55	Saini, 2015
тополь	48-50	27-29	18-19	Mosier, 2005; Olsson, 1996
<i>Древесная биомасса, Россия</i>				
сосна	43-52	23-25	27-28	Новый справочник химика, 2006
ель	42-52	23-26	26-28	
береза	41-50	30-31	19-25	
осина	44-52	22-24	18-19	
тополь	45-51	27-33	18-23	
<i>Твердые бытовые отходы</i>				
общие ТБО	33-49	9-16	10-14	Li, 2012; Saxena, 2009
картон	57	10	21	Schmitt, 2012
офисная бумага	69	13	11	Mosier, 2005
газета	40-55	25-40	18-30	Howard, 2004
шлам при производстве целлюлозы	60-70	10-20	5-10	Prasad, 2007
пищевые отходы	52-57	6-7	11-12	Schmitt, 2012
Примечание: Ц – целлюлоза, Г – гемицеллюлозы, Л – лигнин				

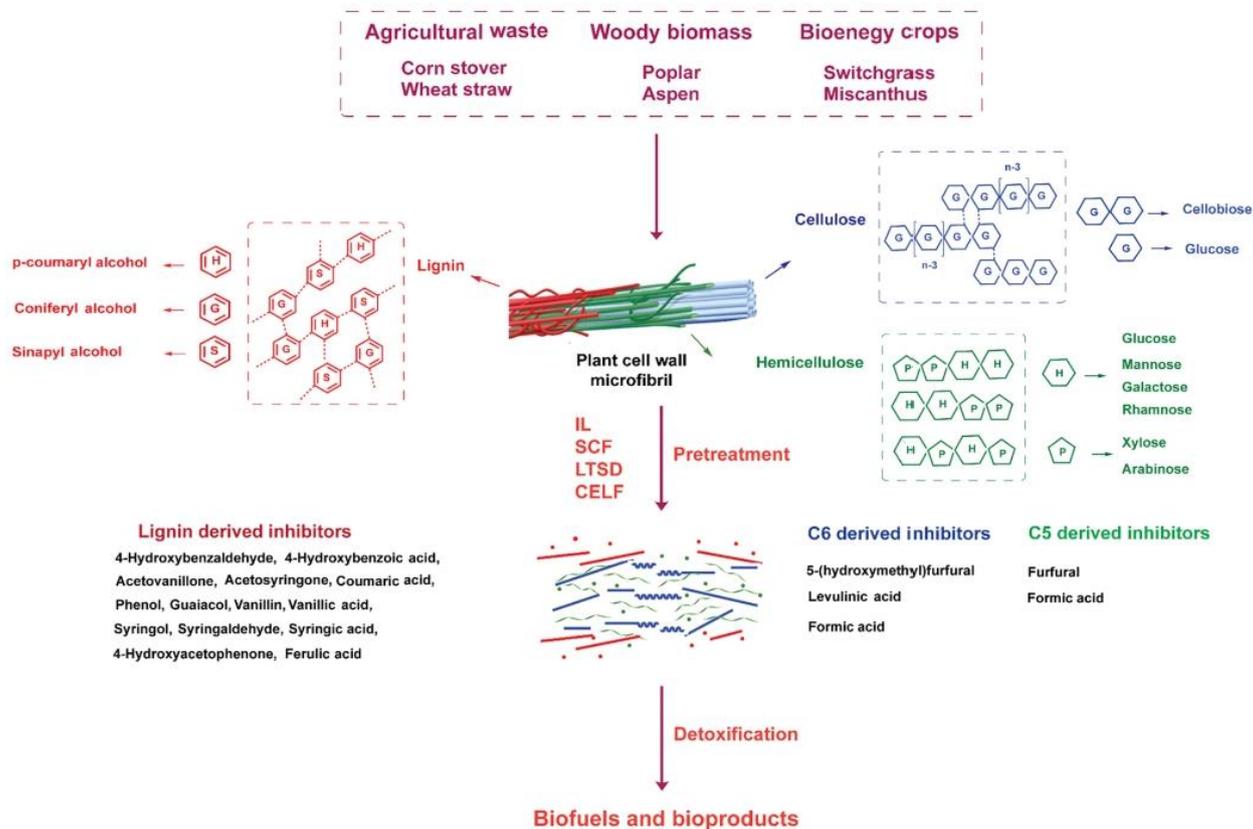


Рисунок 1.1 – Строение целлюлозосодержащего сырья [Bhatia, 2020]

описал целлюлозу [Никитин, 1962]. Общее количество единиц глюкозы в молекуле целлюлозы колеблется от нескольких сотен до 10 000-12 000 [Zhao, 2012]. Между соседними молекулами целлюлозы устанавливается множество водородных связей, что приводит к образованию кристаллической матричной структуры. В микрофибриллах целлюлозы чередуются аморфные и кристаллические участки, которые придают целлюлозе жесткость. Такая специфическая структура целлюлозы объясняет ее нерастворимость в воде и устойчивость к деполимеризации [Mosier, 2005].

Гемицеллюлозы – это гетерополимер нерегулярного строения, в его состав входят и гексозы и пентозы, цепочки короче, чем у целлюлозы, 50-300 мономерных звеньев, могут быть и линейными и сильно разветвленными. Основные гексозы – это β -D-глюкоза, α -D-галактоза и β -D-манноза, основные пентозы – β -D-ксилоза и α -L-арабиноза, но в меньших количествах могут встречаться и другие: L-рамноза, α -L-фруктоза и т.д. Кроме того, типичными для молекул гемицеллюлоз являются урсоловые кислоты: α -D-глюкуроновая, α -D-галактуроновая и α -D-4-O-метилгалактуроновая кислота [Limayem, 2012; Saxena, 2009; Ravindran, 2016]. Его основная цепь в основном состоит из ксилана [Girio, 2010]. Общеизвестными гемицеллюлозами являются ксиланы (в которых через связи $\beta \rightarrow 1, 4$, связаны D-ксилоза, около 90% и L-арабиноза, около 10%) и глюкоманнаны. Ксиланы являются основными гемицеллюлозами в лиственной древесине, лесных отходах, сельскохозяйственных отходах, городских и промышленных отходах, а глюкоманнаны – основными гемицеллюлозами в хвойной древесине [Limayem, 2012; Girio, 2010].

Лигнин – это сильноразветвленный ароматический одноядерный полимер, элементарным звеном является фенилпропановое звено [Zabed, 2016]. Основными являются три фенилпропионовых спирта, это п-кумаровый, кониферилловый и синаповый спирты. Древесная биомасса в основном состоит из полимеров целлюлозы и лигнина. Самый высокий уровень лигнина встречается в коре хвойных пород (30–60%, основной спирт – кониферилловый, это так называемые гваяцильные лигнины), за ней следует

кора лиственных пород (30–55% лигнина, состоящего из кониферилового и синапового спиртов), затем травы (10-30 % лигнина, состоящего из п-кумарового, кониферилового и синапового спиртов) и сельскохозяйственные отходы (3–15% лигнина) [Limayem, 2012; Новый справочник химика, 2006]. В растениях с коротким периодом вегетации мало лигнина, а чем более долгоживущее растение, тем лигнина больше, что вполне закономерно, ведь он отвечает за жесткость растения и его устойчивость к внешним факторам среды.

Лубяные культуры отличаются более высоким содержанием целлюлозы, чем в остальных растениях, притом не только в волокне, но и костре (табл. 1.1). Волокно лубяных культур не используется для переработки по биотехнологическому маршруту, так как оно очень устойчиво. Примеры использования костры в литературе имеются, но при этом отмечается её повышенная устойчивость ко всем видам физико-химических обработок по сравнению с другими видами целлюлозосодержащего сырья. То есть химический состав целлюлозосодержащего сырья и его устойчивость к деградации тесно связаны [Mosier, 2005; Zabed, 2016].

1.3 Методы предварительной обработки целлюлозосодержащего сырья

Как правило, в целлюлозосодержащем сырье линейные молекулы целлюлозы опутаны разветвленными цепями гемицеллюлоз, образующими комплекс целлюлоза-гемицеллюлозы, этот комплекс действует как химический барьер и препятствует доступу ферментов в комплекс в нативном состоянии [Zabed, 2016]. Комплексы целлюлоза-гемицеллюлозы дополнительно «цементированы» лигнином, что создаёт физический барьер для доступа ферментов [Taha, 2016]. Поэтому для разрушения композитной матрицы образованной целлюлозой, гемицеллюлозами и лигнином требуется предварительная обработка. Должны быть разрушены физические и химические связи между молекулами полимеров путем изменения макроскопической, субмикроскопической и микроскопической структуры

биомассы. Только после этого целлюлоза и гемицеллюлозы станут доступны для гидролитических ферментов и могут быть превращены в раствор сахаров. Во время предварительной обработки, происходят процессы удаления лигнина, снижения кристалличности целлюлозы, увеличения площади поверхности и пористости биомассы и др. [Wyman, 2005]. Предварительная обработка является энергозатратным процессом, для оценки её энергоэффективности применяют следующую формулу:

$$\eta = \frac{m_{pв}}{E} \quad (1.1)$$

где η – энергоэффективность, кг/МДж;

$m_{pв}$ – масса образовавшихся редуцирующих веществ, кг;

E – общее потребление энергии, МДж.

В настоящее время большинство исследователей сходятся во мнении, что предварительная обработка является ключевой стадией в процессе биоконверсии целлюлозосодержащего сырья в продукты микробиологического синтеза, самой дорогой и самой энергоёмкой. Эффективность всех последующих процессов (гидролиза, микробиологического синтеза и очистки) зависит от результатов предварительной обработки [Drapcho, 2008; Brodeur, 2011; Kim, 2013; Zabed, 2016; Karimi, 2016; Kim, 2016; Sun, 2016; Gaurav, 2017; Singh, 2018; Zabed, 2019; Sankaran, 2020; Bhatia, 2020; Mankar, 2021]. Сложность и нестабильность химического состава, вариабельность межмолекулярных взаимодействий органических полимеров, входящих в состав целлюлозосодержащего сырья (целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина) и неорганических компонентов дали толчок для многоуровневых и многовариантных исследований способов предварительной обработки, направленных на разрушение химических и физических связей между разными веществами.

Предложены многочисленные способы предобработки, включающие физические (в т.ч. механические), химические, биологические и комбинированные методы воздействия на целлюлозосодержащее сырье [Hu

2012; Baig, 2019; Zabed, 2016; Zabed, 2019; Lim, 2019; Kumar, 2020; Zhao, 2020; Rajak, 2020; Chopda, 2020; Chiranjeevi, 2019; Chiranjeevi, 2020; Сушкова, 2016]. Продолжается поиск инновационных способов [Bhatia, 2020; Zhao, 2020, Smichi, 2020; Mankar, 2021]: паровой взрыв, гидротермобарическая обработка [Zhang, 2018]; механохимическая обработка [Bychkov, 2018; Подгорбунских, 2018; Bychkov, 2019; Gavrilova, 2019; Podgorbunskikh, 2019; Lomovskiy, 2020; Podgorbunskikh, 2020; Dome, 2020; Lomovskiy, 2021]; обработка органическими растворителями [Tekin, 2018, Tang 2017; Вураско, 2012]; лигнолитическая предобработка с помощью ферментов или культур микроорганизмов [Zabed, 2019, Rajak 2020] и другие.

Были предложены различные критерии эффективности предварительной обработки, они дополнялись и уточнялись разными авторами. Гауров и Забед предложили следующие критерии [Gaurav, 2017; Zabed, 2019]:

- (1) высокая эффективность ферментативного гидролиза;
- (2) низкие потери гемицеллюлозы и целлюлозы;
- (3) не должны образовываться нежелательные ингибиторы;
- (4) низкий расход энергии;
- (5) низкие потери биомассы;
- (6) сокращение побочных продуктов или отходов;
- (7) низкий расход химических веществ.

Авторы подчёркивают, что ни один из существующих методов не отвечает всем вышеизложенным требованиям, каждый способ имеет какие-то недостатки.

Методы предварительной обработки можно разделить на четыре группы: физические, химические, физико-химические и биологические (табл. 1.2).

Действие физических методов на целлюлозосодержащее сырьё (сюда относятся механический размол и облучение) сводится к увеличению доступной площади поверхности и объема пор, снижению степени полимеризации целлюлозы и ее кристалличности, гидролизу гемицеллюлозы и частичной деполимеризации лигнина [Szczodrak, 1996; Rao, 2016;

Таблица 1.2 – Сравнение различных методов предобработки целлюлозосодержащего сырья [Zabed, 2016; Zabed, 2019]

Методы	Краткое описание	Преимущества	Недостатки
<i>Физическая обработка</i>			
механический размол	комбинация дробления, шлифования или помола до окончательного размера частиц материала (10–30 мм после скола и 0,2–2 мм после помола)	<ul style="list-style-type: none"> – снижение кристалличности целлюлозы; – увеличение площади поверхности; – снижение степени полимеризации; – простота в обращении 	<ul style="list-style-type: none"> – высокая энергоемкость; – не удаляется лигнин
облучение	обработка биомассы высокоэнергетическим излучением, в том числе гамма-лучами, ультразвуком, электронным пучком, импульсным электрическим полем, УФ- и микроволновым нагревом	<ul style="list-style-type: none"> – увеличение площади поверхности; – снижение степени полимеризации; – снижение кристалличности целлюлозы; – частичная деградация лигнина 	<ul style="list-style-type: none"> – дорого; – медленная скорость реакции; – энергоемкость; – не экологически чистый
<i>Химическая обработка</i>			
разбавленной кислотой	<ul style="list-style-type: none"> – эффективная концентрация кислот < 4%. – обработка при высокой температуре (например, 180 °С) в течение короткого периода времени; или при низкой температуре (например, 120 °С) в течение длительного периода (30–90 мин). – используются как неорганические кислоты (H_2SO_4, HCl, H_3PO_4, HNO_3), так и органические кислоты (фумаровая и малеиновая); т.н. обратимая α-гидроксиэтансульфоновая кислота [Botella, 2019] 	<ul style="list-style-type: none"> – увеличение площади поверхности; – высокая скорость реакции; – удаление гемицеллюлоз; – изменение структуры лигнина; – высокая эффективность последующего ферментативного гидролиза 	<ul style="list-style-type: none"> – небольшое удаление лигнина; – образование ингибиторов; – необходимость нейтрализации; – необходимость утилизации солей нейтрализации
концентрированной кислотой	<ul style="list-style-type: none"> – концентрация кислоты колеблется от 70% до 77% и температура 40-100 °С. – в основном используются неорганические кислоты (H_2SO_4 и 	<ul style="list-style-type: none"> – полное разупорядочивание кристаллической структуры целлюлозы; – получение аморфной целлюлозы; – увеличение площади поверхности; 	<ul style="list-style-type: none"> – образование ингибиторов; – коррозия оборудования; – необходимость восстановления кислоты;

	H_3PO_4)	– высокая скорость реакции	– высокие эксплуатационные расходы и расходы на техническое обслуживание
щелочью	– используются NaOH, KOH, NH_4OH и $Ca(OH)_2$; – обработка может идти при комнатной температуре; – продолжительность реакции колеблется от секунд до дней	– низкие температура и давление; – увеличение площади поверхности; – удаление гемицеллюлоз; – удаление лигнина; – изменение структуры лигнина; – более низкая деградация сахаров по сравнению с предварительной обработкой кислотой; – высокая эффективность последующего ферментативного гидролиза	– превращение щелочи в неизвлекаемые соли или включение в виде солей в биомассу; – необходимость регулировки pH для последующих процессов
озонолиз	– обработка озоном обычно при комнатной температуре и нормальном давлении; – время реакции несколько часов	– селективная деградация лигнина с минимальным воздействием на целлюлозу и гемицеллюлозу; – низкое образование ингибиторов, в частности отсутствие образования фурфурола и HMF – комнатная температура и нормальное давление; – производство озона и его прямое использование на месте	– высокая реакционная способность; – легковоспламеняющиеся, коррозионные и токсичные свойства озона делают процесс опасным. – высокие затраты на производство из-за высокой энергоёмкости; – экзотермические характеристики процесса требуют систему охлаждения
ионными жидкостями (ИЖ)	- ИЖ – это соли, обычно состоящие из крупных органических катионов и небольших неорганических анионов; – ИЖ существуют в виде жидкостей при комнатной температуре и имеют тенденцию оставаться жидкими в широком диапазоне температур (<100 °C) .	– не образуются токсичные или взрывоопасные газы; – углеводы и лигнин могут растворяться одновременно; – минимальная деградация желаемых продуктов; – низкая температура; – высокая загрузка биомассы;	– дорого; – необходимость регенерации для повторного использования; – отсутствие зрелых коммерческих методов восстановления ИЖ; – температура и нагрузка биомассой во время предварительной обработки ИЖ заметно влияет на

		<ul style="list-style-type: none"> – высокая растворимость лигнина; – высокая эффективность последующего ферментативного гидролиза; – некоторые ИЖ сохраняют целлюлазную активность и стабильность 	<p>скорость гидролиза</p>
<p>органическим и растворителями</p>	<ul style="list-style-type: none"> – обработка смесью органических или водных растворителей, таких как метанол, этанол, ацетон и этиленгликоль; – растворитель можно комбинировать с кислотными катализаторами, такими как HCl, H₂SO₄, щавелевая или салициловая кислота, для разрыва связей гемицеллюлозы. 	<ul style="list-style-type: none"> – извлечение относительно чистого лигнина в качестве побочного продукта; – минимальные потери целлюлозы (менее 2%); – высокий выход предварительно обработанного материала; – низкая деградация сахара 	<ul style="list-style-type: none"> – требование удаления растворителя из системы – высокая стоимость химикатов; – образование ингибиторов
<i>Физико-химическая обработка</i>			
<p>некатализируемый паровой взрыв</p>	<ul style="list-style-type: none"> – обработка паром при высоких температурах и давлениях, таких как 160–260 °C и 0,69–4,83 МПа соответственно; – продолжительность реакции от нескольких секунд до нескольких минут; – без добавок химических веществ 	<ul style="list-style-type: none"> – удаление гемицеллюлоз; – увеличенный объем пор; – улучшение доступности ферментов за счёт уменьшения размера частиц 	<ul style="list-style-type: none"> – низкое удаление лигнина; – разложение сахаров; – высокая энергоёмкость
<p>кислотно-катализируемый паровой взрыв</p>	<ul style="list-style-type: none"> – паровой взрыв катализируется добавлением H₂SO₄ или SO₂; – температурный диапазон 160–220 °C 	<ul style="list-style-type: none"> – удаление гемицеллюлоз; – увеличение площади поверхности; – повышенная доступность ферментов; – низкое воздействие на окружающую среду; – малоопасный процесс 	<ul style="list-style-type: none"> – образование ингибиторов; – частичный гидролиз гемицеллюлозы
<p>обработка перегретой водой</p>	<ul style="list-style-type: none"> – гидротермальная обработка биомассы с быстрой декомпрессией; – давление применяется для поддержания воды в жидком состоянии при 	<ul style="list-style-type: none"> – структурные и химические изменения в лигнине; – не требует катализаторов или химикатов; 	<ul style="list-style-type: none"> – высокая потребность в воде; – высокие энергозатраты; – разложение гемицеллюлоз

	повышенных температурах (160–240 °С); – диапазон рН 4–7, время реакции до 15 мин	– увеличение площади поверхности; – удаление гемицеллюлоз; – отсутствие или незначительное образование ингибитора – недорогой реактор	
взрыв аммиачного волокна (AFEX)	– обработка безводным жидким аммиаком при температуре 60–120 °С и выше 3 МПа в течение 30–60 мин с последующей быстрой декомпрессией	– увеличение площади поверхности; – снижение кристалличности целлюлозы; – удаление гемицеллюлозы – удаление лигнина; – изменение структуры лигнина; – отсутствие ингибиторов	– низкая эффективность для хвойной древесины; – экологические проблемы
перколяция с рециркуляцией аммиака (ARP)	– водный аммиак в концентрации 5–15 % проходит через реактор, заполненный биомассой, при температуре 140–210 °С в течение до 90 мин со скоростью перколяции около 5 мл/мин.	– удаление лигнина; – снижение кристалличности целлюлозы; – изменение структуры лигнина; – низкое образование ингибиторов	– высокие энергозатраты; – экологические проблемы
замачивание водным раствором аммиака (SAA)	альтернатива APR работает при более низкой температуре (30–75 °С).	– низкое образование ингибиторов; – низкое энергопотребление	– экологические проблемы; – неэффективное использование технологического оборудования
мокрое окисление	– окислительная обработка биомассы с использованием кислорода или воздуха в качестве катализатора; – окисление проводят в течение 10–15 мин при 170–200 °С и давлении 10–12 бар	– солубилизация гемицеллюлозы и лигнина; – высокая эффективность последующего ферментативного гидролиза; – низкое образование ингибиторов; – удаление лигнина	– высокая стоимость кислорода и катализаторов; – необходимость высоких давления и температуры
взрыв CO ₂	CO ₂ используется в качестве сверхкритической жидкости для предварительной обработки биомассы.	– эффективное удаление лигнина; – высокая эффективность последующего ферментативного	дорогостоящее оборудование

		<p>гидролиза;</p> <ul style="list-style-type: none"> – увеличение площади поверхности; – низкая деградация сахара; – низкая температура 	
<i>Биологическая обработка</i>			
плесневыми грибами	<ul style="list-style-type: none"> – грибами бурой, белой и мягкой гнили (базидиомицетами или аскомицетами) – глубинная или поверхностная ферментация; - продолжительность от 10 дней до несколько месяцев; – эффективно удаляется лигнин, но иногда частично гидролизуются целлюлоза и гемицеллюлозы 	<ul style="list-style-type: none"> – эффективная делигнификация; – мягкие условия окружающей среды; – низкие затраты на предварительную обработку; – низкий расход реагентов; – низкое энергопотребление; – отсутствие или низкое образование отходов; – низкие затраты регенерацию; – ингибиторы не образуются, либо их мало 	<ul style="list-style-type: none"> – потеря углеводов; – крайне низкая скорость деградации и делигнификации; – длительное время предварительной обработки
бактериями	<ul style="list-style-type: none"> – использование лигнолитических или гидролитических бактерий; – продолжительность несколько суток 	<ul style="list-style-type: none"> – более быстрый рост, чем у грибов; – относительно более короткое время предварительной обработки; – легче, чем грибы, поддаются генетическим манипуляциям – более экономичны, чем грибы; – адаптивность выше, чем у грибов – ингибиторы не образуются, либо их мало 	<ul style="list-style-type: none"> – относительно более низкая эффективность разложения лигнина по сравнению с грибами
консорциумами микроорганизмов	<ul style="list-style-type: none"> – использование систем совместного культивирования: грибы-грибы, бактерии-бактерии; бактерии-грибы; – продолжительность несколько суток 	<ul style="list-style-type: none"> – меньшее время инкубации по сравнению с предварительной обработкой грибами; – сложные микробные сообщества ускоряют органический гидролиз, что, в свою очередь, облегчает доступ ферментов к целлюлозосодержащему 	<ul style="list-style-type: none"> – отдельные штаммы могут столкнуться с трудностями при адаптации к колебаниям окружающей среды.

		<p>сырью</p> <ul style="list-style-type: none"> – непрерывное и стабильное образование метаболитов, необходимых для распада лигнина; – повышенная продуктивность 	
ферментами	<ul style="list-style-type: none"> – использование ферментов или ферментных препаратов или их композиций; лигнинолитические, гидролитические или смешанные препараты; – продолжительность от нескольких часов до нескольких дней 	<ul style="list-style-type: none"> – меньшее время инкубации по сравнению с предварительной обработкой микроорганизмами; – гидролиз макромолекул, облегчающий дальнейший процесс конверсии, особенно при производстве биогаза 	<ul style="list-style-type: none"> – производство и очистка ферментов могут быть дорогостоящими; – низкая стабильность лигнинолитических ферментов в промышленных процессах
силосование	<ul style="list-style-type: none"> – одновременное хранение и предварительная обработка биомассы с использованием различных биологических систем, таких как смеси молочнокислых бактерий (МКБ), смеси МКБ и гидролитических ферментов; смеси МКБ и дрожжей [Botella, 2019]; – продолжительность несколько месяцев; – перспективен для одновременного хранения и предварительной обработки биомассы 	<ul style="list-style-type: none"> – широко используется для хранения урожая; – может проводиться в умеренном климате; – снижение или полное отсутствие образования отходов; – низкие последующие затраты 	<ul style="list-style-type: none"> – длительный инкубационный период; – потеря органических веществ (в основном целлюлозы и гемицеллюлозы)

Подгорбунских, 2018]. Физические методы предварительной обработки очень дороги и не могут использоваться в крупномасштабных процессах [Brodeur, 2011].

Действие химических методов включает делигнификацию, снижение степени полимеризации и кристалличности целлюлозы [Szczo drak, 1996; Swain, 2015]. Основными химическими веществами, используемыми для предобработки являются минеральные кислоты и щелочи. Самой распространенной кислотой является серная, а щёлочью – гидроксид натрия. При обработке кислотой дополнительно гидролизуются гемицеллюлозы. Также используются органические кислоты, такие как фумаровая и малеиновая, при их применении образуется меньше ингибиторов [Nigam, 2002; Alvira, 2010]. При химическом воздействии наблюдается частичный гидролиз целлюлозы. Он происходит под действием щелочей, озона, органических растворителей, глицерина, диоксана, фенола или этиленгликоля.

Концентрированные минеральные кислоты, растворители на основе аммиака (гидрат аммония, гидразин), апротонные растворители (диметилсульфоксид или ДМСО), комплексы металлов (тарtrat трехвалентного железа, кадоксен и куоксан) и окислительная обработка с использованием кислорода в качестве окислителя (так называемое мокрое окисление) снижают кристалличность целлюлозы, разрывают комплекс лигнин-целлюлоза и гидролизуют гемицеллюлозы [Nigam, 2002].

Предварительная физико-химическая обработка включает такие приёмы, как паровой взрыв, взрыв аммиачного волокна (AFEX), перколяцию с рециркуляцией аммиака (ARP), пропитку водным аммиаком (SAA), мокрое окисление, взрыв CO₂ и т. д. Физико-химическая предобработка увеличивает площадь поверхности биомассы, доступную для действия ферментов, снижает кристалличности целлюлозы, удаляет гемицеллюлозы и лигнина во время предварительной обработки [Nigam, 2002, Alvira, 2010].

Предварительная биологическая обработка целлюлозосодержащего сырья может проводиться с помощью микроорганизмов, либо с помощью ферментов.

Чаще всего используются плесневые грибы: белая гниль, бурая гниль и мягкая гниль, наиболее эффективна белая гниль [Sarkar, 2012; Казарцев, 2014; Gros, 2014]. Главная задача биологической предобработки – изменение структуры лигнина (посредством лигнинпероксидазы) и его вывод из композиционной матрицы. Грибы бурой гнили поражают целлюлозу, а грибы белой и мягкой гнили воздействуют на целлюлозу и на лигнин [Prasad, 2007; Hesseltine, 1965]. Биологическая обработка проходит в мягких условиях, она дешева и малоэнергозатратна, главный недостаток – низкая скорость гидролиза и, следовательно, значительная длительность процесса, кроме того, может разлагаться целлюлоза. Генетическое конструирование новых продуцентов нацелено на преодоление этих проблем [Brodeur, 2011].

подавляющее большинство способов никогда не найдут промышленное использование в силу невозможности масштабирования и технологического оформления этих процессов по ряду причин, главной из которых является дороговизна, однако они важны для научного понимания особенностей поведения целлюлозосодержащего сырья под действием различных факторов [Zabed, 2016; Brodeur, 2011].

Самыми распространёнными являются химические методы, лидерами являются щелочная и кислотная предобработки [Chiranjeevi, 2018, Kusmiyati, 2019, Stoumpou, 2020, Zoubiri, 2020, Yan, 2020]. Ряд авторов сравнивает эти способы между собой и в зависимости от используемого сырья отдаёт предпочтение щелочному [Stoumpou, 2020] или кислотному способу [Kusmiyati, 2019, Zoubiri 2020]. Оба этих метода наиболее жизнеспособны в промышленных условиях благодаря их сильному эффекту предварительной обработки и относительно простой схеме реализации процесса [Kim, 2016; Zabed, 2016].

Выбор метода предобработки в первую очередь зависит от физико-химических свойств сырья. Для предобработки сельскохозяйственных отходов достаточно успешными считаются взрыв аммиачного волокна, мокрое окисление и обработка перегретой водой [Van Walsum, 1996]. По сравнению с

сельскохозяйственными отходами, древесина гидролизуется сложнее, основными методами её предобработки являются обработка серной кислотой и кислотнo-катализируемый паровой взрыв [[Hahn-Hägerdal, 2006](#)].

Детоксификация

В процессе предобработки могут образовываться побочные продукты разложения компонентов целлюлозосодержащего сырья, которые могут выступать как ингибиторы для ферментов или ферментных комплексов микроорганизмов [[Cavka, 2013](#)]. Ингибиторы могут изначально содержаться в сырье (например, экстрактивные вещества или эфиромасличная фракция), либо образовываться в процессе предобработки. Чем жестче режимы предобработки, тем больше образуется ингибиторов. Ингибиторы, образующиеся в процессе предобработки, можно разделить на три основные группы: алифатические карбоновые кислоты, производные фурана и фенольные соединения, в основном они образуются из гемицеллюлоз и лигнина [[Larsson, 1999](#); [Palmqvist, 2000](#)], рис. 1.2. Особенно сильное отрицательное воздействие оказывают уксусная, муравьиная, леволиновая кислоты, оксиметилфурфурол и фурфурол [[Jönsson, 2013](#)].

Существует два принципиальных подхода к детоксификации: общетехнологический и технологические доработки после основного процесса [[Zabed, 2016](#)]. Общетехнологический подход включает:

- (1) выбор сырья – не следует использовать плохо гидролизуемое сырьё и сырьё с высоким содержанием ингибиторов (недостаток – сокращение разнообразия сырья);
- (2) использование высоких дозировок инокулята (недостаток – удорожание процесса);
- (3) выбор продуцента, устойчивого к ингибиторам (при этом не должна снижаться производительность по целевому продукту);
- (4) адаптация продуцента (подходит не для всех продуцентов);

(5) генная инженерия продуцента с целью повышения устойчивости к ингибиторам (недостаток – генномодифицированные микроорганизмы могут спонтанно терять продуктивность).

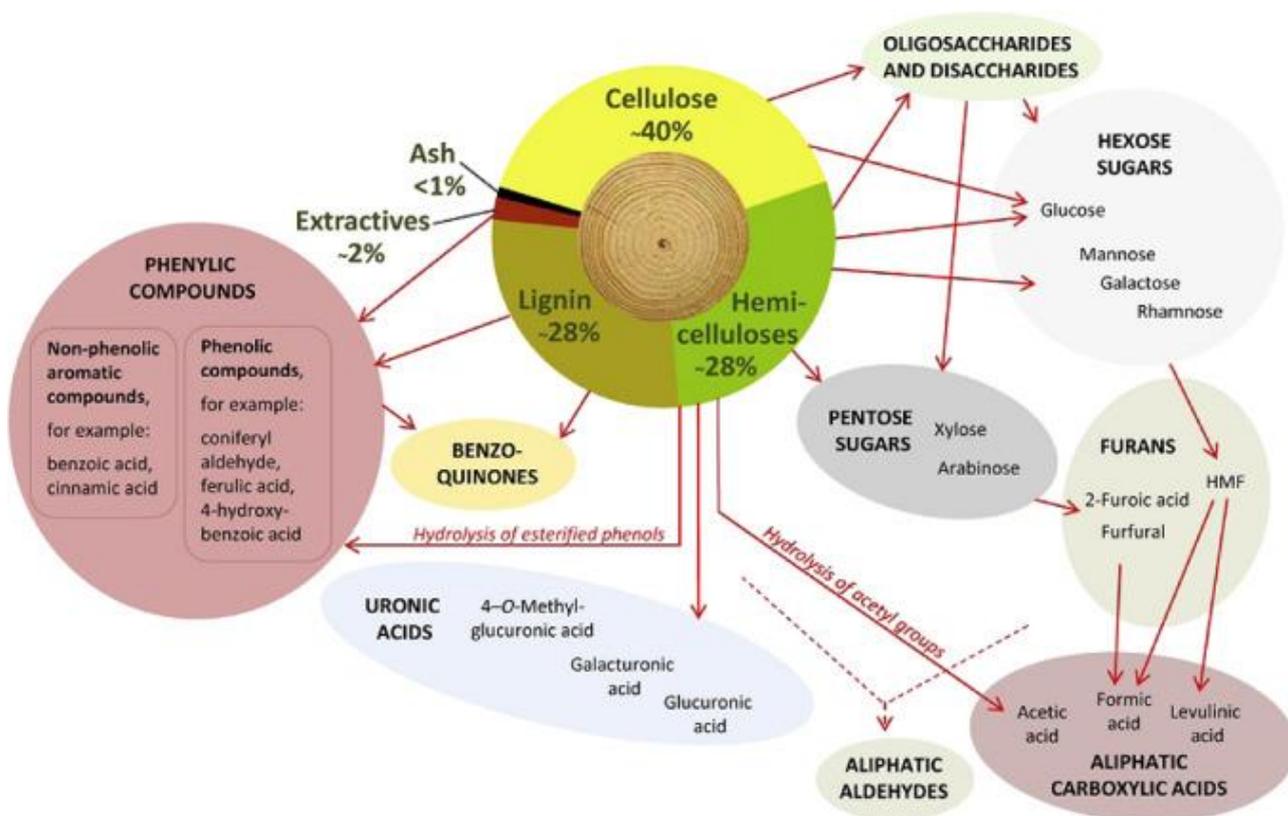


Рисунок 1.2 – Образование ингибиторов при кислотной предобработке [Zabed, 2016; Jönsson, 2016]

Технологические доработки после основной предварительной обработки сырья могут включать следующие процессы:

- (1) нейтрализующие вещества – щелочи при использовании для предобработки кислот и кислоты при использовании щелочей (недостаток – дополнительные расходы);
- (2) ферментативная обработка лакказой или пероксидазой для устранения негативного влияния лигнина (недостаток – существенные дополнительные расходы);
- (3) испарение летучих примесей (недостатки – дороговизна и высокое энергопотребление);

(4) жидко-жидкофазная обработка, например, экстракция сверхкритической жидкостью, CO₂-экстракция (недостатки – требование дополнительных оборудования, химических реагентов, времени);

(5) твердо-жидкофазная обработка – ионный обмен, обработка активированным углём, обработка лигнином экстракция (недостатки – требование дополнительных оборудования, химических реагентов, времени);

(6) микробиальная обработка (недостатки – длительность и нецелевой расход сахаров).

За детоксификацию отвечают ферменты пероксидаза и лакказы [Chandel, 2013]. Бактерии более эффективны *in situ*, чем грибы, доказана активность *Coniochaeta ligniaria*, *Reibacillus thermosphaericus*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium indologenes*, *Acinetobacter sp* и *Arthrobacter aureus*. Из грибов применяются *Trichoderma reesei*, способные разлагать уксусную кислоту и производные фурфурола и бензойной кислоты [Palmqvist, 2000] и *C. ligniaria* C8 NRRL30616, способные разлагать феруловую кислоту, фурфурол и оксиметилфурфурол [Chandel, 2013; 148].

Детоксификация применяется если в гидролизатах много ингибиторов, если ингибиторы накапливаются в результате рециркуляции технологических потоков или если используется продуцент с низкой устойчивостью к ингибиторам. Методы детоксификации должны быть дешевыми, избирательно удалять ингибиторы и легко встраиваться в технологический процесс [Palmqvist, 2000].

1.4 Гидролиз целлюлозосодержащего сырья

Кислотный гидролиз

Мировым лидером в исследованиях кислотного гидролиза целлюлозосодержащего сырья являлся СССР. В январе 1934 г. под руководством Шаркова В.И. был запущен Череповецкий опытный завод. За 5 лет работы этого завода были проверены многочисленные технологические

режимы, на основе которых выбраны параметры гидролиза, подготовки и биохимической переработки гидролизата, ректификационного концентрирования и очистки этанола [Шарков, 1973]. Комплексные научные исследования переработки целлюлозосодержащего сырья, в первую очередь древесного, проводились под руководством Агеева Л.М., Славянского А.К., Королькова И.И., Непенина Н.Н., Роговина З.А., Холькина Ю.И. и др. [Непенин, 1940; Роговин, 1940; Агеев, 1953; Славянский, 1962; Шарков, 1973; Корольков, 1978; Холькин, 1989; Крылов, 1993], были созданы производства-гиганты, всего 46 гидролизных заводов. Все они были уничтожены после распада СССР, единственным действующим заводом в настоящее время является ООО «Кировский биохимический завод». Технологии, разработанные в 60-70 гг XX в. в СССР, получили статус международных патентов с приоритетом Великобритании и Японии в нулевых годах XXI в. и начали внедряться в производство [Hilst, 2005; Naoyuki, 2010; пат. 18882 Евразийский союз].

Существует два способа кислотного гидролиза: обработка разбавленными кислотами при высоких температуре и давлении, продолжительность реакции от секунд до минут; и обработка концентрированными кислотами при низкой температуре [Агеев, 1953; Шарков, 1973; Холькин, 1989; Chandel, 2007; Balat, 2011]. Основные недостатки кислотного гидролиза – необходимость извлечения или нейтрализации кислот перед проведением микробиологического синтеза на гидролизной среде и образование большого количества отходов. В основном для кислотного гидролиза используется серная кислота, но сообщается и об использовании других неорганических кислот: соляной, азотной, трифторуксусной, фосфорной [Ravindran, 2016].

Двухстадийный гидролиз разбавленной кислотой (перколяция) позволяет извлечь сахара последовательно сначала из гемицеллюлоз, а затем из целлюлозы. Первая стадия проводится при относительно более низкой температуре, чтобы избежать потерь, связанных с разложением пентоз. Вторая стадия проводится при температуре в диапазоне 230-240 ° С, при этом

целлюлоза гидролизуется до глюкозы [Корольков, 1978; Wyman, 2005]. Для процесса требуются высокие температуры, поэтому неизбежно образуются ингибиторы, в первую очередь за счет разложения сахаров. Чаще всего используется серная кислота концентрацией от 0,5 % до 1,5 % и температура 120–160 °С. Сырьё укладывается в реактор, однако, так как плотность сырья низкая, то соотношение твердого вещества (целлюлозосодержащего сырья) к жидкому (раствору кислоты) достаточно высокое, поэтому концентрация получаемых сахаров относительно низкая: 3,0-3,8 % [Славянский, 1962; Шарков, 1973; Холькин, 1989; Gírio, 2010; Wyman, 2005].

Гидролиз концентрированной кислотой вызывает деполимеризацию как гемицеллюлозы, так и целлюлозы. Концентрация серной кислоты составляет 70–90% [Славянский, 1962; Шарков, 1973; Холькин, 1989; Hayes, 2009], соляной 41 %, трифторуксусной 100 %. Реакция длительная, проводится при нормальных температуре и давлении, возможно получение достаточно высоких концентраций сахаров: 10-18 % [Холькин, 1989]. Существенными недостатками способа являются коррозия оборудования и огромное количество отходов (например, в виде гипса при использовании серной кислоты).

Несмотря на то, что способ прекрасно описан в перечисленных выше советских учебниках, исследования продолжают [Григорьева, 2016].

Ферментативный гидролиз

Ферментативный гидролиз целлюлозосодержащего сырья можно проводить непосредственно с использованием микроорганизмов-продуцентов ферментов, либо, что более распространено, с помощью коммерчески доступных ферментных препаратов. Ферментативный гидролиз является наиболее перспективным и эффективным процессом из-за специфичности фермента к субстрату, работы при относительно более низких температурах и минимального образования ингибиторов [Синицын, 1995; Hu, 2012; Zeng 2017; Zaved, 2016].

Изучению ферментативного гидролиза целлюлозы и целлюлозосодержащих субстратов (в рамках общей теории ферментативного катализа) посвящено множество трудов в мировой литературе [Briggs, 1925; Brink, 1993; Brink, 1996; Варфоломеев, 1999; Варфоломеев, 2005; Hallac, 2011; Yu, 2011; Varfolomeev, 2018; Valls, 2019; Varfolomeev, 2021].

В СССР была создана мощная школа по исследованию ферментативного гидролиза целлюлоз [Клесов А.А., 1984], в настоящее время исследования продолжаются под руководством основателей школы: Сеницына А.П., Гернет М.В., Гусакова А.В., Черноглазова В.М. [Гернет, 1985; Сеницын, 1987; Сеницын, 1995; Gusakov, 2011; Сеницын, 2015; Ефременко, 2013; Денисенко, 2015; Dotsenko, 2018; Dotsenko, 2021].

Долгое время развитие технологии тормозила высокая стоимость ферментов, это до сих пор остаётся главным препятствием [Koppram, 2014], однако успехи в технологии ферментных препаратов позволили не только разработать и освоить выпуск новых эффективных ферментных препаратов, но и в десятки раз сократить их стоимость, что позволяет технологии ферментативного гидролиза уверенно конкурировать с технологией кислотного гидролиза [Agrawal, 2015; McMillan, 2011].

К синтезу целлюлаз способны различные мезофильные и термофильные микроорганизмы, растущие как в аэробных так и в анаэробных условиях [Sun, 2002]. Используются бактерии родов *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbiospora*, *Streptomyces*, грибы родов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola*, *Schizophyllum*, *Penicillium*. К синтезу способны микроорганизмы родов *Trichodrema*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus* и *Bacillus* [Balat, 2011].

Гетерогенная природа субстратов и гетерогенная природа процесса ферментативного гидролиза требуют синергетического действия смеси функционально различных целлюлолитических, гемицеллюлолитических и лигнолитических ферментов, (рис. 1.3) [Hu, 2012, Agrawal 2018, Caro 2019].

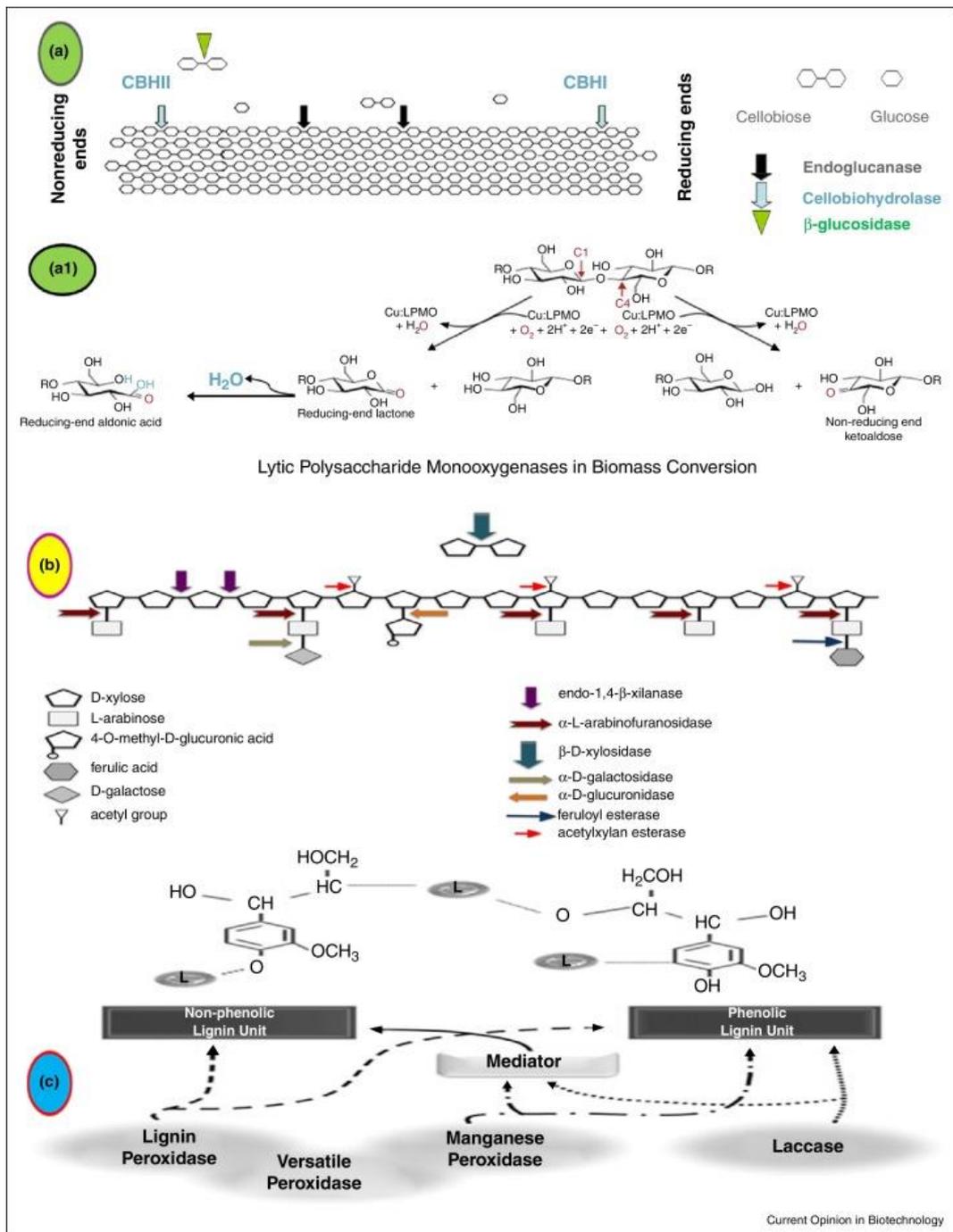


Рисунок 1.3 – Ферменты, участвующие в ферментативном гидролизе целлюлозы (а), гемицеллюлозы (b) и лигнина (c) [Taha, 2016]

Для эффективного гидролиза целлюлозы в глюкозу требуется синергетическое действие по крайней мере трех целлюлаз. Это эндо-1-4- β -глюканаза или карбоксиметилцеллюлаза (ЕС 3.2.1.4), экзоглюканаза или целлобиогидролаза (ЕС 3.2.1.91) и β -глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21) [Taha, 2016; Nigam, 2002]. Эндоглюканаза случайным образом расщепляет $\beta \rightarrow 1,4$ -гликозидную связь цепей D-глюкана в аморфных участках молекулы

целлюлозы или на поверхности микрофибрилл и образует свободные цепи, содержащие как восстанавливающие, так и невосстанавливающие концы. Затем целлобиогидролаза действует на восстанавливающие и невосстанавливающие концы и расщепляет их до целлобиозы (рис. 1.3, а). Затем β -глюкозидаза превращает целлобиозу в глюкозу. Эффективная целлюлазная система должна быть способна эффективно разлагать кристаллическую целлюлозу и быть устойчивой к кислому рН (4-5) и стрессовым условиям процесса [Bajaj, 2009].

Химическое строение гемицеллюлоз сложнее, чем химическое строение целлюлозы, поэтому для ее гидролиза требуются более специфические и множественные ферментные системы. Типичная гемицеллюлозная система включает эндо-1,4- β -ксиланазу или эндоксиланазу (ЕС 3.2.1.8), ксилан-1,4- β -ксиланэстеразы, феруловую и *n*-кумаровую эстеразы, α -1-арабинофуранозидазы, α -глюкуронидазу (ЕС 3.2.1.139), α -арабинофуранозидазы (ЕС 3.2.1.55), ацетилксиланэстеразы (ЕС 3.1.1.72) и α -4-*o*-метилглюкуронозидазы ксилозидазы (ЕС 3.2.1.37) (рис. 1.3, б) [Taha, 2016]. Эндоксилаза гидролизует основные цепи ксилана, а β -ксиланэстераза расщепляет ксилоолигосахариды до ксилозы. α -арабинофуранозидаза и α -глюкуронидаза действуют на ксилановый остов и удаляют арабинозу и 4-*o*-метилглюкуроновую кислоту соответственно [Saha, 2003]. Ацетилэстеразы атакуют ацетильные связи ксилозы, в то время как ферулоилэстеразы гидролизуют сложноэфирные связи, расположенные между арабинозными звеньями и феруловой кислотой. Ферулоилэстеразы также облегчают высвобождение гемицеллюлозы из лигнина [Howard, 2003].

Химическое строение гемицеллюлоз сложнее, чем химическое строение целлюлозы, поэтому для ее гидролиза требуются более специфические и множественные ферментные системы. Типичная гемицеллюлозная система включает эндо-1,4- β -ксиланазу или эндоксиланазу (ЕС 3.2.1.8), ксилан-1,4- β -ксиланэстеразы, феруловую и *n*-кумаровую эстеразы, α -1-арабинофуранозидазы, α -глюкуронидазу (ЕС 3.2.1.139), α -арабинофуранозидазы (ЕС 3.2.1.55), ацетилксиланэстеразы (ЕС 3.1.1.72) и α -4-

o-метилглюкуронозидазы ксилозидазы (ЕС 3.2.1.37) (рис. 1.3, б) [Taha, 2016]. Эндоксилаза гидролизует основные цепи ксилана, а β -ксиланэстераза расщепляет ксилоолигосахариды до ксилозы. α -арабинофуранозидаза и α -глюкуронозидаза действуют на ксилановый остов и удаляют арабинозу и 4-*o*-метилглюкуроновую кислоту соответственно [Saha, 2003]. Ацетилэстеразы атакуют ацетильные связи ксилозы, в то время как ферулоилэстеразы гидролизуют сложноэфирные связи, расположенные между арабинозными звеньями и феруловой кислотой. Ферулоилэстеразы также облегчают высвобождение гемицеллюлозы из лигнина [Howard, 2003] .

Из-за структурной сложности лигнина некоторые окислительные ферменты также должны функционировать синергетически с целлюлазами и гемицеллюлазами за счет разрушения физического барьера в лигноцеллюлозном комплексе. Биодegradация лигнина освобождает доступ гидролитических ферментов к полисахаридам. Основными ферментами деградации лигнина являются лигнин пероксидазы, марганец пероксидазы и лакказы [Taha, 2016; Pérez, 2002] .

Эффективность преобразования целлюлозосодержащего сырья в раствор сахаров зависит от большого количества факторов, которые условно можно разделить на две группы: (1) факторы, связанные с ферментами, (2) факторы, связанные с субстратом и технологическими процессами, эти две группы факторов взаимосвязаны.

Факторами, связанными с ферментами являются тип ферментов, дозировка, источники, эффективность ферментов, условия ферментативного гидролиза. Среди факторов, связанных с субстратом и технологическими процессами, можно выделить следующие [Alvira, 2010]:

- (1) состав и структура сырья;
- (2) толщина клеточной стенки (грубость), ограничивающая проникновение жидкости;
- (3) кристалличность целлюлозы;
- (4) степень полимеризации целлюлозы;

(5) массовая доля лигнина, который ограничивает скорость ферментативного гидролиза, действуя как физический барьер;

(6) массовая доля гемицеллюлозы (удаление гемицеллюлозы увеличивает средний размер пор субстрата и, следовательно, увеличивает доступность и вероятность гидролиза целлюлозы);

(7) доступная площадь поверхности субстрата;

(8) размер частиц исходного сырья (чем меньше размер частиц, тем больше удельная поверхность и, следовательно, доступность целлюлозы для ферментов);

(9) пористость (размер пор субстрата по отношению к размеру ферментов является основным ограничивающим фактором в ферментативном гидролизе целлюлозосодержащего сырья).

(10) изменения доступности ферментов, связанные с эффективностью образования фермент-субстратных комплексов.

Таким образом, ферментативный гидролиз – это самый сложный процесс, на эффективность которого влияет множество факторов, несогласованность действия ферментов приводит к тому, что ферментативный гидролиз целлюлозы и гемицеллюлоз проходит не до конца, и выход сахаров ниже теоретических значений [Zabed, 2016]. Ещё раз следует подчеркнуть, что предобработка является решающей стадией, определяющей свойства субстрата и, следовательно, определяющей эффективность ферментативного гидролиза.

1.5 Перспективы использования целлюлозосодержащего сырья для производства продуктов микробиологического синтеза

Неослабевающий с момента её открытия интерес к целлюлозе объясняется следующими факторами:

(1) это самое распространенное возобновляемое сырье в мире [Lieth, 1975; Field, 1998];

(2) энергетические затраты на синтез считаются нулевыми, так как фотосинтез ведут сами растения под действием энергии солнечного света [Hu, 2012];

(3) мономером целлюлозы является глюкоза – универсальная молекула-платформа в биохимических превращениях всех живых существ;

(4) глюкоза является универсальным сырьём в микробиологическом синтезе широчайшего круга продуктов с высокой добавленной стоимостью (спиртов, органических кислот, антибиотиков, витаминов, ферментов, аминокислот, полисахаридов, микробной биомассы и т.д.).

Концепция использования глюкозы, добытой из целлюлозы, обладает архиважной экономической привлекательностью. В.И. Ленин 25 октября 1919 г. пишет в письме Г.Е. Зиновьеву: «Сахар из опилок...ва ж н о с т ь г и г а н т с к а я» [Ленин, 1970].

Мировое производство растительной биомассы составляет примерно 200×10^9 тонн/год [Lieth, 1975; Field, 1998], из которых почти $8\text{--}20 \times 10^9$ тонн первичной биомассы могут быть использованы для биотехнологической переработки [Saini, 2015]. В пересчёте на биоэтанол это эквивалентно 442 млрд. литрам в год [Kim, 2004; Sarkar, 2012]. Целлюлоза составляет около 1/3 растительных тканей и ежегодно возобновляется путём фотосинтеза, поэтому рассматривается как неисчерпаемый и универсальный источник [Hu, 2012].

Первым промышленным продуктом из целлюлозосодержащего сырья стал топливный биоэтанол. Исследований на эту тематику выполнено очень много, вот неполный перечень обзоров: Singh, 1992; Olsson, 1996; Szczodrak, 1996; Van Walsum, 1996; Von Sivers, 1996; Badger, 2002; Galbe, 2002; Pérez, 2002; Sun, 2002; Dien, 2003; Howard, 2003; Saha, 2003; Howard, 2004; Kim, 2004; Kourkoutas, 2004; Hamelinck, 2005; Mosier, 2005; Reddy, 2005; Wyman, 2005; Hahn-Hägerdal, 2006; Chandel, 2007; Prasad, 2007; Bai, 2008; Olofsson, 2008; Sánchez, 2009; Saxena, 2009; Alvira, 2010; Banerjee, 2010; Gírio, 2010; Moreno, 2010; Balat, 2011; Brodeur, 2011; Hu, 2012; Kim, 2012; Limayem, 2012; Sarkar, 2012; Zhao, 2012; Kreith, 2013; Modenbach, 2013; Mood, 2013; Koppram, 2014;

Parisutham, 2014; Isikgor, 2015; Kumar, 2015; Paulova, 2015; Saini, 2015; Sarris, 2015; Silveira, 2015; Chen H., 2016; Kamzon, 2016; Karimi, 2016; Kim, 2016; Kumar, 2016; Rao, 2016; Ravindran, 2016; Taha, 2016; Zabed, 2016; Zhao, 2016; Paramjeet, 2018; Singh, 2018; Tayyab, 2018; Liu, 2019; Prasad, 2019; Zabed, 2019; Bhatia, 2020; Cunha, 2020; Dey, 2020; Rezania, 2020; Sjulander, 2020; Chen J., 2021; Das, 2021; Lamichhane, 2021; Mankar, 2021; Yuan, 2021; Devi, 2022; Dey, 2022; Nassar, 2022; Panahi, 2022; Roukas, 2022; Suhartini, 2022.

Именно в технологии получения биоэтанола наиболее полно изучены подходы к трансформации целлюлозосодержащего сырья в раствор сахаров, изложенные в данной главе. Природная устойчивость целлюлозосодержащего сырья к любым видам технологических воздействий является главным препятствием успешной коммерциализации технологии биоэтанола, это производство облагается налогами на льготных условиях, либо освобождено от налогов, либо является дотационным.

Для снижения себестоимости биоэтанола предложено множество технологических приёмов, их можно объединить в следующие группы:

(1) выбор целлюлозосодержащего сырья с высоким содержанием целлюлозы, низким содержанием ингибиторов, легко поддающегося технологическим обработкам;

(2) разработка эффективных способов предварительной обработки сырья, однако до сих пор идеальный способ не создан;

(3) технология получения и использования эффективных ферментных препаратов;

(4) детоксификация гидролизных сред;

(5) технологические приёмы повышения эффективности

(6) биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и микробиологического синтеза целевого продукта;

(7) отбор и генетическое конструирование эффективных продуцентов с высоким выходом целевого метаболита, высокой скоростью его биосинтеза, высокой устойчивостью к ингибиторам;

- (8) очистка целевого метаболита;
- (9) полная утилизация отходов на стадиях предобработки, ферментативного гидролиза, спиртового брожения, либо их трансформация в коммерческие продукты.

Эти же технологические приёмы справедливы и для других микробиологических производств, принципиальная разница будет заключаться в используемом продуценте и, соответственно, в способах очистки целевого метаболита и утилизации побочных продуктов его жизнедеятельности. В настоящее время описаны примеры получения из целлюлозосодержащего сырья таких продуктов микробиологического синтеза, как аминокислоты, органические растворители, биоспирты, карбоновые кислоты, полисахариды, биомасса кормовых белков и др. [Агеев, 1953; Славянский, 1962; Шарков, 1973; Лобанок, 1981; Лобанок, 1988; Гельфанд, 2012; Кухаренко, 1999; Parisutham, 2014; Isikgor, 2015; Saini, 2015; Karimi, 2016; Sanford, 2016; Гладченко, 2018; Gladchenko, 2019; Prasad, 2019; Woodley, 2019; Gani, 2020; Lomakin, 2020], то есть всех тех продуктов микробиологического синтеза, которые ранее в промышленной микробиологии были получены на углеводных, в том числе на мелассных средах [Новаковская, 1972; Яровенко, 1981; Воробьева, 1987; Егоров, 1989; Елинов, 1995; Крылов, 2003; Римарева, 2005; Шакир, 2007; Кузнецов, 2010; Нетрусов, 2014; Градова, 2010; Красноштанова, 2018; Крылов, 2003; Кухаренко, 1999; Сербя, 2017; Сербя, 2018; Сербя, 2020; Туршатов, 2016; Gernet, 2019; Gernet, 2020]. Сахаросодержащее сырьё, безусловно, более предпочтительно для микробиологического производства, чем целлюлозосодержащее. Однако, его использование, во-первых, не может удовлетворить всех потребностей экономики, во-вторых, ведет к конкуренции за пищевые ресурсы в агропищевом секторе [Kim, 2004; Reddy, 2005; Hahn-Nägerdal, 2006; Prasad, 2007; Limayem, 2012; Sarkar, 2012; Saini, 2015; Ravindran, 2016; Roukas, 2022].

Комплексное решение всех вышеобозначенных технологических задач биоконверсии целлюлозосодержащего сырья в продукты с высокой

добавленной стоимостью позволит создать конкурентоспособное, экономически выгодное производство. Системный подход, базирующийся на принципах диалектического материализма, был применен в отечественной науке ещё в середине XX в. при создании перерабатывающих предприятий (и целлюлозно-бумажных, и гидролизных) [Непенин, 1940; Роговин, 1940; Славянский, 1962; Шарков, 1973; Риц, 1983; Холькин, 1983; Холькин, 1987; Воробьева, 1987; Холькин, 1989], но только в начале XXI в. подобные работы стали появляться в мировой литературе в контексте циклической экономики [Isikgor, 2015; Sankaran, 2020; Giuliano, 2016; Geissdoerfer, 2017; Gani, 2020; Negro, 2018; Taherzadeh, 2019; Андреев, 2020].

Особенно эффективным признаётся комбинированное использование химических и биохимических путей трансформации целлюлозосодержащего сырья и одновременный выпуск продуктов биотехнологического и химического синтеза [Octave, 2009; Isikgor, 2015; Silveira, 2015; Sanford, 2016; Varfolomeev, 2018; Woodley, 2019; Gani, 2020]. Это позволяет позиционировать целлюлозосодержащее сырьё как частичную замену углеводов в технической химии. Бесконечность и глобальная распространённость целлюлозосодержащего сырья с одной стороны, и ограниченность углеводородного сырья с другой стороны, приводят к неизбежности перехода на целлюлозосодержащее сырьё. Это обуславливает острую необходимость научно обоснованного решения поставленной задачи.

1.6 Классическое биотехнологическое производство этилового спирта и пути его развития

1.6.1 Продуценты биоэтанола

Многие бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы способны в анаэробных условиях сбраживать растворимые сахара в этанол [Skoog, 1988]. Однако мицелиальные грибы производят этанол с низкой скоростью и имеют ограниченную толерантность к этанолу [Singh, 1992]. Коммерческое

использование в крупномасштабном производстве этанола получили немногие продуценты [Zabed, 2016].

(1) Наиболее распространенным и широко используемым микроорганизмом для биосинтеза этанола являются факультативно-анаэробные дрожжи *S. cereisiae*. Имеют следующие преимущества:

- надежность, хорошо подходит для сбраживания гидролизатов целлюлозосодержащего сырья;

- способность утилизировать гексозные сахара (глюкозу, маннозу, галактозу) и дисахариды (сахарозу и мальтозу);

- высокая устойчивость к ингибиторам и высокому осмотическому давлению;

- высокий выход биоэтанола (выше 0,45 г/г при оптимальных условиях);

- высокая удельная скорость роста (до 1,3 г/г клеточной массы в час) [Galbe, 2002; Sarris, 2015];

- способность некоторых штаммов снижать концентрацию побочных веществ в бражке [пат. РФ 2331666; пат. РФ 2331667].

Недостаток: из-за отсутствия ферментов, превращающих ксилозу в ксилулозу они не способны утилизировать пятиуглеродные сахара [Tian, 2008]

Рекомбинантные штаммы *S. cereisiae* обладают ещё более высокой устойчивостью к ингибиторам, их недостатками являются низкая генетическая устойчивость и возможно внезапное снижение производительности [Cunha, 2020; Розанов, 2014; Oh, 2019].

(2) *Z. mobilis* – грамотрицательные бактерии. Имеют следующие преимущества:

- более высокая удельная производительность по этанолу,

- более низкий выход биомассы,

- более высокий выход этанола на глюкозе,

- более высокая рабочая температура по сравнению с *S. cerevisiae* [Balat, 2011; Amin, 2016].

(3) *E. coli* – мезофильные грамотрицательные бактерии. Используются рекомбинантные штаммы, при этом генетические манипуляции достаточно просты, в результате достигаются:

- совместная утилизация глюкозы и ксилозы;
- предшествующее промышленное использование для производства различных биотехнологических продуктов.

(4) *Scheffersomyces (Pichia stipitis)* – основные дрожжи, метаболизирующие ксилозу в этанол. Имеют следующие преимущества:

- эффективное превращение ксилозы в этанол с небольшим образованием побочных продуктов;
- способны метаболизировать некоторые продукты разложения сахара, например, фурфурол и гидроксиметилфурфурол;
- хорошо адаптируются к гидролизным средам.

(5) Для сбраживания ксилозы также использовались дрожжи *Pichia segobiensis*; *Pachysolen tannophilus*; *Candida tenuis*; *Candida shehatae*; *Brettanomyces naardenensis*. Несмотря на длительную адаптацию к гидролизным средам эти продуценты быстро превращают ксилозу в этанол с высоким выходом и не синтезируют ксилит.

(6) Очень перспективна рекомбинантная бактерия *Klebsiella oxytoca*:

- способна расти при pH до 5,0 и температуре до 35 °С,
- высокая скорость брожения: брожение длится несколько минут по сравнению с часами для дрожжей;
- способна расти на широком спектре сахаров, включая гексозы и пентозы, а также на целлобиозе и целлотриозе.

(7) Из натуральных изолятов выделена *Clavispora* NRRL Y-50464, этот продуцент биоэтанола устойчив к ингибиторам и продуцирует целлобиазу.

(8) Термофильные дрожжи *Kluveromyces marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe* способны сбраживать широкий спектр сахаров [Abubaker, 2012].

В качестве продуцентов биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья были исследованы термофильные анаэробные бактерии *Thermoanaerobacter*

ethanolicus, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermoanaerobium brockii* и *Clostridium thermosaccharolyticum* [Balat, 2011]. Большинство этих бактерий характеризуются широким спектром субстратов, но этанол не является единственным продуктом их метаболизма, поэтому этанол трудно извлечь [Gírio, 2010] .

Для оценки производительности любого микроорганизма в качестве продуцента этанола оценивают их эффективности в различных условиях процесса: должны быть широкий диапазон температур, широкий диапазон pH, устойчивость к этанолу, высокая скорость роста, высокая продуктивность по этанолу, высокая осмотическая устойчивость, низкий выход побочных метаболитов, генетическая стабильность и устойчивость к ингибиторам [Balat, 2011]. Для производственных продуцентов этанола из целлюлозосодержащего сырья важны способность утилизировать несколько сахаров, высокий выход этанола, толерантность к высокой концентрации этанола, высокая продуктивность этанола, хороший рост на простых и недорогих средах, способность расти в высококонцентрированных средах, устойчивость к ингибиторам и способность задерживать загрязняющие вещества в условиях роста [Dien, 2003; Olofsson, 2008; Von Sivers, 1996].

Метаболизм продуцентов здесь не будет рассматриваться, он отлично описан в мировой литературе [Егоров, 1989; Елинов, 1995; Olsson, 1996; Saxena, 2009; Sarris, 2015].

Непрерывно идут работы по отбору высокоэффективных продуцентов и их созданию методами генетической инженерии [Dien, 2003; Zhao, 2016; Cunha, 2020; Choi, 2020; Panahi, 2022; Joshi, 2019; Steensels, 2014], некоторые из них уже использованы в производственных процессах [Lawford, 2001; Saha, 2015].

1.6.2 Свойства и применение этанола

Этанол (этиловый спирт, метилкарбинол) – одноатомный спирт с формулой C_2H_5OH . Горючая, летучая, бесцветная, прозрачная гигроскопичная жидкость, имеет жгучие вкус и запах, пожароопасен. Является универсальным

растворителем как для большинства органических веществ, так и для некоторых неорганических солей. Является психоактивным веществом (депрессантом), действует угнетающе на центральную нервную систему человека.

Этанол является важным продуктом и основным или вспомогательным видом сырья для производств пищевой, химической, фармацевтической, парфюмерной промышленности, в топливно-энергетическом комплексе.

В пищевой и фармацевтической промышленности, в медицине должен использоваться только этанол, полученный из пищевого сырья.

В химической промышленности этанол используется [De Jong, 2012; Habe, 2013; Isikgor, 2015; Giuliano, 2016; Sanchez, 2020]:

(1) как прекурсор для синтеза ряда химических веществ, таких как ацетальдегид, диэтиловый эфир, уксусная кислота, хлороформ, этилакрилат, этилацетат, этиламины, этилвиниловый эфир, этилен и др.;

(2) как растворитель (в лакокрасочной промышленности, в электронике при создании микросхем);

(3) является компонентом антифризов, стеклоочистителей, аэрозолей.

В топливно-энергетическом комплексе:

(1) в качестве топлива для моторных и ракетных двигателей (это исторически первое топливо для автомашин Форда и ракет Королёва); для бытовых, походных и лабораторных нагревательных приборов («спиртовок»);

(2) в качестве компонента моторных топлив, например, газохолола – смеси бензина и биоэтанола [Козин, 2009; Gao, 2019];

(3) в качестве присадок топлив, например, оксигенатной присадки для дизельного топлива;

Этанол характеризуется высоким октановым числом, более широкими пределами воспламеняемости, более высокой теплотой парообразования и меньшими выбросами твердых частиц и углекислого газа [Chen H., 2016]. Обычный бензиновый двигатель может работать, если концентрация этанола в смеси не превышает 30 %. Созданы специальные двигатели для использования

биоэтанола. В странах с холодным климатом использование этанола проблематично, так как смесь бензина или дизельного топлива с этанолом при низких температурах неизбежно расслаивается [Szczodrak, 1996; Saini, 2015].

(4) в качестве прекурсора для получения водорода [Kumar, 2015; Sanchez, 2019; Iulianelli, 2020].

1.6.3 Сырьё и технология получения биоэтанола

Промышленно этанол получают двумя путями: биотехнологическим (путем спиртового брожения) и синтетическим (путем каталитической гидратации этилена). Около 7 % этанола производится синтетическим путем [Варфоломеев, 2010; Варфоломеев, 2017], но из-за высокой цены на этилен и низкой конверсии этилена (менее 5 %) это производство неуклонно сокращается [Gao, 2019]. В России в настоящее время есть единственный производитель синтетического этанола – АО «Новокуйбышевская нефтехимическая компания».

Наиболее распространенным способом получения этанола является спиртовое брожение, а этанол, полученный им принято называть биоэтанолом. В 2019 году мировой объем производства биоэтанола составил 110 млрд л [Ethanol... 2020], и предполагается, что в 2022 году он достигнет 140 млрд л [Sharma, 2020].

Кроме биоэтанола к биотопливам относят биобутанол, биодизель, метан, водород и синтез-газ. Существует классификация биотоплив на 4 поколения, критерий – природа сырья.

Биоэтанол первого поколения

Традиционно биоэтанол получают из пищевого сырья, то есть сахаросодержащих источников (сахарного тростника, сахарной свеклы, мелассы из обоих видов сырья) и крахмалсодержащих источников (зерна, в мировом масштабе преимущественно из кукурузы, картофеля; маниоки). Это сырьё относится к первому поколению, а получаемый биоэтанол называется

биоэтанолом первого поколения [Варфоломеев, 2017]. 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 [Яровенко, 1981; Яровенко, 2002; Гельфанд, 2012]. Более чем 90 % производимого биоэтанола относят к первому поколению. Лидером является США (сырьё – кукуруза), на втором месте Бразилия (сырьё – сахарный тростник) [Chen H., 2016].

Использование сырья первого поколения для производства биоэтанола требует возделываемых земель, поэтому конкурирует с пищевым и кормовым производствами, то есть отрицательно сказывается на продовольственной безопасности [Sharma, 2020; Aro, 2016].

Биоэтанол второго поколения

Биоэтанол второго поколения получают из целлюлозосодержащего, то есть непищевого сырья: энергетических культур, агропромышленных отходов (солома, жмых, жом), древесной биомассы, твердых бытовых отходов [Aro, 2016; Abdullah, 2019]. В настоящее время объем производства биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья составляет менее 3 % от общего объема производства биоэтанола [Sharma, 2020].

Биоэтанол третьего поколения

К третьему поколению относят биоэтанол, полученный из биомассы водорослей (макрроводорослей и микроводорослей). Для этого используются штаммы водорослей, богатые углеводами (крахмалом, гликогеном и целлюлозой): *Chlamydomonas reinhardtii*, *Porphyra*, *Chlorella vulgaris* и др. [Khan, 2018]. Коммерческому внедрению биоэтанола третьего поколения препятствуют недостаточное производство биомассы, риски загрязнения открытых водоемов водорослями, высокая стоимость производства. Затраты включают культивирование биомассы и многоступенчатую последующую переработку [Abdullah, 2019]. В РФ такая технология теоретически может быть

реализована только на юге Краснодарского края и то не круглый год, на остальных территориях температурный и световой режимы открытых водоёмов не позволят получить промышленный объём биомассы водорослей.

Биоэтанол четвертого поколения

Выделяют и четвертое поколение биоэтанола. Подразумевается использование для его получения генномодифицированных сырья и продуцентов. В основном рассматривают генномодифицированные водоросли [Aro, 2016; Abdullah, 2019]. Их использование требует строгой оценки рисков и проведения природоохранных мероприятий, поэтому большая часть исследований остается в исследовательских лабораториях [Abdullah, 2019].

Независимо от вида сырья можно выделить следующие основные стадии производства биоэтанола [Гельфанд, 2012]:

- (1) очистка сырья;
- (2) предобработка сырья с целью подготовки его к осахариванию;
- (3) осахаривание предобработанного сырья с целью получения раствора сахаров;
- (4) сбраживание сахаров в биоэтанол с помощью культур микроорганизмов;
- (5) выделение биоэтанола из бражки;
- (6) очистка биоэтанола;
- (7) переработка барды в ценные продукты.

Производство биоэтанола является классическим биотехнологическим производством, в то же время это сфера новейших исследований и прорывных достижений. Только эффективный комплекс технологических решений позволяет получить высокий выход и высокое качество продукции [Абрамова 2019; Абрамова, 2020; Абрамова, 2021; Бессонов, 2020].

Биоэтанол, предназначенный для технического применения, не должен производиться из пищевого сырья. Для России малоактуально сырьё третьего и четвертого поколения, так как оно может быть задействовано только на юге

Краснодарского края. Поэтому развитие технологий технического биоэтанола в РФ будет связано с технологиями переработки сырья второго поколения.

1.6.4 Конфигурации проведения биокаталитических стадий в технологии биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья

Поскольку целлюлозосодержащее сырьё очень сложное для переработки, то для его превращения в биоэтанол требуются стадии предварительной обработки, детоксификации, гидролиза и спиртового брожения, технологический процесс получился сложным и экономически неконкурентоспособным. Поэтому интеграция этапов обработки в различных конфигурациях были изучены с целью сокращения этапов, капиталовложений, энергопотребления.

(1) Обычно биокаталитические стадии ферментативного гидролиза целлюлозы и спиртового брожения сахаров проводят отдельно (SHF). В системе SHF гидролиз целлюлозы и гемицеллюлоз проводится отдельно, затем эти потоки смешиваются и осахаренная масса сначала направляется на сбраживание глюкозы (гексозы). После завершения брожения бражку перегоняют, и получившуюся барду отправляют на дображивание с помощью ксилососбраживающих продуцентов [Hamelinck, 2005]. Основным преимуществом этого метода является возможность проведения гидролиза и сбраживания в оптимальных для них условиях, а основным недостатком является риск ингибирования гидролиза из-за накопления сахаров в гидролизатах и риск осмотического стресса дрожжей [Kumar, 2015].

(2) Небольшая модификация процесса (SHCF) заключается в том, что пентозный и гексозный сахара получают при отдельном гидролизе гемицеллюлоз и целлюлозы, а затем оба сахара ферментируются вместе [Girio, 2010].

(3) Наиболее перспективной технологической интеграцией в производстве биоэтанола является одновременное осахаривание и сбраживание (SSF), оно широко применяется как в промышленных, так и в лабораторных

масштабах. Биокаталитические процессы проводятся в одном реакторе. Если SSF включает совместное сбраживание гексоз и пентоз, это называется одновременным осахариванием и совместной ферментацией (SSCF). SSF считается экономичным решением, он позволяет:

- использовать высокие концентрации сухого вещества;
- избежать ингибирования ферментов конечным продуктом;
- получить высокий выход этанола;
- сократить продолжительность процесса;
- снизить количество ферментов;
- снизить вероятность микробного загрязнения.

В то же время способ имеет следующие недостатки:

– высокая вязкость реакционной массы может привести к большему энергопотреблению;

– низкая эффективность перемешивания и теплопередачи;

– требование компромисса между оптимальными условиями ферментативной реакции и спиртового брожения;

– клетки продуцента смешиваются с биомассой, что затрудняет дальнейшую переработку [Mosier, 2005; Hamelinck, 2005; Chandel, 2007; Gírio, 2010; Balat, 2011; Aruwajoye, 2020; Mesa, 2011; Öhgren, 2007]

(4) Консолидированная биообработка (СВР) – это одностадийный способ, при котором в одном реакторе продуцент одновременно осуществляет ферментативный гидролиз целлюлозосодержащего сырья и его спиртовое брожение, добавление ферментных препаратов не требуется. Способ резко сокращает эксплуатационные расходы и повышает экономическую эффективность. В то же время отмечаются и следующие недостатки:

– нестабильность рекомбинантных микроорганизмов;

– низкий выход этанола;

– образование побочных продуктов (уксусной кислоты, глицерина, молочной кислоты);

– ограниченная толерантность рекомбинантных организмов к этанолу (3,5% мас./об.) [Parisutham, 2014; Kumar, 2015; Ballesteros, 1991; Song, 2018].

(5) Совместное сбраживание гексоз и ксилоз заключается в одновременном культивировании двух продуцентов (например, *Pichia stipitis* и *Saccharomyces cerevisiae*) [Taniguchi, 1997] или в применении генно модифицированных штаммов *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*, *E. coli*, способных утилизировать и гексозы, и пентозы. Однако, коммерческое использование рекомбинантных штаммов затруднено. Во-первых, несмотря на то, что сконструированные штаммы в смеси сахаров потребляют преимущественно глюкозу, что связано с отсутствием или низкой аффинностью белка-переносчика ксилозы в клетках. Во-вторых, последовательный метаболизм смешанных сахаров приводит к снижению производства этанола и конечного выхода этанола [Kim, 2010; Kim, 2012; Mishra, 2019].

(6) Иммобилизация ферментов и клеток. В производстве биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья большой вклад в ценообразование вносят дорогие ферментные препараты. Кроме того, как и в любом микробиологическом производстве, получение инокулята всегда затратно. Рециркуляция ферментов и микроорганизмов с хорошей эффективностью и минимальными потерями в свободном состоянии при использовании целлюлозосодержащего сырья невозможна. Поэтому были сделаны попытки использования иммобилизации ферментов и клеток на различных инертных носителях.

Было исследовано множество методов иммобилизации как отдельных целлюлозолитических ферментов [Verma, 2013; Zhu, 2016; He, 2018], так и многокомпонентных ферментных комплексов [Abraham, 2014; Ince, 2012]. Эти методы включают захват в полимерную матрицу, адсорбцию на твердом носителе, ковалентное связывание с твердой подложкой, аффинные взаимодействия и сшивание агрегатов ферментов или комбинации методов [Sutarlie, 2013; Zabed, 2016].

Преимуществами иммобилизации клеток считаются повышенный выход этанола, большая объемная производительность, меньшее ингибирование конечного продукта, снижение риска микробного загрязнения из-за высокой плотности клеток, снижение энергопотребления и затрат на процесс из-за более легкого извлечения, регенерации и повторного использования продукта в течение длительных периодов времени, повторное использование в периодической ферментации и защита клеток от токсических веществ [Kourkoutas, 2004; Nikolić, 2010; Maslova, 2019]. Сообщалось о нескольких носителях для иммобилизации клеток, включая кусочки яблока, гель κ-каррагинана, полиакриламид, γ-оксид алюминия, хризотил, альгинат кальция, кусочки багассы, кожуру листьев банана и апельсиновую корку [Zabed, 2014].

Наиболее распространенным микроорганизмом, используемым при ферментации, является *S. cerevisiae*. Клетки этих дрожжей можно иммобилизовать двумя основными способами, такими как иммобилизация на поддерживающем материале и иммобилизация путем самофлокуляции. Клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, фиксируют на подложке, при этом получают шарики с иммобилизованными клетками [Najafpour, 2004]. Самофлокуляция дрожжевых клеток представляет собой неполную обратимую агрегацию клеток, при которой дрожжевые клетки соединяются друг с другом и образуют хлопья [Stratford, 1989]. Эта методика более перспективна, чем иммобилизация с помощью подложек, так как технически проста и экономически конкурентоспособна, полностью устраняет контаминацию, позволяет клеткам расти без воздействия факторов внешней среды, дает возможность контролировать заданную концентрацию в реакторах и восстановление клеток дрожжей путем продувки реакторов [Bai, 2008].

(7) Использование высокой концентрации субстрата.

В большинстве случаев использование высоких концентраций субстрата считается базовым подходом, так как повышается концентрация сахара после гидролиза, а, следовательно, и концентрация этанола, что соответствует технико-экономическим требованиям крупномасштабного производства

этанол [Modenbach, 2013; Koppram, 2014; López-Linares, 2014; Wang, 2016; Zabed, 2016; Tan, 2020]. Увеличение концентрации этанола, производимого с единицы сырья за счёт использования высокой загрузки твердых веществ, приводит к снижению потребления энергии и производственных затрат, связанных с последующей обработкой (дистилляцией) при извлечении этанола [Humbird, 2010]. Рассчитано, что экономически целесообразной является концентрация этанола в бражке 4% (масс./масс.) и более, что может быть достигнуто при условии наличия не менее 8% (масс./масс.) глюкозы в гидролизате. Создание такой концентрации глюкозы требует использования $\geq 20\%$ (масс./масс.) исходной загрузки твердым веществом для последующего ферментативного гидролиза целлюлозы [Larsen, 2008].

Однако, чрезмерно высокие концентрации твердых частиц в реакционной массе создают некоторые фундаментальные проблемы, влияющие на эффективность всего процесса конверсии. Эти проблемы включают увеличение вязкости среды, повышение концентрации ингибиторов, плохой массообмен, ингибирование дрожжевых клеток, снижение выхода и продуктивности [Wang, 2016]. Поэтому большинство исследований по получению этанола из целлюлозосодержащего сырья ограничивались исходной загрузкой твердого вещества 10–20%. Эта концентрация твердых веществ, намного ниже по сравнению с концентрациями, используемыми при производства этанола из пищевого сырья. Например, при производстве этанола из кукурузы используется загрузка 25–30% твердых веществ [Zabed, 2016 a]. В литературе есть несколько примеров использования концентрации твердых веществ от 10% до 40% при производстве этанола из целлюлозосодержащего сырья, при этом эффективность обратно пропорциональна концентрации субстрата [Modenbach, 2013].

Для преодоления данной проблемы предложено использовать подпитку в процессах ферментативного гидролиза, либо ферментативного гидролиза, совмещенного со сбразиванием [Paulová, 2014; Unrean, 2016; Raj, 2019].

1.6.5 Примеры действующих производств биоэтанола второго поколения

В 2018 году мировой объем производства биоэтанола составил 110 млрд л [Ethanol... 2020], большая часть была произведена в США (56%), за ними следуют Бразилия (28%), ЕС (5%) и Китай (4%) [Renewable...15.07.2019]. Заводы, работающие на целлюлозосодержащем сырье имеются в Европе, США, Бразилии и Китае, но фактическое производство целлюлозного этанола на сегодняшний день значительно ниже проектной мощности [Padella, 2019], табл. 1.3. Объем производства биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья составляет менее 3 % от общего объема производства биоэтанола [Sharma, 2020], в СССР объём гидролизного спирта составлял 5 % от общего выпуска этанола в стране [Холькин, 1989].

В Дании (г. Скербек), компания Inbicon A/S разработала интегрированную систему утилизации биомассы, согласно которой предобработка осуществляется с помощью пара в непрерывном режиме, осахаривание с помощью ферментов, целлюлоза конвертируется в биоэтанол при совместном осахаривании-сбраживании, гемицеллюлоза переходит в кормовую патоку, лигнин трансформируется в высококачественное твердое биотопливо, которое обеспечивает технологическую энергию. В качестве сырья могут быть использованы пшеничная и кукурузная солома, багасса, другие отходы. Сырьё измельчается до размеров 5-10 см и подвергается термообработке паром при температуре 180-200 С в течение 5-15 минут, далее промывается. Заявлено, что никаких химикатов не используется, но для подкисления до заданного рН используется уксусная кислота. Предобработанная масса в концентрации 20-40 % смешивается с ферментными препаратами в барабанном устройстве, то есть перемешивание осуществляется под действием силы тяжести. Концентрация сухих веществ в осахаренной

Таблица 1.3 – Заводы по производству целлюлозного этанола [Padella, 2019]

Компания	Проект	Страна	Проект-ная мощность (тыс. тонн)	Состояние	Год запуска
Abengoa Bioenergy Biomass of Kansas, LLC	Commercial (acquired by Synata Bio Inc. [21])	США	75	в простое	2014
Aemetis	Aemetis Commercial	США	35	в разработке	2019
DuPont	Commercial facility Iowa (acquired by VERBIO [23])	США	83	в простое	2016
Fiberight LLC	Commercial Plant	США	18	в разработке	2019
Ineos Bio	Indian River County Facility (acquired by Alliance Bio-Products in 2016 [24])	США	24	в простое	нет данных
POET-DSM Advanced Biofuels	Project Liberty	США	75	действующий	2014
GranBio	Bioflex 1	Бразилия	65	действующий	2014
Raízen Energia	Brazil	Бразилия	36	действующий	2015
St1 Biofuels Oy in cooperation with North European Bio Tech Oy	Cellunolix®	ЕС (Финляндия)	40	в разработке	2020
Maabjerg Energy Concept Consortium	Flagship integrated biorefinery	ЕС (Дания)	50	в простое	2018
Enviral	Clariant Slovakia	ЕС (Словакия)	50	в разработке	2021
Clariant	Clariant Romania	ЕС (Румыния)	50	в разработке	2020
Borregaard Industries AS	ChemCell Ethanol	Норвегия	16	действующий	1938
Beta Renewables (acquired by Versalis)	Alpha	США	60	в простое	2018
Beta Renewables (acquired by Versalis)	Energochemica	ЕС (Словакия)	55	в простое	2017
Beta Renewables (acquired by Versalis)	IBP-Italian Bio Fuel	ЕС (Италия)	40	в простое	2013
Beta Renewables (acquired by Versalis)	Fujiang Bioproject	Китай	90	в простое	2018
COFCO Zhaodong Co.	COFCO Commercial	Китай	50	в разработке	2018
Henan Tianguan Group	Henan 2	Китай	30	в простое	2011
Longlive Bio-technology Co. Ltd.	Longlive	Китай	60	в простое	2012
Кировский биохимический завод	СССР [Холькин, 1989]	Россия	16	действующий	1973

массе составляет 18 %, концентрация этанола 5-6 %. Энергоэффективность достигается за счёт интеграции с электростанцией, которая ранее работала на соломе пшеницы, сжигая 800 000 т/год. Все теплообменные процессы замкнуты. По технико-экономическим показателям биоэтанол соответствует мировому уровню – 0,43 евро/литр (2,40 долл. США/гал.). Если бы не было собственной электростанции, стоимость составила бы 0,71 евро/л [Larsen, 2008].

В Китае (провинция Цзилинь, г. Суньюань) успешно реализован промышленный проект с объемом производства биоэтанола 20 000 т/год, сырьё – кукурузная солома. За базу принята интегрированная технология, включающая паровой взрыв сырья, синергетическое действие ферментных препаратов, производимых на месте, через 24 гидролиза вводились генномодифицированные дрожжи *S. cerevisiae* IPE005. Совместное брожение гексоз и пентоз позволило увеличить выход биоэтанола на 41 % по сравнению с использованием только гексоз. Бражка концентрацией 4 % направляется на перегонку, а жидкая барда – на метановое брожение с получением сжатого природного газа. Твердый остаток, на 75% состоящий из лигнина, направляется на получение лигнинового пластикового композитного материала. Полученный пластик (с полиэтиленом, полипропиленом, поливинилхлоридом или полистиролом) используется для получения ламинированных изделий для изготовления мебели, пола, строительных панелей. Заявлено, что производство является высокоэффективным и экологически чистым. Товарной продукцией является этанол 20 000 т/год; сжатый природный газ 1 000 000 м³/год и лигниновый пластиковый композитный материал 60 000т/год. Без попутной продукции общая стоимость производства этанола составила бы 6888 юаней/т, но с учётом попутной продукции она составила 5571,6 юаней/т [Chen H., 2016].

В России ООО «Кировский биохимический завод» работает по классической гидролизной технологии [Холькин, 1989] и производит кормовые дрожжи, технический спирт, технический фурфурол и топливные пеллеты. Цена биоэтанола составляет 260 руб/л [Кировский...02.04.2021].

В 2002 г. Бэджер [Badger, 2002] представил общий обзор производства этанола из целлюлозы в США, в котором он пришел к выводу, что «хотя несколько процессов получения этанола из целлюлозы технически осуществимы, трудно достичь рентабельных процессов». Этот же вывод сделали [Hamelinck, 2005; Chandel, 2007; Banerjee, 2010; Kumar, 2016; Taha, 2016; Liu, 2019; Padella, 2019]. Целлюлозный этанол по-прежнему неконкурентоспособен по сравнению с обычным этанолом, только полная переработка в коммерческие продукты целлюлозной, гемицеллюлозной и лигнинной фракций сырья позволяет сделать производство экономически целесообразным.

1.6.6 Экологические аспекты производства биоэтанола

Считается, что по сравнению с этанолом первого поколения этанол второго поколения обеспечивает более высокие показатели с точки зрения сокращения выбросов **парниковых газов (ПГ)** и низкой риск прямого и косвенного изменения землепользования. Эти преимущества привели к продвижению целлюлозного этанола в законодательстве по всему миру.

В Евросоюзе действуют Директива о возобновляемых источниках энергии (RED) и Директива о качестве топлива (FQD) [Padella, 2019], согласно которым с целью сокращения выбросов ПГ биоэтанол является обязательным компонентом моторных топлив, при этом приоритетным признано использование биоэтанола второго поколения.

Топливо классифицируется как передовое если сокращение выбросов ПГ составляет не менее 50 % по сравнению с ископаемым топливом. Целлюлозное биотопливо является усовершенствованной подкатегорией биотоплива: сокращение парниковых газов не менее 65%. Программа Renewable Fuel Standard (RFS) требовала использования 36 миллиардов галлонов биотоплива к 2022 году, из которых не менее 16 миллиардов галлонов должно приходиться на целлюлозное биотопливо. Однако, каждый год Агентство по охране окружающей среды (EPA) использовало свои «полномочия по отказу от

целлюлозы», чтобы снизить целевой показатель производства целлюлозного биотоплива. В 2014 году ЕРА также пересмотрело определение термина «целлюлозное биотопливо», расширив его определение, включив в него определенные виды биогаза и этанола из зерна кукурузы [Padella, 2019].

В США, Бразилии и Китае тоже действуют программы поддержки целлюлозного биотоплива. В Китае «План реализации расширения производства этанола и продвижения транспортного топлива» заключается в переходе на целлюлозное топливо к 2025 году. Производство целлюлозного этанола субсидируется в размере 600 юаней (юаней) за тонну (около 78 евро за тонну) с 2014 г. [Kim, 2018].

Методология расчета выбросов ПГ «жизненного цикла» установлена Директивой в Приложении V, часть С. Выбросы ПГ рассчитывают, принимая во внимание все выбросы, связанные со всеми этапами производства и использования биотоплива, от выращивания сырья до переработки в биотопливо, а также транспортировки и распределения всех продуктов.

Общие выбросы ПГ называются «прямыми выбросами». Директива включает список значений выбросов ПГ по умолчанию для основных видов биотоплива, которые экономические операторы могут использовать только в том случае, если биотопливо производится без прямого изменения землепользования. Значение по умолчанию, связанное с целлюлозным этанолом из пшеничной соломы и многолетних трав, составляет 16 г CO₂ экв/МДж, что по сравнению с показателями ископаемого топлива приводит к сокращению выбросов ПГ на 83% [Padella, 2019].

Кроме прямых выбросов учитывают выбросы ПГ, связанные с изменением запасов углерода земли при землепользовании – косвенные выбросы. Если стоит задача увеличения производства биоэтанола, то в случае биоэтанола первого поколения, пахотные земли ранее использовавшиеся для производства продуктов питания, будут использованы для производства биотоплива. Это называется косвенным изменением землепользования и в этом случае косвенные выбросы ПГ могут быть значительными.

Непродовольственное сырьё также может оказывать влияние на изменение землепользования и на косвенные выбросы [Valin, 2015; Searle, 2017].

Выбросы от изменения землепользования, рассчитанные с помощью GLOBIOM (Модель глобального управления биосферой) [Valin, 2015], связанные с увеличением спроса на этанол на основе соломы зерновых культур в Евросоюзе, соответствуют 16 г экв CO₂ / МДж этанола (при условии 20-ти летней амортизации) в случае неустойчивого удаления соломы (более 33-55 %) и 0 г CO₂ экв/МДж в случае устойчивого удаления соломы (менее 33-50 % от общей биомассы соломы). Эти выбросы связаны с использованием новых пахотных земель для дополнительного производства зерновых и уносе органического углерода из почвы при глубоком удалении растительных остатков [Valin, 2015].

Таблица 1.4 – Расчетные выбросы парниковых газов (прямые и косвенные), связанные с производством целлюлозного этанола из соломы зерновых культур и многолетних культур

Сырьё	Выбросы, г CO ₂ экв/МДж		
	прямые [Padella, 2019]	косвенные [Valin, 2015]	косвенные [Searle, 2017]
пшеничная солома	16	16 в случае неустойчивого удаления соломы (более 33–50 %) 0 в случае устойчивого удаления соломы (менее 33–50 %)	8 перемещенные виды использования: подстилка и корма для скота; выращивание грибов; садоводство; сжигание
многолетние травы (мискантус и просо)	16	-12	0

Для энергетических культур/многолетних трав расчет выбросов в результате изменения землепользования зависит от того, какой тип земли используется для их производства (существующие сельскохозяйственные земли, целинные земли, или земли с высоким содержанием углерода, такие как леса) [Searle, 2018]. Выбросы от изменения землепользования, оцененные по модели GLOBIOM [Valin, 2015] для этанола отрицательны (-12 г CO₂ экв/МДж),

что указывает на то, что изменение землепользования от этих культур фактически снижает выбросы ПГ по сравнению с базовым случаем без них, в основном из-за увеличения запаса углерода в почве, где они выращиваются [Valin, 2015; Searle, 2017]. В основном энергетические культуры возделывают на заброшенных малопригодных для агропроизводства землях, поэтому углеродный баланс для них отрицательный [Searle, 2018]. Прямые и косвенные выбросы для целлюлозных сельскохозяйственных отходов энергетических культур приведены в табл. 1.4.

1.7 Передовое биотехнологическое производство бактериальной наноцеллюлозы

1.7.1 Продуценты бактериальной наноцеллюлозы и их метаболизм

1.7.1.1 Продуценты и сборка бактериальной наноцеллюлозы

К синтезу БНЦ способны бактерии родов *Gluconacetobacter*, *Aerobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* и *Alcaligenes* [Jonas, 1998], *Dickeya*, *Rhodobacter*, *Achromobacter*, *Salmonella* [Deinema, 1971; Morgan, 2013; Jahn, 2011], *Lactobacillus* [Khan, 2020] кроме того, методами геной инженерии получены БНЦ-синтезирующие штаммы родов, природно не обладающие этой способностью, например *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium* [Zogaj, 2001].

Наиболее продуктивным является *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*, ранее *Acetobacter xylinus*). Собственно, именно для этого рода и была впервые обнаружена способность к синтезу БНЦ, он является модельным микроорганизмом для изучения механизма синтеза БНЦ и в настоящее время наиболее хорошо изучен и описан. Это грамотрицательная аэробная палочковидная бактерия, открытая Брауном (1886). Браун выделил чистую культуру из *Mycoderma aceti* («мать уксуса») и предложил назвать *Acetobacter xylinum* [Brown, 1886; Lee, 2014]. В честь доктора Кадзуо Комагаты, внесшего

большой вклад в систематику уксуснокислых бактерий в 2012 году *G. xylinus* был переименован в *Komagataeibacter xylinus* [Yamada, 2012]. Продуктивность этого рода необычайно высока. Одна бактерия *Komagataeibacter xylinus* способна полимеризовать 200 000 молекул глюкозы в цепи β -1,4-глюкана и при этом упорядочивать полимерные цепи в нановолокна за 1 секунду [Chen НН, 2011].

БНЦ является экзополисахаридом, биосинтез можно разделить на две стадии: (I) полимеризация молекул глюкозы в полимеры целлюлозы, нити БНЦ образуются между цитоплазматической и внешней мембранами клеток и (II) самосборка полимерных цепей целлюлозы в кристаллические нановолокна [Zhong, 2020]. После внутриклеточной полимеризации цепи БНЦ выталкиваются бактериями из клеточной мембраны, после чего происходит процесс самосборки [Huang, 2014; Ross, 1991; Ruka, 2013].

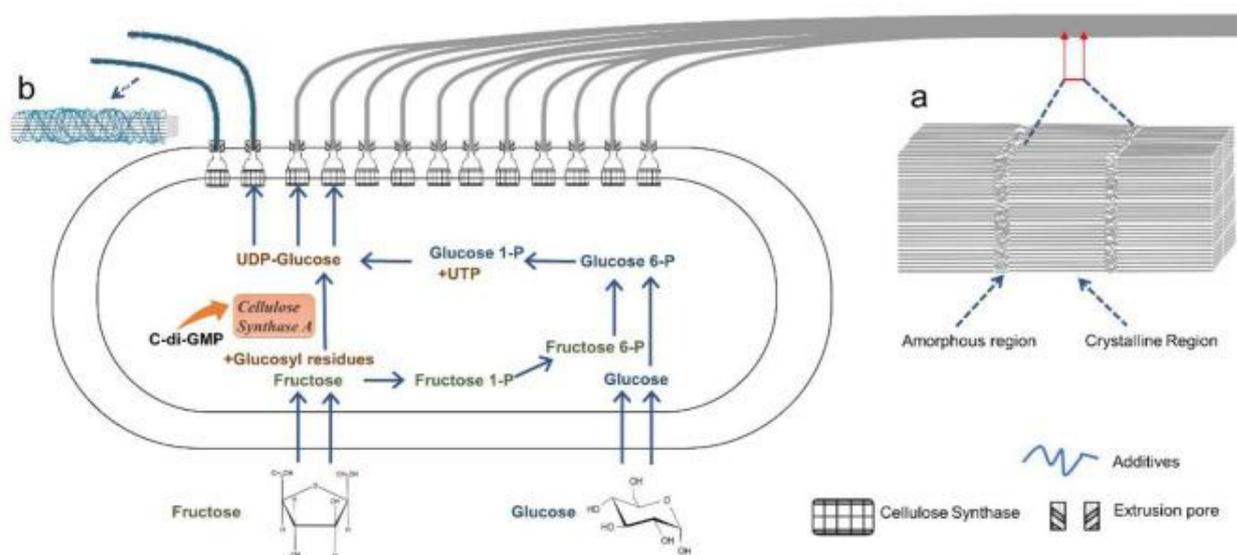


Рисунок 1.4 – Схематическое изображение внутриклеточного биосинтеза молекул БНЦ и внеклеточной сборки молекул целлюлозы в нановолокна бактерией а – лентообразные нановолокна при стандартной ферментации, б – рыхлые волокна при ферментации с добавками [Zhong, 2020]

Бактерию *Komagataeibacter xylinus* Чжун [Zhong, 2020] сравнивает с ракетной подводной лодкой, на которой установлено 50–80 терминальных комплексов, выровненных вдоль длинной оси бактериальной клетки (рис.1.4, рис. 1.5; [Kimura, 2001; Hirai, 2002; Krasteva, 2017]). Цепи полимера целлюлозы

распыляются из терминальных комплексов, а затем самоорганизуются в полукристаллические нановолокна. Это происходит в два этапа: на первом молекулы целлюлозы, выдавленные из одной и той же экструзионной поры, сначала собираются в единое элементарное нановолокно шириной и толщиной около 1,5 нм (так называемые протофибриллы или нанофибриллы) [Ross, 1991]; на втором этапе элементарные нановолокна собираются в ленточное нановолокно (фибриллы или ленты) толщиной 2–4 нм и шириной 70–80 нм [Vitta, 2021; Portela, 2019; Klemm, 2020].

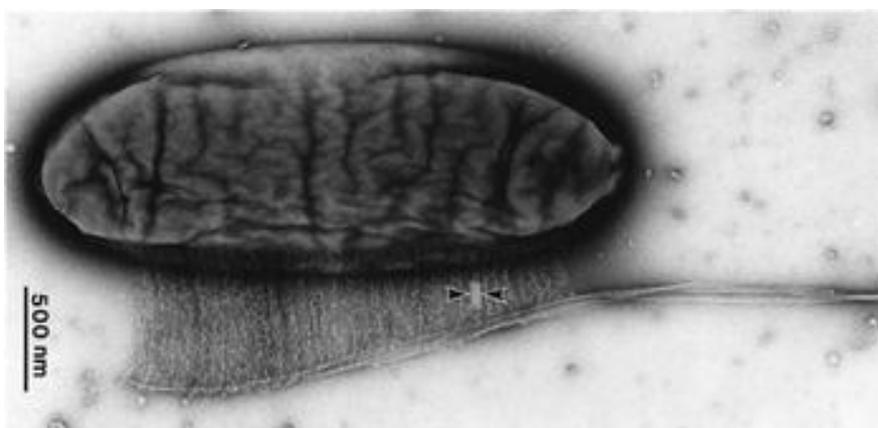


Рисунок 1.5 – Сканирующая электронная микроскопия бактерий *Komagataeibacter xylinus*, продуцирующих целлюлозное волокно. Между остриями стрелок показана прядь БНЦ (шириной 24 нм), далее из прядей собирается лента [Hirai, 2002]

Наноразмерные ленты далее переплетаются в трехмерную неупорядоченную сеть – это важнейшее характерное свойство БНЦ, отличающее её от всех других видов целлюлоз (рис. 1.6). Учитываются и размер лент, и размер образуемых при их переплетении пор [Zaar, 1979].

Физиологически трехмерная неупорядоченная сеть БНЦ необходима для создания гелеобразной пленки (называемой также гидрогелем, гель-плёнкой, гидрогелевым телом, пелликулой [Gama, 2013; Klemm, 2018]. Гель-плёнка всплывает на поверхность культуральной среды при статической ферментации.

Уксуснокислые бактерии синтезируют гель-плёнку для обеспечения своих жизненных потребностей, и так как это неподвижные палочки, к тому же строгие аэробы, гель-плёнка им необходима для: обеспечения кислородом

[Gromet, 1957], защиты от ультрафиолета [Williams, 1989], защиты от посторонней микрофлоры [Cannon, 1991], защиты от высыхания [Portela et al., 2019], защиты от механических повреждений [Portela et al., 2019], защиты от ионов тяжелых металлов [Iguchi, 2000], улучшения переноса питательных веществ путем диффузии [Iguchi, 2000].

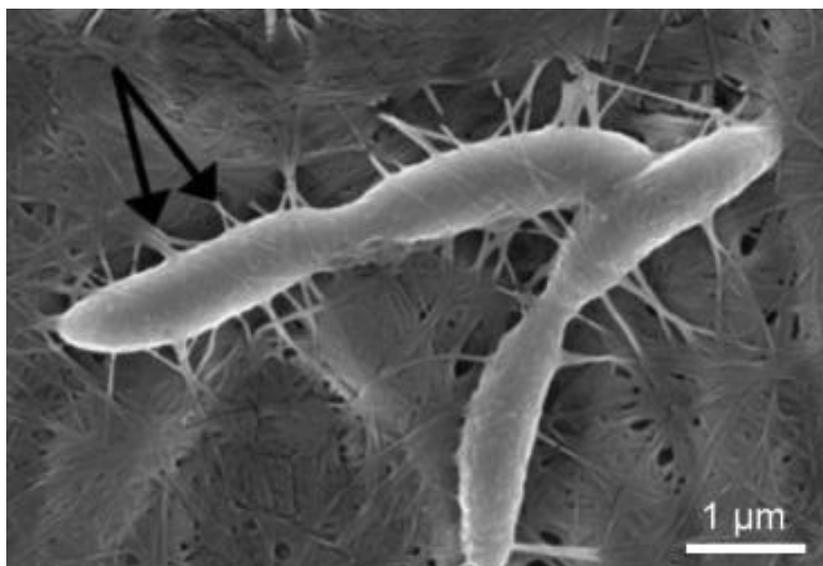


Рисунок 1.6 – Бактерии *Komagataeibacter*, образующие нановолокна и ленты БНЦ [Klemm, 2011]

Известно, что при статическом культивировании БНЦ формируется в виде слоёв, ориентированных параллельно границе раздела культуральной жидкости и воздуха [Borzani, 1995]. Расстояние между слоями составляет от 3-10 мкм [Pircher, 2014] до 50 мкм [Chen P, 2010]. Биосинтез БНЦ подробно описан в работах [Brown, 1987; Brown, 2000; Delmer, 1982; Delmer, 1995; Delmer, 1999; Römling, 2013; Römling, 2015; Ross, 1985; Ross, 1991; Suresh, 2018; Tonouchi, 1996; Wanichapichart, 2002; Wong, 1990;]. В работе [Gromovykh, 2020] исследовано формирование тонкой внутренней структуры БНЦ. Высокие скорости биосинтеза БНЦ вызывают формирование уплотнений, которые затем приводят к образованию плотных листов БНЦ и разделению их на слои, то есть к формированию анизотропной структуры гель-плёнки. При медленных скоростях биосинтеза, диффузия разрушает уплотнения, в результате

организация структуры БНЦ становится более изотропной. Интересно, что слоистые структуры получены также в условиях перемешивания.

1.7.1.2 Метаболизм *Komagataeibacter xylinus* и биосинтез бактериальной наноцеллюлозы

В 1991 г. Росс описал механизм биосинтеза, биохимизм и генетические особенности, при этом сравнил биохимию синтеза целлюлозы у бактерий, растений и водорослей [Ross, 1985, Ross, 1991].

Выделяют четыре биохимических реакции биосинтеза БНЦ в клетках (рис. 1.4, рис. 1.7):

(1) молекула глюкозы сначала превращается в глюкозо-6-фосфат (глюкозу 6-Р) гексокиназой (АТФ-зависимой);

(2) молекула глюкозы 6-Р изомеризуется в глюкозо-1-фосфат (глюкозу 1-Р) фосфоглюкомутазой (ЕС 5.4.2.2);

(3) молекула глюкозы 1-Р реагирует с уридинтрифосфатом (УТФ) с образованием уридиндифосфатглюкозы (UDP-глюкоза), которая катализируется пирофосфорилазой (ЕС 2.7.7.9). Первые три стадии осуществляются Mg^{2+} -зависимыми ферментами;

(4) УДФ-глюкозы окончательно полимеризуются в линейные цепи β -1,4-глюкана, что катализируется целлюлозосинтазой.

[] Неспособность клетками *Komagataeibacter xylinus* усваивать глюкозу анаэробно объясняется недостатком фосфофруктокиназы, фермента, требуемого для гликолиза. Кроме образования БНЦ в клетках *Komagataeibacter xylinus* могут протекать биохимические превращения по пути гликолиза, циклу Кребса, пентозо-фосфатному циклу, а через 2,5-кетоглюконат может синтезироваться глюконовая кислота (рис. 1.7). Выбор клетками пути метаболизма зависит от их физиологического состояния, которые, в свою очередь, зависят от условий культивирования. При использовании в качестве источника углерода дисахаридов (сахарозы, мальтозы, в некоторых случаях лактозы), биосинтез начинается с их гидролиза [Ефременко, 2017].

Биосинтез БНЦ можно регулировать метаболически. Так, добавление этанола увеличивает активность гексокиназы и глюкозо-6- фосфатдегидрогеназы, в результате повышается синтез глюкозо-6-фосфата и снижается образование глицерина (главного побочного продукта), в результате повышается выход БНЦ. Добавление цитрата натрия уменьшает активность фосфофруктокиназы и пируваткиназы, но повышает активность пируватдегидрогеназы, что снижает накопление уксусной и пировиноградной кислот в процессе гликолиза и снижает накопление лимонной кислоты в цикле трикарбоновых кислот, в результате ускоряется синтез БНЦ. Уксусная кислота, глицерин, оксалоацетат превращаются клетками в пируват, а пируват входит в глюконеогенезный путь.

При биосинтезе БНЦ избыток кислорода приводит к образованию лимонной кислоты, при этом снижаются концентрации ацетил-СоА и оксалоацетата. В результате низкой растворимости кислорода ингибируется синтез цитохрома α , следовательно, ингибируется окислительное фосфорилирование и образование АТФ. Это создает дисбаланс окислительно-восстановительного потенциала, что в свою очередь, приводит к накоплению органических кислот. Кислоты усиливают ингибирование АТФ, вследствие чего клетки растут медленно и производят меньше целлюлозы [Li, 2012; Yunoki, 2007].

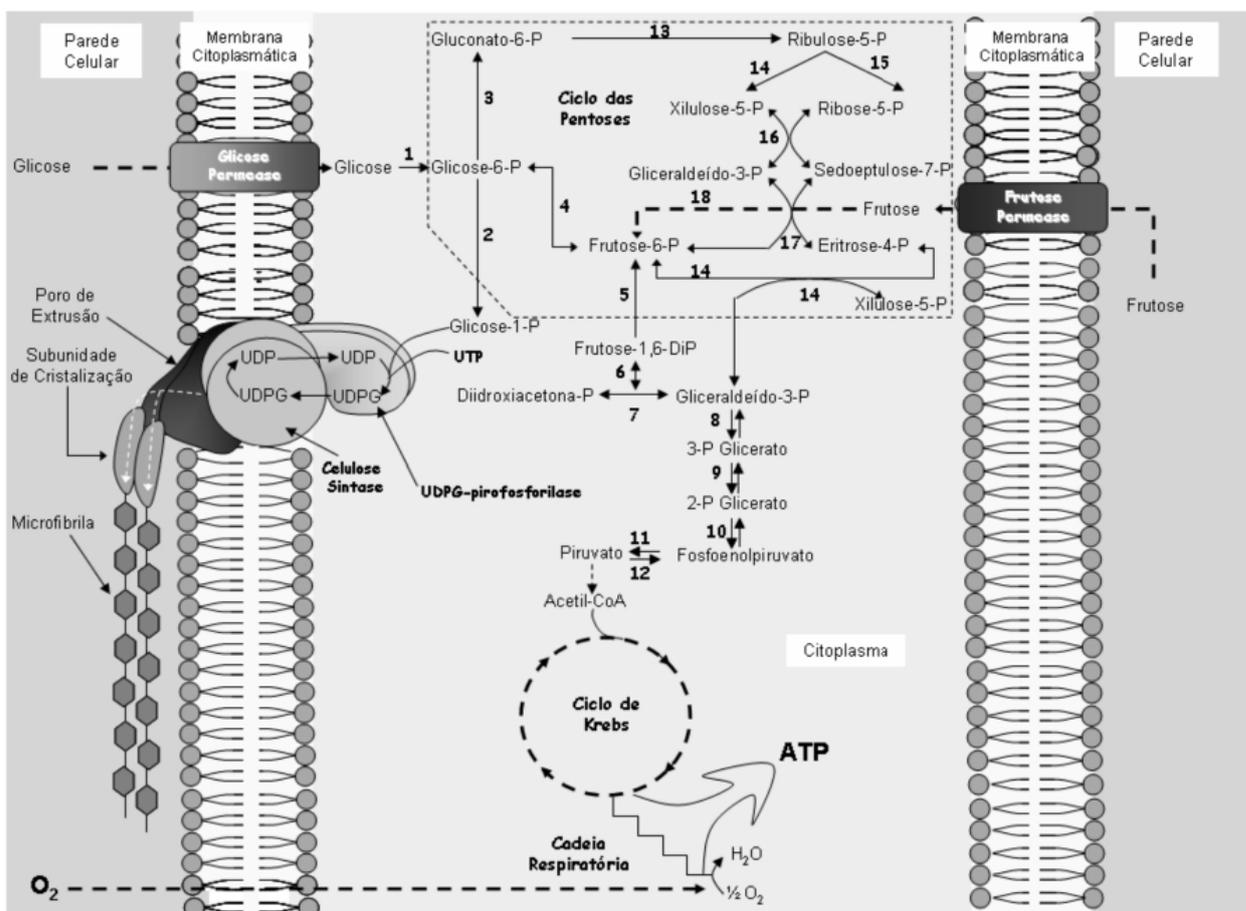


Рисунок 1.7 – Гипотетическая модель метаболического пути биосинтеза целлюлозы *K. xylinus*. Глюкокиназный АТФ (1); фосфоглюкомутаза (2); глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (3); фосфогликоизомераза (4); фруктокиназа АТФ (5); альдолаза (6); триозофосфатизомераза (7); глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (8); фосфоглицератомутаза (9); энолаза (10); пируваткиназа (11); пируватдифосфаткиназа (12); 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (13); фосфоррибулозоэпимераза (14); фосфоррибулозоизомераза (15); трансцеттолазы (16); трансальдолаза (17); фруктокиназа (18); пируватдегидрогеназа (19) [Donini, 2010].

1.7.1.3 Повышение продуктивности продуцентов бактериальной наноцеллюлозы

Низкий выход БНЦ обусловлен тем, что для многих продуцентов БНЦ не является целевым метаболитом [Ефременко, 2017]. Анализ литературы показывает, что можно выделить следующие пути повышения эффективности продуцентов: отбор и выделение природных активных продуцентов, генетическое конструирование новых штаммов, использование высококонцентрированных популяций.

Отбор и выделение природных активных продуцентов

Основным природным объектом для выделения чистых культур высокопроизводительных продуцентов БНЦ – уксуснокислых бактерий рода *Komagataeibacter*– является симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* [пат. РФ 2464307; пат. РФ 2568605; пат. РФ 2681281; пат. РФ2523606; Петухова, 2016; Ревин, 2020; Фан Ми Хань, 2012; Фан Ми Хань, 2013]

]. Традиционно основными питательными средами для культивирования *Medusomyces gisevii* были кокосовая вода или кокосовое молоко с получением ната-де-коко или питательная среда раствора сахарозы или глюкозы с экстрактом черного чая с получением ферментированного освежающего напитка. Кроме того, чистые культуры продуцентов БНЦ выделяют с поверхности гниющих фруктов и овощей (винограда, дынь, яблок, бананов, лимонов, личи, слив, мамоа, арбузов, мангустина, папайи, зловонного цветка страсти), отходов производства уксуса, где целлюлозосинтезирующие штаммы является посторонней нежелательной микрофлорой, испорченного вина, кокосового вина тодди (мнази) и воды для мытья храма (в Индии) [Lin, 2020; Rangaswamy, 2015].

Оптимальная температура для *K. xylinus* составляет около 30 ° С [Son, 2001], поэтому естественной средой обитания для культуры являются страны Юго-Восточной Азии, такие как Филиппины, Индонезия, Вьетнам и Таиланд.

В более северных широтах среднегодовая температура слишком низкая для продуцента, на производстве для поддержания необходимой температуры требуется энергия. Однако, высокая температура предпочтительна и для посторонней микрофлоры, а развитие последней приводит к проблемам с безопасностью пищевой ната-де-коко, снижает производственные мощности и загрязняет окружающую среду. Поэтому китайские микробиологи вывели мезофильный штамм, он работает при температуре 10–20 ° С и отличается высокой производительностью [Zhong, 2009].

Генетическое конструирование новых штаммов

Для получения высокопроизводительных штаммов БНЦ используются традиционные методы мутагенеза: УФ-излучением [Hungund, 2010], этилметансульфонатом [Hungund, 2010], обработкой высоким гидростатическим давлением [Wu, 2010] и разрушением целлюлазы [Nakai, 2013]. Также используют методы генетического конструирования. В основном работают с *Komagataeibacter xylinus* [Valla, 1989; Ishida, 2002; Fang, 2015; Florea, 2016; Caro-Astorga, 2021]. Кроме того, описано получение целлюлозсинтезирующих *Escherichia coli* [Buldum, 2018] и *Salmonella typhimurium* [Zogaj, 2001].

В динамических условиях исследователи неоднократно регистрировали внезапное снижение у штаммов продуцентов способности к синтезу БНЦ с повышением образования побочных продуктов биосинтеза и увеличением накопления клеточной биомассы или полную потерю к синтезу БНЦ, что было честно описано [Krystynowicz, 2002; Moon, 2006; Ha, 2008; Nguyen, 2008]. Здесь есть противоречия, так [Aydin, 2009] утверждает, что при увеличении скорости мешалки возрастает доля целлюлозоотрицательных мутантов, а [Jung, 2005] пишет, что при высоких скоростях вращения (более 500 об / мин) и при использовании *K. hansenii* целлюлозоотрицательных мутантов не образовывалось. Это большая производственная проблема, для её преодоления было предпринято попытки коммерческого использования побочных продуктов биосинтеза [Krystynowicz, 2002; Ha, 2008], либо использовать генетически модифицированные штаммы, не образующие побочных продуктов [Kouda, 1997; Naritomi, 2002]. Сообщается об успешном создании штаммов, стабильно работающих в условиях аэрации [Toyosaki, 1995; Hwang, 1999].

Вопрос стабильности работы генномодифицированных штаммов в производственных условиях, в течение длительного времени, остаётся открытым, так как большинство действующих производств работают с природными штаммами, полученными методами отбора [Zhong, 2020]. В то же время, работы по созданию новых, высокопродуктивных, стабильно работающих генномодифицированных штаммов продуцентов БНЦ

продолжаются [Florea, 2016; Caro-Astorga, 2021], ведь именно этот подход принёс огромные достижения в самых разных биотехнологических производствах.

Использование высококонцентрированных популяций

Аллостерический регулятор целлюлозосинтазы – (3'→5') циклическая димерная гуаниловая кислота (или c-di-GMP) – является основным активатором биосинтеза БНЦ в уксуснокислых бактериях, как было открыто в 1987 г. Было показано, что c-di-GMP регулирует образование биопленок, подвижность, вирулентность, клеточный цикл, дифференцировку и другие процессы. Большинство c-di-GMP-зависимых сигнальных путей контролируют способность бактерий взаимодействовать с абиотическими поверхностями или с другими бактериальными и эукариотическими клетками [Römling, 2013]. Образование целлюлозных биоплёнок – это древнейший способ взаимодействия бактерий с окружающей средой, как с неживыми поверхностями, так и с эукариотическими клетками. При широком рассмотрении эти взаимодействия приводят к колонизации почвы, развитию патогенов внутри и вне клеток хозяев, определяют вирулентность этих патогенов, определяют переход острого заболевания в хроническую форму при формировании целлюлозной плёнки. Уксуснокислые бактерии использовались как модель для изучения формирования биоплёнок [Nikolaev, 2007; Römling, 2015].

c-di-GMP может увеличивать биосинтез БНЦ клетками *K. xylinus* в 100 раз [Römling, 2015]. Бактерии воспринимают и реагируют на сигналы окружающей среды посредством кворумного ответа. Поэтому, использование для синтеза БНЦ не растущих, а уже сформированных высококонцентрированных популяций клеток позволяет создавать повышенную концентрацию c-di-GMP, что приводит к активации синтеза БНЦ [Ефременко, 2017].

Иммобилизация клеток позволяет создавать и поддерживать высокие концентрации клеток в реакционной среде. Собственно, образование плёнки уксуснокислыми бактериями и есть пример самоиммобилизации.

Принцип иммобилизации способствует биосинтезу БНЦ в плёночном биореакторе, что было предложено в США [Cheng K.-C., 2009; Cheng K.-C., 2011], после чего производительность была существенно повышена в РФ за счёт применения авторских подложек для иммобилизации [Efremenko, 2011; Efremenko, 2012; Stepanov, 2018; Maslova, 2019].

1.7.1.4 Продуцент *Medusomyces gisevii*

Природным примером высококонцентрированной популяции является симбиотическая культура *Medusomyces gisevii*. Низкая стабильность индивидуальных штаммов в производственных условиях (многokrратно зарегистрированы спонтанное снижение или полная потеря целлюлозосинтезирующей способности продуцентов) побуждает исследователей искать новые продуценты. Один путь – стабилизация работы штаммов методами геной инженерии, другой – использование консорциумов. *Medusomyces gisevii* является природным крайне консервативным и в то же время крайне устойчивым консорциумом. Консорциумы обладают высоким адаптивным потенциалом, а за счёт координированного потребления субстрата и образования метаболитов повышается устойчивость к питательным средам переменного состава и повышается выход целевого продукта (БНЦ), что особо важно в условиях реального производства [Marsh, 2014; Gama, 2016; Kutyshenko, 2003]. Работа с консорциумами, образующими биоплёнки, достаточно сложна [Мартьянов, 2015].

В летописях династии Цинь в Китае, датируемых 220 г. до н.э имеются сведения о первом использовании «чайного гриба» – симбиотической культуры дрожжей и уксуснокислых бактерий, которая производит толстую целлюлозную пленку [Römling, 2013]. Из-за высокой адаптивности консорциум чайного гриба расселен в широком географическом диапазоне и имеет много синонимичных названий: маньчжурский гриб, Комбуча (в 414 г н.э. японский врач Комбу привез продуцент в Японию для лечения императора Инкё), через Россию чайный гриб (чайный квас, закваска, японский гриб) попал в Восточную, а затем в Западную Европу [Jayabalan, 2014]. В арабских странах продуцент называется хубдат хумза, на Тайвани – хайпао [Liu, 1996], в Корее – SCOBY (симбиотический консорциум бактерий и дрожжей [Chakravorty, 2016], в данной работе мы будем называть данную симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii* – это формальное систематическое название, данное консорциуму Линдау [Hesseltine, 1965].

В XX веке напиток на основе чая, ферментированного с помощью *Medusomyces gisevii*, приобрел значительную популярность во всем мире [Dufresne, 2000; Жумабекова, 2015], так как появились публикации о его терапевтическом действии против множества болезней. Были продемонстрированы такие лечебные свойства, как противомикробное, антиоксидантное, антиканцерогенное [Jayabalan, 2011], антидиабетическое [Aloulou, 2012 , Bhattacharya, 2013], лечение язвы желудка [Banerjee, 2010], высокого уровня холестерина [Yang, 2009], детоксикации печени [Loncar, 2000], показан иммуномоделирующий эффект [Ram, 2000].

Medusomyces gisevii – это симбиотическая культура, в которой преобладающая микрофлора представлена уксуснокислыми бактериями и дрожжами. Впервые исследования физиологии чайного гриба проведены в СССР под руководством Коновалова И.Н. в 1955 г [Konovalov, 1955; Konovalov, 1959], в 1965 г подобные исследования провёл Hesseltine [Hesseltine, 1965]. К тематике возвращались и позднее [Kozaki, 1972; Chen, 2000; Jarrell, 2000; Jayabalan, 2014; Marsh, 2014].

Многочисленными исследованиями показано, что состав микробиоты варьирует в зависимости от условий культивирования и географической точки, в которой развивается симбиотическая культура [Malbaša, 2011; Jayabalan, 2014; Dutta, 2007, Liu, 1996, Teoh, 2004]. Классический анализ состава популяций несовершенен, так как 1) часто культивируется лишь незначительная часть сложных микробных сообществ [Moyer, 1994], 2) доминирующая микрофлора не позволяет выявить редкие микроорганизмы и они остаются неопределенными [Mayo, 2014], 3) свойства культуральных сред и самих консорциумов могут различаться [Hugenholtz, 1998]. Поэтому наиболее показательны исследования, проведенные методом секвенирования (табл. 1.5) [Marsh, 2014; Chakravorty, 2016].

Табл. 1.5 – Состав симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* [Marsh, 2014]

Микроорганизмы, входящие в симбиотическую культуру <i>Medusomyces gisevii</i>	
Дрожжи	Бактерии
<i>Candida</i> (<i>C. stellimalicola</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i>)	<i>Komagataeibacter</i>
<i>Lachancea</i> (<i>L. thermotolerans</i> , <i>L. fermentati</i> , <i>L. kluyveri</i>)	<i>Gluconobacter</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Lyngbya</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Pichia mexicana</i>	<i>Collinsella</i>
<i>Meyerozyma</i> (<i>M. caribbic</i> , <i>M. guilliermondii</i>)	<i>Enterobacter</i>
<i>Eremothecium</i> (<i>cymbalariae</i> , <i>ashbyii</i>)	<i>Weissella</i>
<i>Zygowilliopsis californica</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Saccharomyces</i> (<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. fibuligera</i>)	<i>Unclassified</i>
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Другие
<i>Hanseniaspora</i> (<i>H. uvarum</i> , <i>H. meyeri</i> , <i>H. vineae</i>)	
<i>Merimbla ingelheimense</i>	
<i>Sporopachydermia lactativora</i>	
<i>Kazachstania</i> (<i>K. telluris</i> , <i>K. exigua</i>)	
<i>Starmera</i> (<i>S. amethionina</i> , <i>S. caribbaea</i>)	
<i>Unclassified</i>	
Другие	

В состав *Medusomyces gisevii* входят 8-10 родов бактерий, таких как *Komagataeibacter*, *Gluconobacter*, *Lyngbya*, *Bifidobacterium* и др. и 15-30 родов дрожжей, таких как *Candida*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomycetes*, *Schizosaccharomyces*, и др. [Marsh, 2014; Chakravorty, 2016].

Чакраворти отмечает превалирование таких родов дрожжей как *Candida*, *Lachancea* [Chakravorty, 2016], а Марш – *Zygosaccharomyces* и *Saccharomyces* [Marsh, 2014; Teoh, 2004]. Относительно биоразнообразия бактерий все авторы отмечают доминирование *Komagataeibacter* как в целлюлозной плёнке, так и в культуральной жидкости, при этом биоразнообразии в культуральной жидкости больше, чем в плёнке [Konovalov, 1955; Sievers, 1995; Jarrell, 2000; Marsh, 2014; Chakravorty, 2016].

Для культивирования *Medusomyces gisevii* классической питательной средой является полусинтетическая глюкозная среда с экстрактивными веществами чёрного чая [Goh, 2012].

Известно, что полифенолы и флавоноиды, присутствующие в черном чае, отвечают за его антиоксидантные свойства [Bancirova, 2010, Chan, 2011, Chen D., 2008, Lee, 2002; Aloulou, 2012; Bancirova, 2010; Chan, 2011]. Обычно концентрация общих полифенолов и флавоноидов увеличивается в процессе культивирования [Chu, 2006; Jayabalan, 2008]. Это объясняется расщеплением сложных чайных полифенолов и флавоноидов до более мелких молекул. Расщепление протекает под действием ферментов, вырабатываемых членами консорциума. Например, *Candida tropicalis* способен разлагать полифенолы [Ettayebi, 2003]. Основными полифенолами, содержащимися в черном чае, являются теафлаavin и теарубигин [Chan, 2011]. Показано, что часть теарубигина могла быть преобразована в теафлаavin во время ферментации чайного гриба, при этом цвет культуральной жидкости изменяется с красновато-коричневого на светло-коричневый в процессе культивирования [Kallel, 2012; Chakravorty, 2016]. Было показано, что кофеин, входящий в состав чая, и относящиеся к нему компоненты (теофиллин и теобромин) являются

активаторами биосинтеза БНЦ. Если в питательную среду не добавлять экстракт черного чая, то биосинтез БНЦ останавливается [Fontana, 1991].

С технологической точки зрения крайне интересным является факт использования нестерильных питательных сред для культивирования *Medusomyces gisevii* [Marsh, 2014; Chakravorty, 2016]. Одной из причин является то, что при автоклавировании черного чая с сахарами происходит образование токсичных химических веществ, которые препятствуют ферментации *Medusomyces gisevii* [Teoh, 2004]. В то же время, использование экстракта чёрного чая позволяет не вносить питательные соли и витамины, которые обычно используются для биосинтеза БНЦ.

Таким образом, использование консорциума *Medusomyces gisevii* вполне обоснованно может конкурировать с индивидуальными штаммами. Приоритет использования природных симбиотических ассоциаций перед индивидуальными штаммами показан, например, в технологиях очистки сточных вод [Кузнецов А.Е., 2006; Кузнецов А.Е., 2010]. Успешность перехода от методов управляемого культивирования к методам управляемой экологической ниши [Кузнецов А.Е., 2020] позволяет предположить большие перспективы в использовании этого подхода для получения БНЦ, притом именно на сложных питательных средах (гидролизных средах, средах из сельскохозяйственных отходов и отходов пищевых производств), когда накладывается действие биотических и абиотических факторов [Plyuta, 2013; Плюта, 2013; Khokhlachev, 2014; Тура, 2016].

1.7.2 Структура и свойства бактериальной наноцеллюлозы

1.7.2.1 Химия бактериальной наноцеллюлозы

Химические связи

БНЦ представляет собой линейный гомополимер, состоящий из β -D-глюкопиранозы, связанной β -1,4-связями (рис. 1.8). В 1934 г было

подтверждено, что БНЦ действительно является целлюлозой и вступает в реакции метилирования, ацетилирования, ацетолиза и гидролиза [Barsha, 1934].

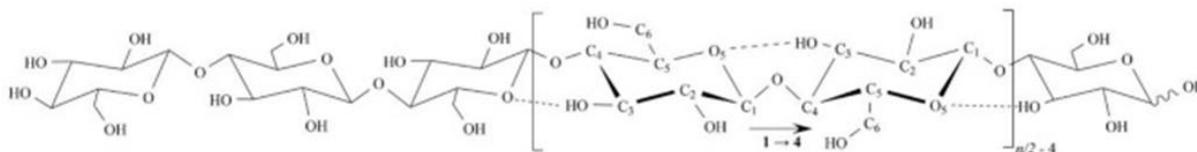


Рисунок 1.8 – Химическая структура молекулы целлюлозы (n = степень полимеризации).

С точки зрения химии целлюлозы, ключевым является расположение многочисленных гидроксильных группы вдоль полимерной цепи (одна ангидроглюкоза имеет три гидроксильные группы; [Ross, 1991]). В результате между гидроксильными группами и атомами кислорода ангидроглюкозных звеньев образуется большое количество водородных связей. Под действием водородных связей (внутри- и межмолекулярных) и ван-дер-ваальсовых сил молекулы целлюлозы параллельно укладываются в кристаллические нановолокна, которые затем собираются в микрофибриллы целлюлозы [Nishiyama 2008; Ruan, 2016; Chen WS, 2018]. Формируется преимущественно левосторонняя скрутка цепей БНЦ [Lee, 2014]. Надмолекулярная структура имеет строгий иерархический порядок, поэтому микрофибриллы целлюлозы имеют высокую механическую прочность [Zhong, 2020]. Вот почему в живых организмах целлюлоза отвечает за прочность [Klemm, 2020].

Химическая чистота

Уникальным свойством БНЦ является её химическая чистота. В отличие от целлюлозы растительного происхождения, она не содержит гемицеллюлоз, лигнина, пектина, жировосковой фракции [Klemm, 2011; Jozala, 2016]. В нативной БНЦ может содержаться некоторое количество белков, так как клетки уксуснокислых бактерий оказываются заключенными в матрицу БНЦ, кроме того, нативная БНЦ на 98-99 % состоит из культуральной среды, на которой она выращена. Поэтому обязательным условием перед последующим использованием БНЦ, является её тщательная промывка в слабых растворах

щелочей и кислот [Moniri, 2017]. После промывки БНЦ из желтой или коричневой становится жемчужно-белой, а в химическом плане представляет собой чистую целлюлозу. Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США [FDA; Petersen, 2011] рекомендовано контролировать уровень эндотоксинов в БНЦ. В тоже время есть множество указаний на нетоксичность и биосовместимость БНЦ [Torres, 2012; George, 2014; Roman, 2015].

1.7.2.2 Строение бактериальной наноцеллюлозы

Архитектура

Целлюлозные материалы, имеющие структурные элементы, размеры которых по крайней мере в одном измерении измеряются в нанометровом диапазоне, обобщаются под термином наноцеллюлозы [Klemm, 2020]. БНЦ является «золотым стандартом» наноцеллюлоз, поскольку она производится в нанометровом масштабе, что строго контролируется синтезирующими её бактериями [Lee, 2014].

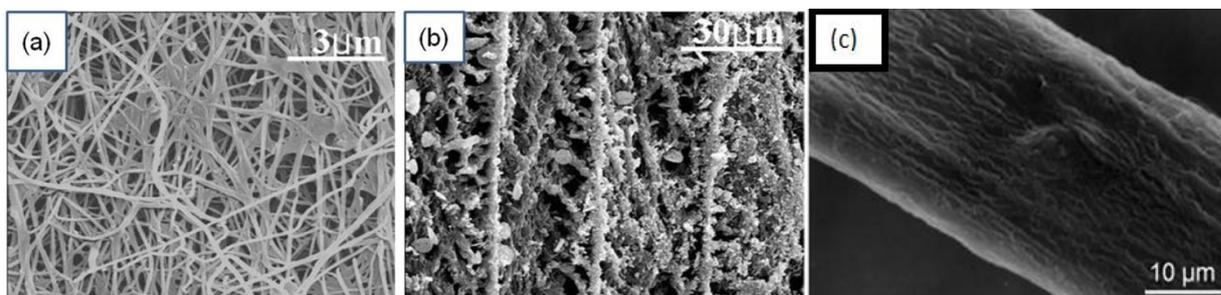


Рисунок 1.9 – Электронные микрофотографии а) наноразмерных лент БНЦ, б) поперечного сечения БНЦ, с) микроразмерного волокна растительной целлюлозы [Klemm, 2011; Sharma, 2019]

Эксклюзивным свойством БНЦ является ее 3D-архитектура: фибриллы целлюлозы неупорядоченно уложены в трех направлениях во всём объёме гелевой плёнки. Фотографии растровой электронной микроскопии (РЭМ) или сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) микроструктуры БНЦ являются доказательством бактериального происхождения образца БНЦ (рис.

1.9): на них наноразмерные волокна БНЦ хаотично переплетены в трех направлениях. Ширина лент и плотность их переплетения могут варьировать в зависимости от условий культивирования и применяемого для биосинтеза БНЦ штамма [Klemm, 2011; Ruka, 2013; Huang, 2014].

Интересным аспектом, определяющим области практического применения БНЦ, является размер пор между фибриллами в БНЦ. Размер пор БНЦ имеет широкий диапазон: от 12 нм до 24 нм (метод математического описания физической адсорбции), или от 10 нм до 430 нм (РЭМ) [Alves, 2020], иногда указывают на образование нано- и микро- пор [Vitta, 2021].

Степень кристалличности и алломорфы БНЦ

БНЦ имеет высокую степень кристалличности. Ранее считалось, что при биогенезе целлюлозы полимеризация и кристаллизация являются сопряженными процессами у уксуснокислых бактерий [Benziman, 1980]. В статических условиях получены образцы БНЦ со степенью кристалличности от 46,0 % до 95,6 % [Velásquez-Riaño, 2017]. При культивировании в условиях перемешивания отмечается снижение степени кристалличности [Watanabe, 1998].

Как и целлюлозе растительного происхождения, в структуре БНЦ есть как кристаллические, так и некристаллические области [Moon, 2011]. Поскольку БНЦ имеет высокую степень кристалличности, высококристаллические области являются основным компонентом структуры БНЦ с короткими аморфными участками в виде небольших фрагментов. Высококристаллические области придают БНЦ высокую механическую прочность, а аморфные участки – гибкость. Кристаллическая целлюлоза имеет различные полиморфы, включая целлюлозу I, II, III и IV [O'Sullivan, 1997]. Целлюлоза I характерна для природных объектов [Moon, 2011; Hirai, 1997; Hirai, 2002].

Целлюлоза I имеет два типа кристаллических структур: триклинную (I α) и моноклинную (I β), рис. 1.10 [Samir, 2005]. Целлюлозы I α и I β обладают

одинаковым молекулярным строением и внутрицепочечной водородной связью O_3-H-O_5 , но имеют разные межцепочечные водородные связи O_2-H-O_6 [Алешина, 2001; Moon, 2011]. Кроме того, целлюлоза I β содержит две цепи в каждой моноклинной элементарной ячейке, а I α содержит одну цепь в триклинной элементарной ячейке [Gümüşkaya, 2003; Festucci-Buselli, 2007; Szymanska-Chargot, 2011]. Показано, что целлюлоза I α может необратимо превращаться в целлюлозу I β в щелочном растворе гидротермальной обработкой, что является доказательством относительно более низкой термодинамической стабильности целлюлозы I β по сравнению с целлюлозой I α [Watanabe, 2007; Kose, 2011; Ben-Bassat, 1999; Faria-Tischer, 2015].

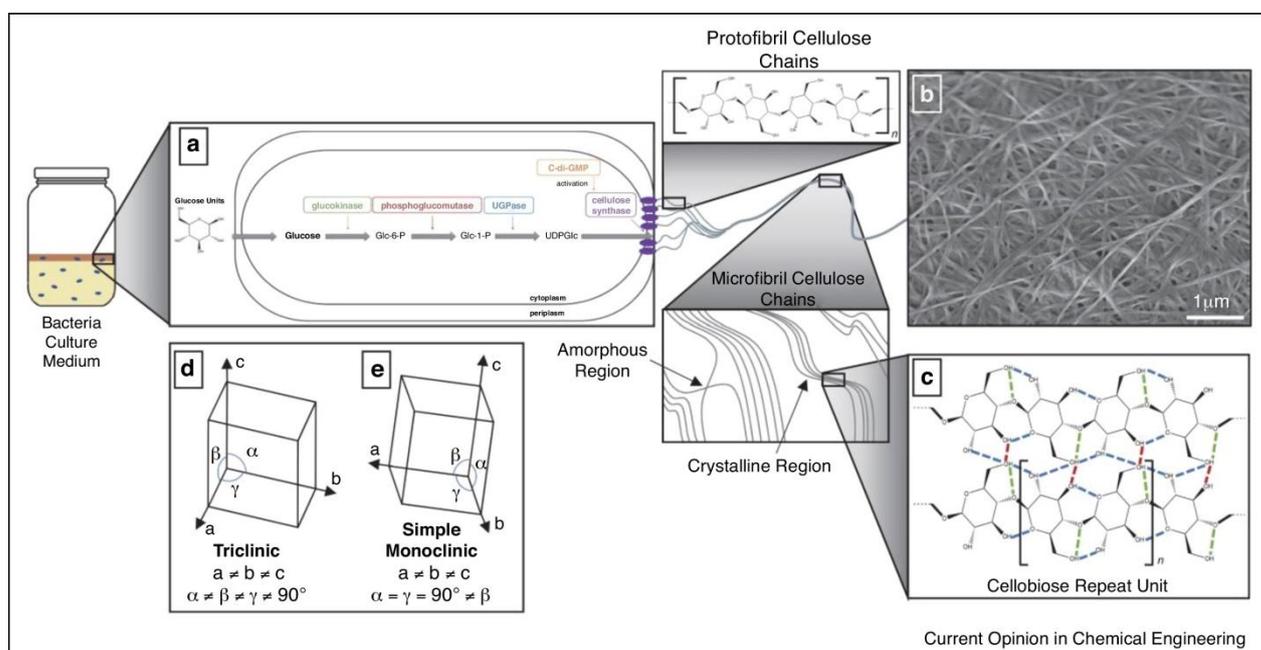


Рисунок 1.10 – Особенности синтеза и структуры БНЦ: а – уксуснокислая бактерия, б – сканирующая электронная микроскопия БНЦ, в – различия межмолекулярных и внутримолекулярных связей в целлюлозе I α (красные связи), целлюлозе I β (зеленые связи) и связи, которые есть в обоих аморфах (синие связи), д – триклинная кристаллическая структура целлюлозы I α , е – моноклинная кристаллическая структура целлюлозы I β [van Zyl, 2019]

В природных объектах два алломорфа целлюлозы I сосуществуют в разных пропорциях у биологических видов [Van der Hart, 1984]. Например, целлюлоза I α характерна для низших форм жизни (бактерий и водрослей), массовая доля составляет около 0,6. Целлюлоза I β характерна для высших

растений, массовая доля составляет около 0,8 [Saxena, 2005; Drahusuk, 1997]. У бактерий пропорции целлюлозы I α также меняются в зависимости от родов и штаммов [Drahusuk, 1997]. Кроме того, условия культивирования (температура, режим перемешивания, состав питательной среды, добавки) также влияют на соотношение целлюлозы I α и I β в БНЦ [Yamamoto, 1994; Kose, 2011; Huang, 2014]. Например, такие добавки, как карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), ксилоглюкан и ацетилглюкоманнан, могут нарушать кристаллизацию и сборку БНЦ, что приводит к изменениям структуры и морфологии [Tokoh, 1998; Chen HH, 2011].

1.7.2.3 Свойства бактериальной наноцеллюлозы

Степень полимеризации

БНЦ обычно имеет более высокую степень полимеризации, чем растительная целлюлоза, Гарднер считает высокую степень полимеризации БНЦ естественным следствием высокой кристалличности [Gardner, 2008]. По разным данным, степень полимеризации варьирует от 300 (определена методом вискозиметрии) [Surma-Slusarska, 2008; Vitta, 2012; Shi, 2013] до 16 800 (определена методом гель-проникающей хроматографии) [Tabuchi, 1998; Watanabe, 1998]. Степень полимеризации БНЦ может изменяться в зависимости от ряда факторов, включая роды / штаммы бактерий, условий культивирования и источники питательных веществ [Tahara, 1997].

Влажность и влагоудерживающая способность

Влажность гель-плёнок БНЦ составляет 98-99 %, то есть представляет собой гидрогель [Mohite, 2019]. При высушивании на воздухе 3D-архитектура БНЦ схлапывается, а при лиофильной сушке сохраняется [Klemm, 2018]. Таким образом, высушенная лиофильно БНЦ представляет собой аэрогель [Revin, 2019].

Так как фибриллы БНЦ в 100–200 раз тоньше фибрилл растительной целлюлозы (рис. 1.9) [Sokolnicki, 2006; Esa, 2014], то и удельная поверхность БНЦ необычайно высока. В свою очередь, сильно развитая поверхность БНЦ с большим количеством гидроксильных групп обеспечивает, во-первых, высокую гидрофильность, а во-вторых, повышает эффективность химического модифицирования полимера [Klemm, 2005]. При этом необходимо отметить, что функционализация происходит преимущественно в поверхностном слое БНЦ.

Влагоудерживающая способность влажных пленок БНЦ в 60-700 раз превышает их сухой вес [Portela, 2019]. Как правило, гель-плёнки, полученные в результате статической ферментации, состоят из ~ 1 мас.% БНЦ и ~ 99 мас.% воды [Yamanaka, 1989]. Такая способность удерживать большое количество воды объясняется обилием гидроксильных групп целлюлозы. Предполагается, что только 10 % молекул воды в гель-плёнках БНЦ являются свободными, а остальные захватываются гидроксильными группами целлюлозы посредством водородных связей [Mariani, 2007]. Там же делается предположение, что вода в пленке БНЦ, представлена небольшими «озерами», а не образует непрерывную фазу по всей пленке [Mariani, 2007].

При суспендировании БНЦ образуют устойчивые суспензии. При этом, если БНЦ получена в условиях перемешивания, то образуются миллиметрового размера гранулы неправильной формы [Gorgieva, 2020], при их суспендировании вязкость суспензии повышается незначительно, суспензии очень стабильны, даже в присутствии в суспензии кислот, солей и этанола [San-Ei Gen, 2020].

Регидратация

Интересна не только способность БНЦ к удержанию влаги, но и способность к регидратации. Метод сушки БНЦ играет решающую роль в последующей регидратации [Хайруллин, 2013 б]. Подробнее о методах сушки написано в п 1.7.5.2.

Проницаемость газа и жидкостей

Доказано, что во влажном состоянии БНЦ способствует обмену водяного пара и газа, но не позволяет жидкости перемещаться, что также дает преимущества для ряда применений, особенно в биомедицинских областях, например, для раневых покрытий [[Gorgieva, 2019](#); [Pang, 2020](#)].

Механические свойства

Кроме прекрасной проницаемости, БНЦ отличается гибкостью, эластичностью, формуемостью [[Romling, 2015](#)], что сочетается с высокой прочностью на разрыв и долговечность [[Krystynowicz, 2002](#); [Yuan., 2018](#); [Пиневич, 2007](#); [Скворцова, 2019](#); [Скворцова, 2020](#)].

Высокая прочность БНЦ стала её визитной карточкой. Например, Яманака с соавторами получил листы БНЦ с модулем Юнга около 15 ГПа [[Yamanaka, 1989](#)], в продолжении этих работ после окисления БНЦ достигнут модуль Юнга около 30 ГПа [[Nishi, 1990](#)]. Согласно нескольким источникам, типичная прочность на разрыв БНЦ находится в диапазоне 200–2000 МПа [[Gardner, 2008](#); [Iguchi, 2000](#); [Vitta, 2012](#)], а типичный модуль Юнга обычно находится в диапазоне 15–138 ГПа [[Gardner, 2008](#); [Iguchi, 2000](#); [Vitta, 2012](#)]. Методом рентгеновской дифракции были измерены модули упругости кристаллических участков субмикронных размеров, для одного волокна БНЦ прочность составила 100-160 ГПа, что сопоставимо с прочностью стали [[Satcurada 1967](#); [Klemm, 2011](#)].

Основными причинами прочности БНЦ считают высокую степень кристалличности и степень полимеризации. Считается, что кристаллические участки БНЦ отвечают за прочность и долговечность, а аморфные – за гибкость, эластичность и формуемость [[Moon, 2011](#)].

Большой разброс данных, обнаруживаемый при исследовании механических свойств методом одноосного растяжения, объясняется неоднородностью образцов по толщине (рост БНЦ в процессе культивирования

происходит неравномерно) и отсутствием преимущественной ориентации фибрилл [Scionti, 2010; Skvortsova, 2019].

Механические свойства сильно зависят от метода сушки и влажности [Yamanaka, 1989; Hsieh, 2008; Feng, 2015; пат. РФ 270062; пат. РФ 2743012]. Например, в работе [Pogorelova, 2020] влажные пленки БЦ имеют средний модуль Юнга $1,5 \pm 0,3$ МПа и среднее удлинение $49,0 \pm 3,6\%$. Сухие пленки БНЦ демонстрируют более высокий модуль Юнга $428,0 \pm 24,1$ МПа, но пониженную деформируемость ($7,5 \pm 0,4\%$). После регидратации пленки БНЦ имеют компромиссный модуль Юнга $250,4 \pm 20,1$ МПа и удлинение $18,5 \pm 0,8\%$.

Оптические свойства

Светопропускание - еще одно интересное свойство БНЦ, которое может использоваться в создании оптически прозрачных композитов. Высокий перенос происходит потому, что длина волны видимых лучей больше наноразмеров волокон. Оптически прозрачные композиты БНЦ применяются в оптических устройствах отображения, линзах, различных покрытиях [Huang, 2017; Retegi, 2012]. Тонкие плёнки БНЦ прозрачны, а более толстые – белые, полупрозрачные.

Термостабильность

Высокая термостабильность до 250°C [Nishi, 1990] – важное свойство БНЦ. Многие авторы высокую термостабильность БНЦ связывают с её высокой кристалличностью и с крепостью многочисленных водородных связей внутри БНЦ [Vazquez, 2013; Mohammadkazemi, 2015; Pacheco, 2017; Costa, 2017]. Свойство термостабильности позволяет использовать БНЦ в доставке лекарственных средств, производстве бумаги [Amin, 2021].

Биосовместимость и биоразлагаемость

БНЦ относится к категории общепризнанных безопасных продуктов

(GRAS) [Sharma, 2019]. БНЦ по своей природе нетоксична и биосовместима [Roman, 2015; Helenius, 2006]. Трехмерная сетчатая сеть БНЦ похожа на внеклеточный матрикс, сотканный из коллагеновых волокон, что также способствует его биосовместимости [Torres, 2012]. БНЦ обладает свойством гемосовместимости [Andrade, 2011]. Исследования *in vivo* показали, что БНЦ не вызывает реакции на инородные тела и не вызывает хронических воспалительных процессов во время длительной имплантации [Torres, 2012]. Поскольку БНЦ является биосовместимой и биоразлагаемой, она нашла широкое применение в биомедицине [George, 2014; de Oliveira Barud, 2016]. Материал обладает умеренной цитотоксичностью, либо нецитотоксичен [Петрухин, 2016].

Выводы

Эксклюзивность строения обеспечивает уникальность свойств БНЦ, при этом качественно свойства можно охарактеризовать в превосходной степени, как «высокие» и «сверхвысокие», «исключительные». Этот материал был замечен учёными, предпринимателями, менеджерами разных уровней. Исследования БНЦ в настоящее время ведутся на стыке разных наук, в них участвуют биотехнологи, микробиологи, биохимики, химики, аналитики, материаловеды, специалисты в области высокомолекулярных соединений, электронщики, врачи, физики, экономисты. В табл. 1.6 приведено сравнение некоторых свойств растительной целлюлозы и БНЦ.

Таблица 1.6 – Свойства бактериальной и растительной целлюлозы

Свойства	БНЦ	Целлюлоза вегетативной части растений
Чистота, %	> 99	35-80
Размер волокна, нм	20-100	14000-40000
Степень кристалличности, %	46-95	56-65
Степень полимеризации	300-16 800	200-14 000
Модуль Юнга, МПа	1,5-138 000	5,5-12,6
Прочность на растяжение, МПа	20-300	25-200
Влагоудерживающая способность, %	6 000-700 000	25-35
Пористость, %	> 85	< 75
Площадь поверхности, м ² /г	> 150	< 10

Структура БНЦ, а следовательно, и её индивидуальные свойства – механическая прочность, термостабильность, влагоудерживающая способность зависят от штамма, используемого для биосинтеза БНЦ, условий культивирования, питательной среды и вносимых в неё добавок [Chen S.-Q, 2018; Dayal, 2016; Skvortsova, 2019; Krystynowicz, 2002; Yuan, 2018; Klemm, 2020].

1.7.3 Композиты на основе бактериальной наноцеллюлозы

Создание композитов с БНЦ

Нанокompозиты на основе БНЦ представляют огромный интерес. Обычно композиты состоят из двух типов отдельных материалов, а именно из матрицы и армирующего материала. Матрица действует как каркас и поддерживает армирующий материал, в то время как арматура придает матрице физико-химические и биологические свойства. Бактериальная целлюлоза может использоваться как в качестве матрицы, так и в качестве каркаса (рис. 1.11) для композитной конструкции [Moniri, 2017].

В качестве армирующего материала в композитах с БНЦ используются такие наноматериалы, как наночастицы металлов и оксидов металлов (Ag, Au, Ni, Pd, CuO и TiO₂), минеральные наноматериалы (SiO₂, CaCO₃, монтмориллонит) и углеродные наноматериалы (графен, углеродные нанотрубки). Описано получение композитов БНЦ с природными биологически активными веществами (алоэ вера, облепиховым маслом), антиоксидантами (супероксид-дисмутазой). В качестве матрицы в композитах БНЦ описано использование таких полимеров как коллаген, желатин, карбоксиметилцеллюлоза, хитозан, полиэтиленгликолы и др. [de Oliveira Barud, 2016; Moniri, 2017; Архарова, 2019; Атыкян, 2021; Баклагина, 2005; Бычковский, 2013; Гофман, 2006; Дебабов, 1999; пат. РФ 2564567; пат. РФ 2720099; пат. РФ 2736061; пат. РФ 2733137; пат. РФ 2659175, Ревин, 2017; Рубина, 2019; Сапунова, 2019; Ткачева, 2013; Хайруллин, 2013 а; Azizi Samir,

2005; Baker, 2018; Belgacem, 2008; Cai, 2010; Gromovykh, 2019; Novikov, 2021; Lutsenko, 2019; O'Donnell, 2018; Makarov, 2019; Makarov, 2020; Demchenko, 2020; Lutsenko, 2019; Meftahi, 2010; Netravali, 2014; Niyazbekova, 2018; Revin, 2017; Shidlovskiy, 2018; Stanescu, 2021; Thaveemas, 2021; Volova, 2018; Volova, 2019].

БНЦ достаточно легко поддаётся модификациям, что позволяет получить нанокompозиты заданной функциональности. При этом модификация может осуществляться двумя путями: *in situ* и *ex situ*. Модификация *in situ* заключается в изменении БНЦ во время культивирования путем изменения условий культивирования, добавления в культуру дополнительных веществ, в том числе веществ, изменяющих структуру будущего полимера, например карбоксиметилцеллюлозы, фторида натрия [Khandelwal, 2016; Stumpf, 2018; Gregory, 2021]. Модификация *ex situ* осуществляется после того, как БНЦ был сформирован, и это делается либо химическими, либо физическими методами [Stumpf, 2018]. Простым способом является физическая адсорбция на БНЦ активных агентов.

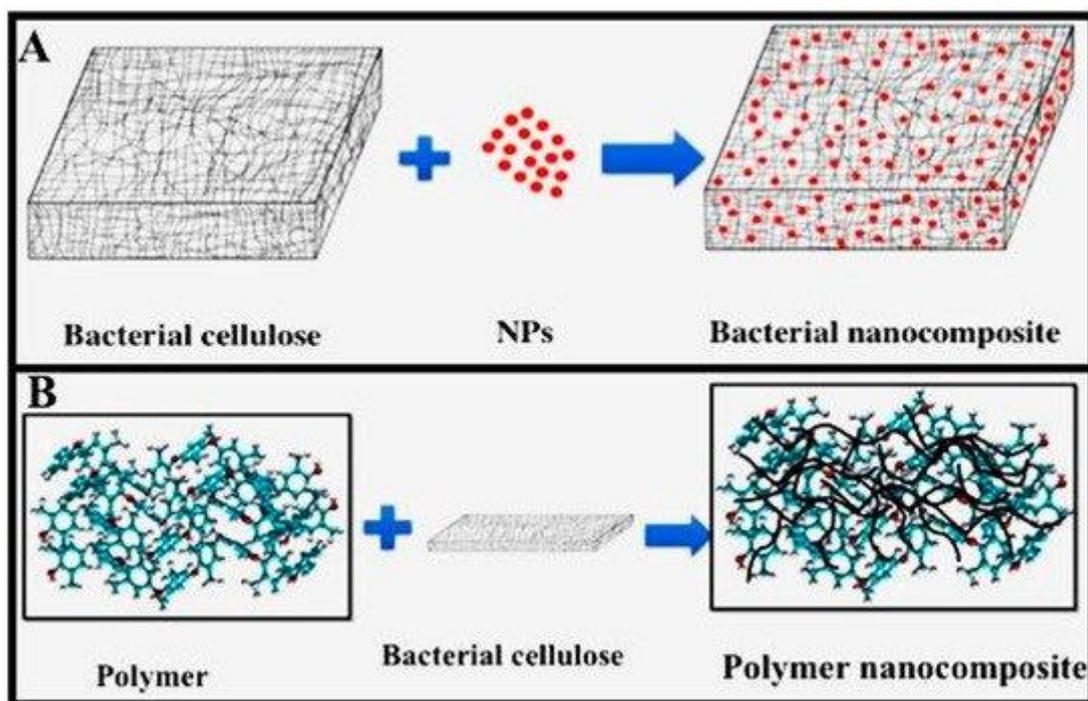


Рисунок 1.11 – Использование для получения нанокompозитов БНЦ: А – в качестве матрицы, В – в качестве армирующего материала [Moniri, 2017]

Модификация БНЦ должна отвечать определенной цели. Например, у нативной БНЦ отсутствуют антимикробные свойства, поэтому для повышения антимикробного действия в БНЦ добавляют бактерицидные вещества: ионы серебра, меди, оксид титана, монториллонит и другие глины, прополис, хлористый бензалконий, лизоцим, ациллин, антибиотики, [Barud, 2008; de Oliveira Barud, 2016; Moniri, 2017; Volova, 2022; Кленова, 2018]. В работе [Savitskaya, 2019] комплексное антимикробное действие достигается путём иммобилизации на БНЦ *Bacillus subtilis* P-2 (KY780502, Республиканская коллекция микроорганизмов, Нур-Султан, Казахстан), при нанесении на рану полученного биокompозитного покрытия *Bacillus subtilis* синтезируют антибиотики, бактериоцины, биосурфактанты и протеазы, усиливающие действие друг друга.

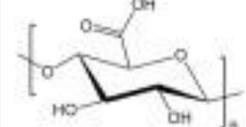
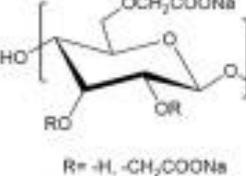
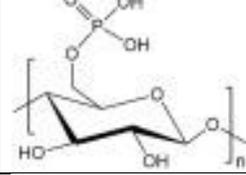
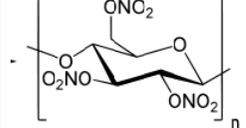
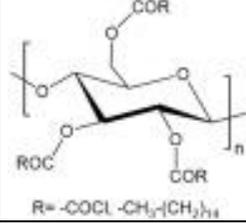
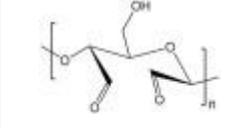
Примеры других целей и стратегий их осуществления изложены в обзорах [Stumpf, 2018; Gregory, 2021].

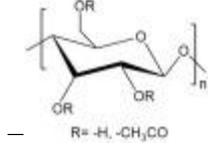
Химическая функционализация БНЦ

Физическая адсорбция – это простейший способ модификации БНЦ, как правило, он осуществляется на нативной БНЦ, содержащей около 99 % влаги. При этом не образуются ковалентные связи и с течением времени свойства композитов могут меняться.

Решением проблемы является химическая модификация структуры БНЦ. Химические модификации гидроксильных функциональных групп включают 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (ТЕМПО) окисление, карбоксиметилирование, фосфорилирование, сульфозетилирование, ацетилирование и катионизацию [Gregory, 2021; Бычковский, 2019; Кезина, 2014; Kurschner, 1993], нитрование [Wang, 2020; Jamal, 2020; Tanga, 2021; Chen L, 2021; Rubina, 2020], сукцинирование [Yin, 2011]. Кроме того, могут быть использованы реакции окисления с разрывом углерод-углеродной связи; взаимодействия с силанами (алкоксисиланом, триэтоксивинилсиланом) по

Табл. 1.7 – Модификация БНЦ (систематизировано по [Gregory, 2021])

Тип модификации	Химический процесс	Особенности	Применение	Химическая структура	Ссылки
Химическая модификация –ОН группы	2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (ТЕМРО) окисление	Введение заряженных карбоксильных группы при С 6-атоме ангидроглюкозы	Биоремедиация		Chen X., 2020
	Карбоксиметилирование	Монохлоруксусная кислота реагирует с первичным О 6 и вторичными О 2 и О 3 гидроксильных групп	Пищевая промышленность (загуститель, связующий для воды, вспомогательное средство для экструзии, пленкообразователь)	 R = -H, -CH ₂ COONa	Schlufter, 2010
	Фосфорилирование	Фосфор, связанный с двумя кислотными протонами, привитыми к волокнам целлюлозы методом пропитки с (NH ₄) ₂ HPO ₄	Ортопедия, биомедицина, текстиль или биохимическое разделение		Rol, 2020
	Нитрование	Нитрование заключается в замещении гидроксильной группы на нитрогруппу преимущественно в положения С 2 и С 3	Компонент взрывчатых композиций и ракетного топлива; мембрана для диагностики вирусов		Wang, 2020; Jamal, 2020; Tanga, 2021; Chen L, 2021
	Этерификация	Газофазная этерификация БНЦ пальмитоил (пропионат/ацетат) хлоридом, катализатор – винная кислота	Водоотталкивающие материалы на основе БНЦ: салфетки, прокладки, фильтровальная бумага и т. д.	 R = -COCl -CH ₂ -(CH ₂) ₁₄	Berlioz, 2009; Ramírez, 2014
Химические модификации по раскрытию цикла	Периодатное окисление	Окисление групп ОН в положениях С 2 и С 3 приводит к образованию альдегидных групп за счет разрыва связи С–С	Биоабсорбируемый материал для стоматологического медицинского применения		Inoue, 2020

Присоединение к БНЦ молекул	Ацелирование толуолом и уксусным ангидридом	Гидрофобность. Гигроскопичность БНЦ в композитах снижается при сохранении их высокой оптической прозрачности и термической стабильности	Композит для оптоэлектронных устройств		Nogi, 2006; Ramírez, 2016
Присоединение к БНЦ полимеров	Полимеризация	БЦ смешивают с мономером и инициатором, а затем индуцируют полимеризацию на поверхности	Антимикробные нанокомпозиты БЦ для перевязочных материалов, суперабсорбирующие гидрогели для доставки лекарств	—	Figueiredo, 2015; Pandey, 2013
Модификация поверхности нативной БНЦ путем адсорбции	Адсорбция полиэлектролитов	Регулярные слои БНЦ и полиэлектролита образуются в зависимости от структуры полиэлектролита	Биосовместимая система доставки лекарств	—	Pöttinger, 2018
	Адсорбция гидрофобных полимеров	Адсорбция полистирола и политрифторэтилена из апротонных растворителей	Нанопленка для электроники, композитов, наночистоты растворителей	—	Kontturi, 2017

гидроксильной группе, присоединения (в западной литературе – прививки) (табл. 1.7) [Sharma, 2019; Белоусова, 2020]. На основе функционализированной БНЦ также возможно получение многообразных композитных материалов, что открывает огромные перспективы для междисциплинарных исследований. Например, после ацелирования БНЦ получены оптически прозрачные композиты с акриловой смолой [Moniri, 2017]. Разработана достаточно сложная функционализация БНЦ с модулем связывания углеводов с пептидами адгезии, это позволяет улучшить адгезионные свойства БНЦ и используется в технологии культивирования тканей [Stumpf, 2018].

1.7.4 Основные направления применения бактериальной nanoцеллюлозы

Материал имеет беспрецедентное социальное значение. Исторически первая область применения это пищевая индустрия. Этот сегмент до сих пор занимает ведущее место по объёму выпуска БНЦ. Самое востребованное и капиталоемкое применение БНЦ находит в биомедицине. Производными отраслями являются биотехнологическая промышленность и защита окружающей среды (рис. 1.12)



Рисунок 1.12 – Основные направления применения БНЦ

Растущим сегментом является техническое применение БНЦ. Отраслями, в которых целлюлоза традиционно использовалась являются целлюлозно-бумажная промышленность, лёгкая промышленность и химическая промышленность. Введение БНЦ в эти традиционные отрасли открывают новые горизонты, поскольку свойства получаемых из БНЦ продуктов существенно отличаются от привычных. Прогнозируется, что композиты из БНЦ будут вытеснять традиционные материалы и в машиностроении. Основные перспективы связывают с применением БНЦ в энергетике и электронике [Gregory, 2021].

1.7.4.1 Применение в пищевой промышленности

БНЦ под названием «ната де коко» (Nata de coco) является традиционным блюдом в странах Азиатско-Тихоокеанского региона. Европейцы попробовали БНЦ в пищу в 1960-1970 годах на Филиппинах, эту дату они и считают началом мирового употребления [Iguchi, 2000].

БНЦ является «общепризнанной безопасной (GRAS) пищевой добавкой FDA с 1992 года» [Shi, 2014]. БНЦ используется в десертах, диете с низким содержанием холестерина, вегетарианском мясе, добавках к пище / напиткам, упаковке пищевых продуктов и т. д. [Azeredo, 2019].

БНЦ, полученная методом статической ферментации в виде желеобразной пленки (это и есть ната де коко), в основном используется в качестве сырья для пищевых десертов и пищевых ингредиентов. БНЦ, полученная методом ферментации с перемешиванием в виде суспензии частиц неправильной формы, используется в качестве загустителей и суспендирующих агентов в напитках. Оба направления коммерциализированы: Hainan Yeguo Foods Co., Ltd, и ряд других производят желеобразные формы БНЦ; CPKelco, San-Ei Gen и Kusano Sakko – суспендированные формы БНЦ [Zhong, 2020].

Ната де коко состоит из чистой клетчатки, в нем нет холестерина [Ullah, 2016], то есть продукт позиционируется на рынке как пищевые волокна, приносящие пользу здоровью человека и снижающие риск хронических заболеваний, таких как диабет, ожирение, сердечно-сосудистые заболевания и т. д. [Anderson, 2009]. Организм человека не продуцирует целлюлазу, поэтому БНЦ не переваривается и не всасывается в желудочно-кишечном тракте и выводится из организма с фекалиями [Fontana, 2017]. В настоящее время ната де коко добавляют в десерты, напитки, йогурт, пироги, колбасы и салаты.

Второй позицией является использования БНЦ в качестве пищевой добавки как загуститель и стабилизатор. Преимуществом БНЦ перед обычными загустителями, таких как ксантановая камедь, пектин, КМЦ,

полисахарид сои, является полностью нейтральный вкус [Dourado, 2016 b]. БНЦ отлично суспендируется даже в низких концентрациях и образует нерасслаиваемые суспензии с высокими потребительскими качествами [Zhong, 2020].

Ещё одним направлением использования БНЦ в пищевой промышленности является применение в качестве упаковочного материала. Она водо- и газо-проницаема, экологична, биоразлагаема, не изменяет органолептические показатели продуктов и не вступает с ними в химические реакции [Azeredo, 2019; Saha, 2019; Lin, 2020; Zahan, 2020]. Для обнаружения порчи пищевых продуктов широко используются индикаторы pH с натуральными красителями (например, антоцианами), которые при включении в упаковочный материал на основе БНЦ, меняют свой цвет при порче продукта [Moradi, 2019; Klemm, 2021]. Можно внедрять противомикробные агенты в упаковочные пленки на основе БНЦ (эфирные масла и экстракты растений) для продления срока годности пищевых продуктов [Stroescu, 2020]. Новым трендом является использование постбиотиков в пищевой индустрии, в т.ч. включение их в состав упаковочной бумаги для мясных продуктов для их более длительной сохранности [Yordshahi, 2020].

1.7.4.2 Биомедицинское применение

Чистота (бактериальной наноцеллюлозы) БНЦ, наноразмерность её волокон, высокая влагоудерживающая способность, проницаемость для газов и жидкостей обеспечивают такое уникальное её свойство, как биосовместимость, то есть схожесть с тканями животного происхождения [de Oliveira Barud, 2016]. Кроме того, БНЦ имеет большую площадь поверхности, высокую прочность и прозрачность, поэтому именно БНЦ стала материалом биомедицины XXI в [Thomas, 2008; Sulaeva, 2015; Ullah, 2016; Klemm, 2020; Mbituyimana, 2021; Gregory, 2021]. Многочисленными исследованиями зафиксирована нетоксичность БНЦ [Torres, 2012].

Эндотоксины в БНЦ соответствует требованиям FDA для использования *in vivo* (20 единиц эндотоксина на устройство) [Petersen, 2011].

Можно выделить следующие большие группы применения БНЦ в медицине: 1) раневые повязки, 2) фармацевтика и диагностика, 3) импланты и биоимпланты [de Oliveira Barud, 2016; Zhong, 2020].

В биомедицине применяются как нативная БНЦ (причём преимущественно во влажном состоянии [Moniri, 2017]), так и производные БНЦ в виде композитов. Впервые медицинское применение БНЦ описано в 1990 г [Fontana, 1990] с тех пор уровень исследований многократно возрос, именно биомедицинскому применению посвящено большинство обзоров по БНЦ [Shah, 2010; Klemm, 2011; Fu, 2012; Fu, 2013; Jorfi, 2015; Kucinska-Lipka, 2015; Rajwade, 2015; Abeer, 2014; Sulaeva, 2015; Stumpf, 2018; Anton-Sales, 2019; Carvalho, 2019; Urbina, 2021] и множество исследовательских работ [Громовых, 2015; Громовых, 2017; пат. РФ 2545729; пат. РФ 94151; пат. РФ 2437681; пат. РФ 2695066; пат. РФ; Чернигова, 2019; Mendes, 2009; Vaniushenkova, 2020].

Раневые повязки

Впервые БНЦ для лечения ожогов продемонстрировал Фонтана [Fontana, 1990]. БНЦ можно назвать идеальным перевязочным средством (рис. 1.13). У неё высокая влажность (до 99 %), высокая прочность на разрыв во влажном состоянии, проницаемость, гибкость, полупрозрачность, отличная биосовместимость [Curvello, 2019]. После практического использования было обнаружено, что БНЦ имеет дополнительные преимущества, такие как, обеспечение потоотделения и газообмена, устранение экссудатов, уменьшение боли, отсутствие потерь электролитов и белков, предотвращение инфекции, ускорение заживления [Abeer, 2014].

Механизм обезболивания не ясен, высказано два предположения, что он может быть связан захватом ионов посредством водородных связей целлюлозы или с имитацией трехмерной сеткой БНЦ поверхности кожи,

что создаёт оптимальные условия для заживления и регенерации [Czaja, 2006; Czaja, 2007, Wouk, 1998].

Эти выдающиеся преимущества привели к появлению ВС на рынке

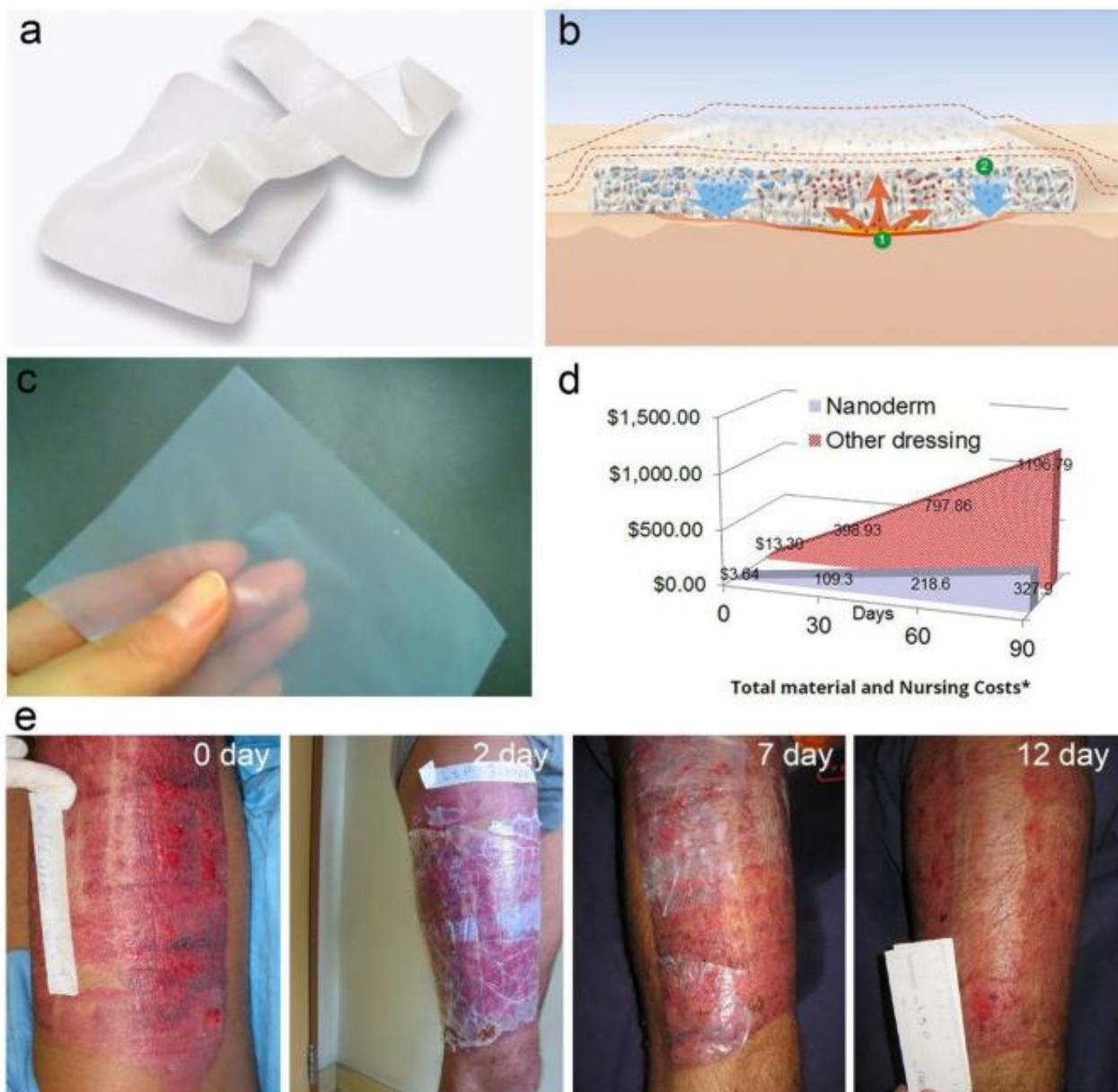


Рисунок 1.13 – Раневые покрытия на основе БНЦ. (а) Раневое покрытие из влажной БНЦ Suprasorb®X, Lohmann and Rauscher International GmbH & Co., состоящая из 1,5–4,3 % БНЦ и воды; (b) схема показывает, что Suprasorb®X позволяет абсорбировать экссудат из раны и передавать влагу в другие области с небольшим количеством экссудата; (c) раневое покрытие из сухой БНЦ Nanoderm TM, Axcelon Dermacare Inc, гибкое и полупрозрачное; (d) общие затраты на материалы и уход за ранами Nanoderm TM по сравнению с обычной перевязкой; (e) Раневое покрытие Nanoderm TM наложено на пациента: 0, 2, 7 и 12 дней после лечения [Zhong, 2020]

устройств для перевязки ран. Перевязочные материалы на основе БНЦ продаются под торговыми марками Nanoderm ТМ., Bionext®, Membracell®, Suprasorb® X, Biofill®, Bioprocess®, Xylos®, Gengiflex®, Xcell® и т. д. [Farah, 1990; Abeer, 2014; Zhong, 2020]. Раневые повязки из БНЦ показывают более высокую эффективность по сравнению с этими традиционно используемыми марлевыми или синтетическими материалами, такими как Tegaderm®, Cuprophan® или Xeroform™ [Picheth, 2017].

Эффективность применения БНЦ клинически доказана, БНЦ широко используется для лечения артериальных и венозных язв, диабетических язв, пролежней, ожогов, послеоперационных хирургических ран, ссадин, разрывов и т. д. [Венгерович, 2011; Венгерович, 2014; Anton-Sales, 2019;] , кроме того, БНЦ используется в качестве кожных трансплантатов [Kowalska-Ludwicka, 2013; Portela, 2019]. В работе [Portal, 2009] раневая повязка БНЦ Dermafill™ применялась на хронических ранах, и было установлено, что продолжительность эпителизации сокращается с 315 дней (в контроле) до 81 дня (с БНЦ).

Фармацевтика и диагностика

Можно выделить следующие приложения БНЦ в фармацевтике и диагностике: как биосенсор, как диагностическое средство, как агент доставки лекарств, в том числе в косметике.

В биосенсорах в качестве биочувствительных элементов могут использоваться антитела, рецепторы и ферменты. В ответ на поврежденную ткань, воспалительные явления, инфекции, мышечную дистрофию или инфаркт миокарда уровень этих веществ изменяется, при этом биологические сигналы регистрируются в реальном времени *in vivo*. Биосенсоры могут применяться как в диагностике, так и в клинической практике, а биометрические данные могут поступать непосредственно врачу либо другому заинтересованному лицу [Moniri, 2017].

Наноконпозиты из БНЦ с серебром используются в биоанализе в качестве ламелей поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния (SERS) с использованием тиосалициловой кислоты и 2,2-дитиодипиридина в качестве аналитов. Эти наноконпозиты используются в биоанализе аминокислот: 1-фенилаланина, 1-глутамина и 1-гистидина [Moniri, 2017]. Созданы наноконпозиты БНЦ с золотом для амперометрического определения уровня глюкозы [Wang, 2010]. Описаны биосенсоры, определяющие в биологических жидкостях концентрацию лактата, билирубина, холестерина [Gomes, 2020; Lv, 2018; Tabatabaee, 2019].

Есть сообщения о применении модифицированной БНЦ в биоэлектронике для изучения и лечения нейродегенеративных заболеваний [Carvalho, 2017; Carvalho, 2019].

Способность БНЦ к сорбции и десорбции объясняет успешность использования её для доставки фармацевтических средств. Это могут быть капсулы из БНЦ, либо пластины или гранулы БНЦ, пропитанные лекарственным средством. БНЦ позиционируется в качестве материала доставки с существенным увеличением длительности высвобождения лекарства, как при пероральном, так и внутрикожном введении. БНЦ и конпозиты из неё относят к «умным» материалам, скорость доставки которыми зависит от изменений температуры и pH.

Описана доставка тетрациклина, лидокаина, ибупрофена, белков, парацетамола, кофеина, гидрохлорида берберины и сульфата берберины [de Oliveira Barud, 2016], этот спектр постоянно пополняется, расширен спектр терапевтических групп, добавлены липофильные вещества, антиоксиданты и наркотики [Klemm, 2020; Mensah, 2022]. Популярным приложением БНЦ является использование её в качестве упаковки для доставки пробиотиков [Gregory, 2021].

Описано применение БНЦ для улавливания клеток рака [Autier, 2019; O'Donnell, 2018].

Kusano Sakko Inc. использует БНЦ в качестве носителя лекарств для доставки противоопухолевого агента, при этом БНЦ обеспечивает контролируемое высвобождение лекарств [Kusano Sakko Inc, 2020]. Axcelon Dermacare Inc. утверждает, что ими разрабатывается пероральная вакцина, БНЦ используется в качестве носителя лекарственного средства для поддержания активности вакцины во время транспортировки в желудке [Axcelon Dermacare Inc, 2020].

Условно как агент доставки лекарств БНЦ можно рассматривать в косметологии. Использование БНЦ в косметике хорошо коммерциализировано: [CPKelco Inc, 2020; Kusano Sakko Inc, 2020]. Кроме масок для лица и лечения кожных заболеваний БНЦ применяется в суспензированной форме с функцией доставки ферментов, ароматических веществ и т.п. [Zhong, 2020].

Импланты и биоимпланты

Технологические свойства БЦ позволяют ее применять в таких важных областях как искусственные кровеносные сосуды. В работах [Klemm, 2001; Klemm, 2005; Klemm, 2006; Schumann, 2009; Wippermann, 2009] разработаны опытные сосуды из БНЦ, синтезированные в форме трубок правильной формы с разным внутренним диаметром, толщиной и длиной стенки. Такие трубки БЦ стерилизуются штатными способами. Показаны успешные хирургические испытания *in vivo* на крысах, свиньях и овцах. Далее был проведен ряд аналогичных работ другими исследователями и показана воспроизводимость [Putra, 2008; Bäckdahl, 2006; Bäckdahl, 2008; Fink, 2010].

Композиты БНЦ исследуются для получения сосудистой ткани, ткани сердечного клапана, хрящевых и менисковых имплантов, для пластики костной, хрящевой и соединительной ткани, для получения зубных и оральных имплантов, для получения твердой мозговой оболочки, в качестве биоматериала для реконструкции поврежденных нервных тканей, для получения искусственной роговой оболочки, протеза барабанной перепонки

и протеза ушной раковины, протеза голосовых связок, для получения протезов мочевого пузыря, почки [de Oliveira Barud, 2016; Bodin, 2007; Svensson, 2005], трубчатых имплантов желчного протока [Klemm, 2020]. Созданы органоподобные трехмерные гели, потенциально их можно вживить в крупные органы, такие как печень или почка [de Oliveira Barud, 2016; Sämfors, 2019]. Есть первые положительные опыты по выращиванию на БНЦ клеток пигментного эпителия сетчатки глаза из стволовых клеток [Goncalves, 2016].

В работе [Autie, 2019] показано успешное использование модифицированной БНЦ для улавливания клеток рака. Опыты проведены на крысах, после удаления глиобластом наложена БНЦ и она показала себя как ловушка раковых клеток.

Продукты из БНЦ Gengiflex ® и Gore-Tex ® предназначены для применения в стоматологии. Эти продукты (композиты с гидроксиапатитом) были созданы для улучшения состояния тканей пародонта [Novaes, 1992; Novaes, 1997].

Axcelon Dermacare Inc. объявила о разработке нескольких других медицинских устройств на базе БНЦ, включая контактные линзы, сосудистые трансплантаты и искусственные барабанные перепонки [Axcelon Dermacare Inc, 2020]. БНЦ подробно изучался для изготовления сосудистых трансплантатов [Pacheco, 2018]. Его превосходная механическая прочность во влажном состоянии и высокая биосовместимость делают его идеальным кандидатом для сосудистых трансплантатов. Компания Jenpolymer Materials Ltd. & Co. разработала сосудистые трансплантаты под торговой маркой Basyc для операции коронарного шунтирования [Schumann, 2009; Picheth, 2017].

Другие компании, такие как Innovatec и Axcelon Dermacare Inc., также объявляют о своей линейке устройств для сосудистых трансплантатов на основе БНЦ [Czaja, 2007; Portela, 2019; Axcelon Dermacare Inc, 2020].

Матрица для культивирования тканей

В технологии культивирования тканей требуется матрица в качестве подложки, на которой будут размещаться клетки и формироваться в ткани. Биоматрицы представляют собой новую систему, близко имитирующую сложные иерархические структуры, характерные для нативной ткани. В результате проектируется микросреда, необходимая для клеточного размножения, миграции и дифференцировки [de Oliveira Barud, 2016]. Кроме трехмерной архитектуры, БНЦ отличают такие качества как биосовместимость и низкая цитотоксичность [Moniri, 2017]. Петерсен и Гатенхольм объяснили, что биосовместимость ВС может быть приписана структуре ВС, которая похожа на компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген [Petersen, 2011].

Получены матрицы в виде композитов с полиэтиленгликолем, фиброином шелка, альгинатом натрия, карбиокисметилцеллюлозой, оксидом графена, лецитином. Обязательным условием получения качественной матрицы является её лиофильная сушка [de Oliveira Barud, 2016; Moniri, 2017].

Показано успешное размножение на пластинах БНЦ шванновских клеток, эндотелиальных клеток вены человека, остеобластов человека, гладкомышечные клетки, жировой ткани, эмбриональные клетки почек, костеформирующие остеобласты и фибробласты, мезенхимальных стволовых клеток [de Oliveira Barud, 2016; Backdahl, 2006; Sanchavanakit, 2006], эпителиальных и стромальных клеток роговицы кроликов [Zhang C., 2020].

Поскольку БНЦ характеризуется слабой адгезией клеток, предложен ряд модификаций её повышения. Это плазменные методы (азотная плазма) для повышения концентрации функциональных аминогрупп на поверхности БНЦ. В нативную БНЦ введены сигнальные пептиды в смеси с углевод-связывающим модулем. Это позволило улучшить адгезию нейрональных и мезенхимальных клеток. На модифицированных поверхностях БНЦ успешно выращены фибробласты [de Oliveira Barud, 2016].

3D-печать

3D-печать (аддитивное производство) является отличным инструментом, позволяющим изготавливать сложные трехмерные конструкции. Такие конструкции востребованы в биомедицине. Поскольку БНЦ способна принимать любую форму в процессе роста, был создан широкий спектр трехмерных (3D) форм с высокой точностью [Laromaine, 2018; Greca, 2018].

Нативная БНЦ использовалась как компонент при составлении композитных смесей для чернил [Wei, 2020; Gutierrez, 2019; Huang, 2019; Pillai, 2021]. Кроме того, разработана 3D печать чернилами с живыми бактериями [Schaffner, 2017; Shin, 2019], пример приведен на рис. 1.14.

Sämfors и соавторы использовали щадящую технику 3D-печати. По данным компьютерной томографии внешнего края почки из глины был изготовлен полый шаблон почки, он был использован в качестве формы для печати. Древоподобная сосудистая сетевая структура была напечатана отдельно из полилактида. Затем эти две структуры совмещались и в них наливалась гомогенизированная дегазированная смесь альгината и БНЦ (10/90% мас. / мас.). Конструкцию помещали в морозильную камеру с температурой $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 24 часа, затем осторожно нагревали, чтобы удалить внешнюю форму, охлаждают до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение дополнительных 2 часов, после чего структуру сушили вымораживанием. Наконец, высушенная структура была снята погружением в 100 мМ CaCl_2 [Sämfors, 2019].

В настоящее время 3D-печать структур, содержащих целлюлозу, в основном выполняется коммерческими чернилами, содержащими растительную целлюлозу. Однако нет никаких сомнений в том, что аналогичные методологии можно использовать для 3D-печати чернил на основе БНЦ, это более экологично и гарантирует устойчивое развитие технологии целлюлозосодержащих чернил [Gregory, 2021].

Однако сам подход аддитивного производства предполагает использование специализированного оборудования, при этом большая часть

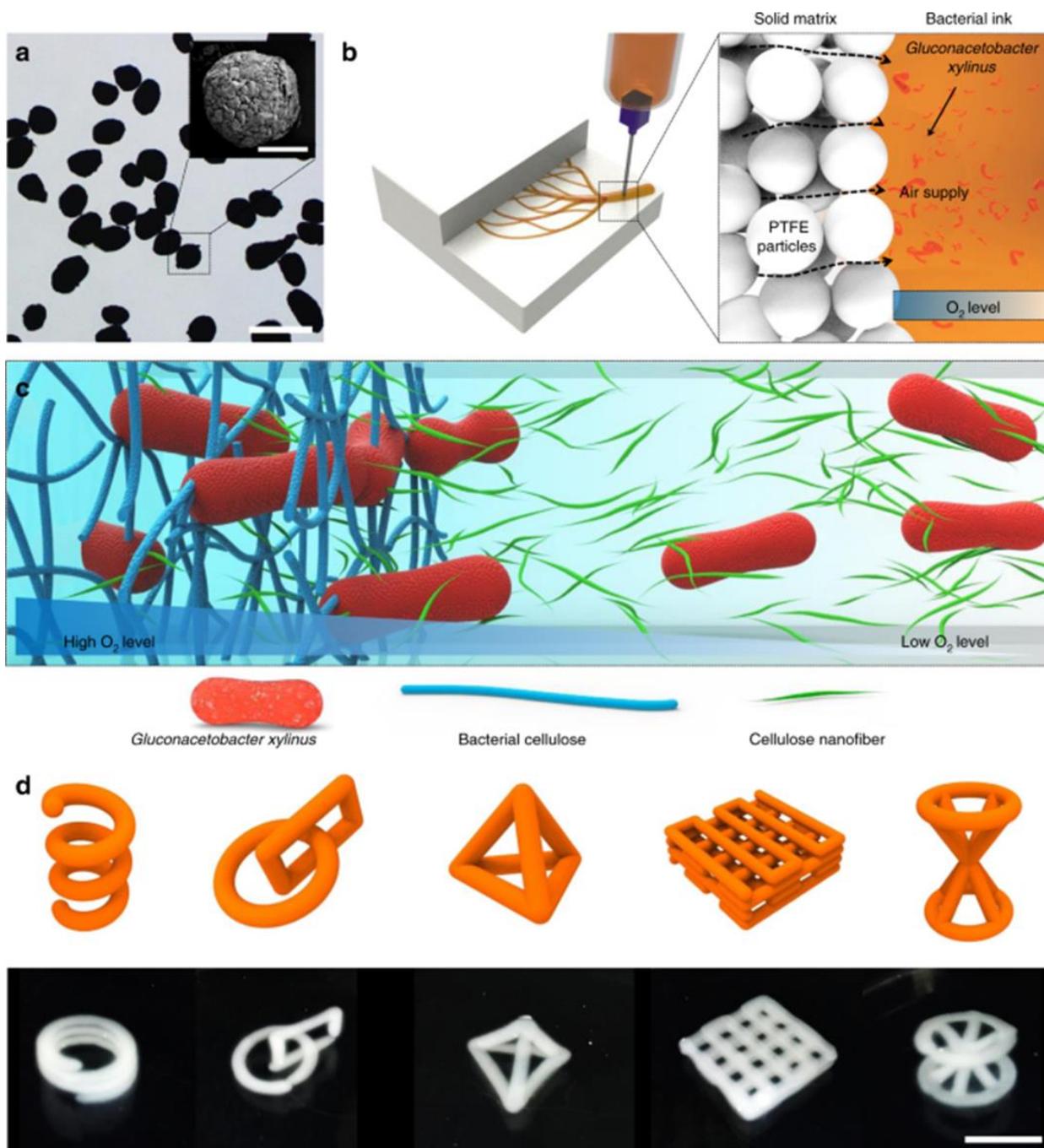


Рисунок 1.14 – 3D-печать чернилами, содержащими бактерии, в твердую матрицу: a –микрочастицы ПТФЭ, используемых в качестве твердой матрицы; b –бактерии, содержащиеся в чернилах, были напечатаны внутри твердой матрицы. Кислород подавался через твердые частицы на поверхность чернил CNF, что позволяло *K. xylinus* осуществлять метаболизм; c – БНЦ была получена на поверхности напечатанной гидрогелевой краски CNF в условиях высокого содержания кислорода; d – спираль, прямоугольник, соединенный с кольцом, тетраэдр, многослойная решетка и структура песочных часов CNF/BC после инкубации, напечатанные в соответствии с чертежами. Шкала составляет 500 мкм на оптическом микроскопическом изображении, 100 мкм на изображении FE-SEM, 1 см на оптических микроскопических изображениях d [Shin, 2015].

продукта представляет собой вспомогательный материал, а не живой материал. Если стоит задача получения больших и сложных форм, то более целесообразным будет использование строительных блоков, при котором в трехмерные формы соединяются модульные единицы живого материала, полученные отдельно, в том числе с помощью 3 D-печати. БНЦ – это отличный материал для создания инженерных живых материалов (engineered living materials, ELM) — то есть материалов, содержащих клетки на материале или внутри него, как правило, такой материал состоит из модулей и способен к саморегенерации при повреждении [Gilbert, 2019; Gilbert, 2021]. В работе [Caro-Astorga, 2021] и для получения строительных блоков, и для соединения блоков между собой, предложено использовать сфероидные частицы БНЦ, этот же подход предложено применять для регенерации органов.

1.7.4.3 Применение в биотехнологической промышленности

Основным применением БНЦ в биотехнологической промышленности является использование её в качестве матрицы для иммобилизации биологически активных веществ (чаще всего ферментов) и микроорганизмов.

Успешно иммобилизован ряд ферментов, таких как глюкоамилаза, липаза [Wu, 2008], лакказа [Chen L., 2015], лизоцим [Bayazidi, 2018], отмечены высокая ферментативная активность и высокая стабильность при хранении ферментов. Иммобилизованы онкоцитотоксические вещества [Адамчик, 2012 а, б; Капуцкий, 2010].

Иммобилизация дрожжей на БНЦ методом адсорбция-инкубация была показана в 2009 г. Нгуеном, при этом было показано повышение зимазной активности дрожжей [Nguyen, 2009]. По этой же схеме позднее были иммобилизованы коринебактерии для синтеза лизина [Tam, 2014], лактобактерии для получения активных и защищенных от действия желудочного сока и желчи пробиотиков [Chávarri, 2021; Fijałkowski, 2016; Khorasani, 2016], сенная палочка для получения композитного раневого

покрытия [Savitskaya, 2019], деструкторы фенола [Колобова, 2019], бизидиомицеты для синтеза белка и каротиноидов [Гаврюшина, 2020].

Ещё одним направлением в биотехнологии является использование БНЦ для разделения клеток, вирусов (например, Covid-19) и некоторых веществ (например, ДНК) [Gregory, 2021; Tanga, 2021].

К биотехнологической промышленности можно отнести и получение имплантов и биоимплантов на матрицах БНЦ либо с помощью 3D-печати, что было описано в разделе биомедицины.

1.7.4.4 Применение в защите окружающей среды

Можно выделить три основных направления применения БНЦ в области защиты окружающей среды: очистка сточных вод, сенсор загрязнений и биоремедиация (нативная БНЦ – для удаления тяжелых металлов, включением БНЦ в углеродные нанотрубки получены маслопоглощающие материалы). Свойства водо- и газопроницаемости в совокупности с нанопористостью позволяют использовать БНЦ для создания фильтрующих мембран и барьерных слоёв, супервпитывающих адсорбирующих материалов, а так же для биоремедиации [Gregory, D.A., 2021; Klemm, D., 2020].

В широком смысле БНЦ является эталоном экологичности, так как полностью соответствует модели «производство-модификация-применение-рециклизация», принятой в экономике замкнутого цикла [Jang, 2017; Zhang, 2021; Forte, 2021].

1.7.4.5 Применение в целлюлозно-бумажной промышленности

БНЦ используется для реставрации бумаги, создания особо прочных сортов бумаги (например, денежных знаков), а также в виде композитов для придания бумаге новых свойств (биоактивности, электропроводности, электроизоляции, огнеупорных свойств и др.).

Высокая механическая прочность позволяет использовать БНЦ для вторичной переработки и восстановления бумаги. Российскими учеными Смирновой Е.Г. с коллегами впервые была проведена успешная реставрация старинных рукописей, работы в этом направлении будут продолжены при наличии достаточного количества БНЦ [Смирнова, 2019; Смирнова, 2020; пат. РФ 2011123979; пат. РФ 2415221]. Аналогичные работы были проведены за рубежом [Santos, 2017; Surma-Ślusarska, 2008].

Покрытие бумаги слоем БНЦ улучшает ее гибкость и долговечность. Добавка БНЦ в состав бумаги улучшает ее печатные характеристики – увеличивается оптическая плотность отпечатков, блеск, печатная краска лучше удерживается на поверхности бумаги. Путем интеграции функциональных групп, таких как фосфат, можно придать бумаге огнезащитные свойства [Skočaj, 2019; da Silva, 2021; Gregory, 2021].

1.7.4.6 Применение в легкой промышленности

БНЦ позиционируется как новый материал для получения текстиля, экокожи [Gregory, 2021; Provin, 2021; da Silva, 2021] и принципиально нового экологического направления модной индустрии под названием «Биокутю» [Wood, 2019; Lee, 2021]. Кроме того, именно к лёгкой промышленности относится такой хорошо коммерциализированный сектор, как производство товаров личной гигиены: косметических масок, подгузников, прокладок, моющих средств. После продуктов питания это второй сектор по объёму выпуска БНЦ [Zhong, 2020].

В настоящее время БНЦ уже используется в коммерческих целях в качестве источника сырья для производства вискозы и тканей, не содержащих растений [Huang, 2014]. Обычно регенерированные волокна, такие как вискоза, купраммоний получают из древесной или хлопковой целлюлозы. Процесс варки древесной целлюлозы сопряжен с затратой энергии, пресной воды и экологически вредными выбросами. Кроме того, скорость роста древесной целлюлозы уступает скорости роста БНЦ [Zhong,

2020]. На пути развития получения текстиля и экокожи из БНЦ предстоит преодолеть такие недостатки БНЦ, как ломкость высушенных образцов, высокая гидрофильность, биоразлагаемость [Provin, 2021; da Silva, 2021].

Трендом, появившимся в 2020 г., является противопоставление БНЦ целлюлозе растительного происхождения в том контексте, что БНЦ производится очень чистой, а растительная целлюлоза требует выделения из композита, образованного целлюлозой, гемицеллюлозами, лигнином, эфирно-масличной фракцией, минеральными веществами и другими специфичными компонентами [Zhong, 2020; da Silva, 2021; Provin, 2021].

Nanollose Ltd., австралийская технологическая компания, является пионером в области получения текстиля из БНЦ [Nanollose Ltd, 2020]. Совместно с нидонезийской компанией Supra Natami Utama в 2018 г было разработано превращение БНЦ в вискозное волокно Nullarbor™ (рис. 1.15). БНЦ получают путем ферментации кокосовой воды [Zhong, 2020].

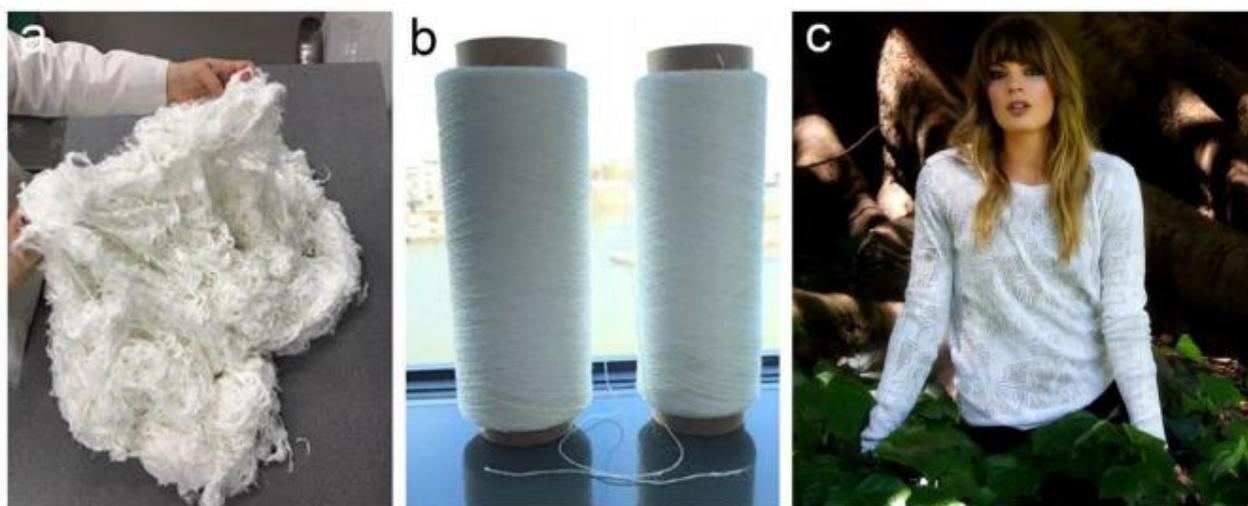


Рисунок 1.15 – Текстильные материалы Nanollose Ltd:
а – волокно, б – нити, с – одежда [Zhong, 2020]

1.7.4.7 Применение в химической промышленности

Получены нитраты БНЦ и предприняты попытки создания взрывчатых композитов на их основе [Budaeva, 2019; Jamal, 2021; Jori Roslan, 2021].

1.7.4.8 Применение в электронике и энергетике

Композиты из БНЦ используются в электронике для создания диэлектрических накопителей, суперконденсаторов, топливных элементов, экранирования электромагнитных помех, термоэлектрических устройств и устройств памяти, а также для мобильной, получаемой 3D –печатью, и гибкой электроники [Klemm, 2020]. Такие мировые электронные концерны, как Apple и Samsung, уже на современном этапе внедряют в свои технологии применение БНЦ для получения гибких сенсорных экранов, Sony использует БНЦ в акустических мембранах.

Растущие экологические проблемы приводят к увеличению спроса на возобновляемые источники энергии. Важными аспектами здесь являются устройства накопления энергии, такие как суперконденсаторы. Суперконденсаторы обладают высокой плотностью мощности, длительной циклической стабильностью и быстрым процессом заряда и разряда [Winter, 2004]. Возрастает спрос на недорогие и гибкие электроды. Описано, что высокая пористость электродов может увеличить скорость диффузии ионов и, таким образом, улучшить характеристики суперконденсатора. БНЦ, как уже отмечалось, отличается высокопористой сеткой из нановолокон и высокой прочностью на разрыв, поэтому она подходит в качестве основного материала для гибких и легких электродов [Hosseini, 2019].

Интересным направлением является применение уксуснокислых бактерий в биотопливных элементах [Алфёров, 2011; Алфёров, 2014; Alferov, 2014].

Углеродные нановолокна

Поскольку БНЦ не является проводящим материалом, необходимо ее покрывать или включать в ее структуру проводящие компоненты, т.е. создавать композиты на основе БНЦ. Существует множество способов сделать БНЦ электропроводником. Например, производство углеродных нановолокон из БНЦ путем сублимационной сушки и последующего

процесса карбонизации. Затем полученные нановолокна БНЦ можно модифицировать еще больше, например, путем введения наночастиц серебра и полимеризации полианилина *in situ*, либо путем модификации полидофамином и введения ионов двухвалентного железа в качестве добавки к окислительно-восстановительному электролиту для повышения емкостных характеристик [Hosseini, 2019].

Другой подход также связан с получением иерархических пористых материалов из активированного угля на основе лиофилизированного альгината натрия и продуктов БНЦ. Их карбонизировали, а затем обрабатывали гидроксидом калия для получения активированного угля [Bai, 2018].

Электропроводность также может быть достигнута путем встраивания графена и углеродных нанотрубок в сетку БНЦ и путем полимеризации полипиррола на ее поверхности [Bai, 2019].

1.7.5 Сырьё и технология получения бактериальной наноцеллюлозы

1.7.5.1 Сырьё для получения бактериальной наноцеллюлозы

Питательная среда очень важна в производстве БНЦ, так как она не только обеспечивает продуцент необходимыми питательными веществами для роста бактерий и биосинтеза БНЦ, но и значительно влияет на структуру и выход БНЦ, а также на её механические и физические свойства [Jozala, 2016]. Типичная питательная среда состоит из источника углерода, источника азота и определенных питательных элементов, таких как фосфор, калий, сера и магний [Andriani, 2020].

Для биосинтеза БНЦ индивидуальными штаммами классической является среда Хестрина и Шремма: 2,0 мас.% глюкозы, 0,5 мас.% пептона, 0,5 мас.% дрожжевого экстракта, 0,27 мас.% Na_2HPO_4 и 0,115 мас.% лимонной кислоты [Hestrin and Schramm, 1954]. Однако в таком случае

питательные среды составляют ~ 30% от общей стоимости производства БНЦ [Rivas, 2004].

Несмотря на широкую востребованность в БЦ в различных отраслях экономики, её реальное применение намного ниже её потенциальных возможностей, что обусловлено низкой производительностью в технологическом процессе, а следовательно, высокой себестоимостью БЦ [Campano, 2016].

Ключевыми факторами в вопросе снижения себестоимости являются 1) поиск нового высокоэффективного источника углерода и 2) повышение эффективности производства БНЦ. Эффективность производства БНЦ можно повысить следующим образом:

а) поиск новых высокоэффективных продуцентов в природной среде [Yang, 2013; Aydin, 2014];

б) использование мутагенеза и методов генной инженерии для повышения эффективности штаммов [Li, 2016];

в) оптимизация условий биосинтеза БНЦ [Krystynowicz, 2002; Cheng K., 2009];

г) инженерно-аппаратурное оформление процесса, способствующее интенсификации производства [Sharma, 2019; Klemm, 2020].

Снижение себестоимости сырья – одна из самых обсуждаемых стратегий в технологии БНЦ [Keshk, 2014; Shi, 2014; Velásquez-Riaño, 2017; Islam, 2017; Hussain, 2019; Zhong, 2020; Urbina, 2021].

В поисках дешевых питательных сред необходимо исходить из физиологических потребностей продуцентов. Уксуснокислые бактерии в качестве источников углерода способны усваивать глюкозу, сахарозу, фруктозу, маннит, этанол, арабитол, глицерин в качестве источников азота дрожжевой экстракт, пептон, гидролизат казеина, сульфат аммония и кукурузный экстракт [Keshk, 2005; Mikkelsen, 2009; Coban, 2011; Ruka, 2012; Buldum, 2018]. Достаточно подробно исследовано влияние на биосинтез БНЦ минорных компонентов среды, таких как лактат, сульфат магния, альгинат

натрия и отмечено их положительное влияние на выход БНЦ [Matsuoka, 1996; Son, 2003; Zhou, 2007].

Для удешевления себестоимости БНЦ предложено использовать промышленное пищевое сырьё, такое как кокосовая вода (содержится в незрелых плодах кокоса, состоит из 95% воды, 4% углеводов и менее 1% белков и жиров), кокосовое и соевое молоко (продукт переработки зрелых плодов растений), фруктовые и ягодные соки [Zhong, 1996; Zhong, 2020; Kurosumi, 2009]. Данные виды сырья являются основными в Азиатско-Тихоокеанском регионе, то есть и на рынке БНЦ в целом. Предложено ферментировать финиковый [Moosavi-Nasab, 2010] и кленовый сироп [Zeng, 2011].

Логично использование отходов сахарного производства, таких как свекловичная и тростниковая меласса [Bae, 2004; Bae, 2005; Keshk, 2006; Moon, 2006; Liiskina, 2015; Богатырева, 2016; Сапунова, 2016; пат. РФ 2189394; пат РФ 2536257; пат РФ 2536973; Kusano Sakko Inc, 2020; Abol-Fotouh, 2020; Atykyan, 2020]. Это классическое сырьё в промышленной биотехнологии. Технологии хранения и переработки такого концентрированного сырья хорошо отработаны в производстве хлебопекарных дрожжей, этанола, лимонной кислоты и др. Можно с уверенностью сказать, что это сырьё станет основным для производства БНЦ в Северном полушарии.

Предложено использование массовых отходов пищевых производств, таких как отработанные пивные дрожжи, отходы при производстве сока из фруктов и ягод, гнилые фруктовые культуры, жидкие сточные воды ферментации этанола, пива, вин, то есть барда; подсырная и творожная сыворотка [Ha, 2008; Ревин, 2014; пат. РФ 2141530; Hong and Qiu 2008; Kongruang, 2008; Carreira, 2011; Rani, 2011; Wu, 2012; Wu, 2013; Vazquez, 2013; Jozala, 2015; Velásquez-Riaño, 2017; Molina-Ramírez, 2018; Cao, 2018; Julia, 2019; Ревин, 2014; Abol-Fotouh, 2020; Adebayo-Tayo, 2017; Algar, 2015; Ha, 2008; Revin, 2018; Ryabtseva, 2021]. Использование такого сырья

значительно снижает стоимость производства БНЦ и дополнительно снижает загрязнение окружающей среды, вызванное неправильной утилизацией промышленных отходов. Но применение сред на основе отходов пищевых производств имеет и ряд недостатков, так как отходы – это скоропортящееся сырьё, достаточно сложно соблюдать график поставок этого скоропортящегося сырья с пищевых предприятий на производство БНЦ. Кроме того, возникнут большие проблемы с микробной обсемененностью скоропортящегося сырья, требуется введение дополнительной стадии стерилизации питательной среды для избежания контаминации посторонней микрофлорой, что усложняет способ получения БНЦ технологически (требуется дополнительное оборудование и электроэнергия) и ведёт к повышению себестоимости готового продукта.

Одним из последних трендов является концепция получения ценной БНЦ из дешёвой растительной целлюлозы. Идея стала настолько глобальной, что ей посвящены не только экспериментальные статьи, но и порядка десяти обзоров [Cacicedo, 2016; Velásquez-Riaño, 2017; Islam, 2017; Hussain, 2019; Sharma, 2019; Ul-Islam, 2020; Lin, 2020; Zhong, 2020; Urbina, 2021; Lupaşcu, 2022]. Целлюлоза является одним из наиболее распространённых полисахаридов в мире и рассматривается как неисчерпаемый и универсальный источник: этот природный полимер составляет около 1/3 растительных тканей и возобновляется путём фотосинтеза. Целлюлозосодержащее сырьё является массовым, доступным, дешёвым, ежегодно воспроизводимым, и оно не конкурирует с пищевым производством.

Работы по получению БНЦ из целлюлозосодержащего сырья начаты с 2009 г [Goelzer, 2009] и исследователи отмечают такие проблемы, как наличие ингибиторов в питательных средах, полученных из целлюлозосодержащего сырья [Hong F., 2011; Guo, 2013; Zhang, 2014; Kiziltas, 2015; Cheng Z., 2016] снижение степени кристалличности БНЦ синтезированных на этих средах [Goelzer, 2009], и снижение выхода БНЦ

[Molina-Ramírez, 2018; Guo, 2013]. Наличие ингибиторов становится особенно критично при использовании химического гидролиза для извлечения сахаров из целлюлозосодержащего сырья. Химический гидролиз проводится при высоких температурах, давлении, в агрессивных кислотных или щелочных средах, что всегда приводит к образованию ингибиторов (фурфурола, оксиметилфурфурола, летучих кислот, продуктов деструкции лигнина и т.д.), поэтому требуется детоксификация питательных сред [Guo, 2013; Mussatto, 2004; Zhang S., 2014a; Zhang S., 2014b; Zou, 2017]. Ферментативный гидролиз проходит в мягких условиях, поэтому качество получаемых питательных сред выше, а ингибиторов в них меньше [Goelzer, 2009; Hong, 2012; Fan, 2016; Guo, 2016].

Детоксификация проводится с целью снижения негативного влияния ингибиторов. Кислотные гидролизаты нейтрализуют, при этом показана предпочтительность использования извести перед гидроксидом натрия. Для детоксификации применяют обработку активированным углем, ионообменной смолой, лакказой [Hong and Qiu 2008; Yang, 2013; Cheng, 2017; Luo, 2017 a, b; Cheng, 2017; Chen J., 2019; Abdelraof, 2019]

В работе [Vasconcellos, 2019] предложен способ адаптации штамма *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 к автогидролизной питательной среде. По мере проведения 12 циклов повышалась устойчивость штамма к фенольным соединениям, а синтезируемая БНЦ сохраняла те же свойства, что и на стандартной культуральной среде. Это противоречит остальной мировой литературе. Известно, что структурные особенности, и, следовательно, качество БЦ может сильно варьировать в зависимости от состава питательной среды, условий культивирования и применяемого для биосинтеза штамма [Campano, 2016; Chen S-Q, 2017; Czaja, 2004; Krystynowicz, 2002; Lin, 2014; Singhsa, 2018; Watanabe, 1998; Chen G., 2019a; Chen G., 2019, b; Khan, 2020; Gromovykh, 2020; Zou, 2020]. В настоящее время в мировой практике нет готового эффективного решения по получению высокоценной БНЦ из малоценной растительной целлюлозы.

1.7.5.2 Технологические стадии получения бактериальной наноцеллюлозы

Можно выделить следующие стадии биосинтеза БНЦ:

- подготовка питательной среды;
- подготовка инокулята;
- биосинтез БНЦ;
- очистка БНЦ;
- сушка и/или стерилизация БНЦ;
- упаковывание, хранение на складе, реализация БНЦ.

Стадия подготовки питательной среды зависит от вида используемого сырья, основные подходы описаны в п. 1.5 Следует учитывать, что поскольку продуценты БНЦ более требовательны, чем продуценты биоэтанола, то очистка и детоксификация должна быть проведена более тщательно.

Подготовка инокулята – важная стадия технологии БНЦ. Исследована зависимость скорости биосинтеза БНЦ от дозировки и методов подготовки инокулята, рекомендовано для получения инокулята использовать питательную среду, идентичную используемой в основном биосинтезе, то есть после адаптации. В лабораторной практике, как правило, используется инокулят, полученный на синтетической питательной среде.

Для биосинтеза БНЦ предложены разные способы, их подробный анализ приводится в п. 1.7.5.4.

После биосинтеза гель-структуры БНЦ не являются чистыми и содержат бактериальные клетки, остатки питательных веществ и продукты метаболизма. Поэтому требуется проведение очистки. По сравнению с выделением растительной целлюлозы, когда требуется сложное, затратное отделение гемицеллюлоз, лигнина, пектина, БНЦ легко очищается, так как примеси химически не связаны с целлюлозой в гель-структурах БНЦ. Как правило, очистка состоит из трех этапов: (I) обработка БНЦ щелочными растворами при 100 ° С в течение 15–20 минут для удаления бактериальных клеток; (II) отделение БНЦ от щелочного раствора; (III) промывка БНЦ

дистиллированной водой для восстановления нейтрального значения pH [Moniri, 2017]. Кроме того, используется длительная пассивная промывка в щелочных растворах при комнатной температуре [Keshk, 2014], а также предложены способы интенсификации промывки, при этом выявлено, что повышение температуры промывки и концентрации щелочи ускоряют промывку, но приводят к мерсеризации БНЦ в щелочном растворе и необратимому изменению свойств [McKenna, 2009; Younesi, 2019]. Исследуются и другие способы промывки БНЦ: с помощью нуклеаз, в сверхкритических условиях и т.д. [Gromovykh, 2018; Pigaleva, 2019].

Как указывается Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США содержание эндотоксин в БНЦ должно составлять не более 20 единиц эндотоксина на устройство [FDA; Petersen and Gatenholm, 2011; Zhong, 2020]. В исследовательских работах редко приводятся данные по содержанию эндотоксинов, но это важно при определении цитотоксичности. По разным источникам БНЦ либо не цитотоксична, либо обладает умеренной цитотоксичностью [de Oliveira Barud, 2016; Moniri, 2017; Zhong, 2020].

В зависимости от назначения БНЦ, очищенный продукт может использоваться в виде гелей, частично или полностью высушенным [Алексеева, 2015]. Возможными методами сушки являются сублимационная сушка, сушка на воздухе при комнатной температуре и при повышенной температуре, а также горячее прессование. Сублимационная сушка обеспечивают в значительной степени сохранение структуры наносети и системы микропор. При сушке на воздухе микропористая система непрерывно превращается в структуру нанопор, при этом плёнки сильно деформируются и морщинятся из-за сильной усадки [Skvortsova, 2019]. Высушенная на воздухе БНЦ не может полностью регидратироваться [Müller, 2014]. Горячее прессование приводит к разрушению пористой структуры, которую невозможно восстановить [, 2020].

Влажные гели БНЦ должны храниться в стерильных условиях. Вопросы хранения БНЦ и исследования её деградации слабо представлены в литературе, выполнены лишь единичные работы [Betlej, 2020; Camargo, 2020; Кленова, 2018].

1.7.5.3 Оптимизация условий биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы

Исследованиям условий биосинтеза на синтетических питательных средах посвящено множество исследований. Были изучены зависимости выхода БНЦ от температуры, pH, источников углерода и их концентрации [Keshk, 2005; Coban, 2011,a; Coban, 2011, b; Zhong, 2013; Islam, 2017; Киселева, 2021; Кленова, 2018; пат. РФ 2141530; пат. РФ 2189394; пат. РФ 2536257; пат. РФ 2536973; Aloni, 1982; Bielecki, 2006; Chandrasekaran, 2017; Hassan, 2015; Hornung, 2006 a,b; Hornung, 2007; Jagannath, 2008; Masaoka, 1993; Mohammadkazemi, 2015; Noro, 2004; Park, 2003; Penttila, 2016; Pourramezan, 2009; и многие другие]. Попытки сравнить полученные данные и выявить наиболее продуктивные режимы дана в обзорах [Campano, 2016; Lin, 2013; Ефременко, 2017; Shoda, 2005; Keshk, 2014; Lee, 2014; Islam, 2017; Cacicedo, 2016; Lin, 2020; Sharma, 2019].

Однако сравнение затруднено использованием исследователями не только разных условий культивирования, но и разных продуцентов. Исследователи подбирают питательные среды, отвечающие трофическим предпочтениям продуцентов, а также остальные условия, отвечающие их физиологии, поэтому каждый новый продуцент требует проведения большого пласта исследований.

Кроме скорости биосинтеза и выхода БНЦ, немаловажным фактором является её качество, что также сильно зависит от используемых штаммов и условий культивирования [Chen, 2017; Czaja, 2004; Krystynowicz, 2002; Lin, 2014; Singhsa, 2018; Watanabe, 1998]. Если в начале исследований БНЦ было достаточно доказать, что продуцируемый метаболит является целлюлозой,

показать отличия БНЦ от растительной целлюлозы, то в настоящее время назрел вопрос о классификации самой БНЦ в зависимости от её физико-химических свойств. При этом сложно сказать, качественная данная БНЦ или нет, так как в разных областях применения требования к качеству могут сильно отличаться.

Ситуация осложняется тем, что при внесении таких добавок, как карбоксиметилцеллюлоза, лигносульфонат и многих других (п. 1.7.3) возможно создание композитов *in vivo*, и свойства композитов будут радикально отличаться от свойств нативной БНЦ.

1.7.5.4 Инженерно-аппаратурное оформление процесса биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы

Основными способами получения БНЦ являются статический и способ с перемешиванием (рис. 1.16). Выбор между способами зависит от последующего применения, так как морфология и свойства БНЦ, полученные этими двумя способами, сильно различаются [Islam, 2017; Brandes, 2018; Pang, 2020]. При статическом способе гель-пленка БНЦ образуется на границе раздела воздух-жидкость культуральной среды; при способе с перемешиванием небольшие гранулы БНЦ неправильной формы суспендированы во всём объёме питательной среды.

Бактерии, синтезирующие БНЦ, являются строгими аэробами, поэтому количество растворенного кислорода в питательной среде влияет на процесс биосинтеза БНЦ. При культивировании в статических условиях, кислород является лимитирующим фактором для протекающих процессов метаболизма в клетках и биосинтеза БНЦ, а также влияет на физико-химические свойства БНЦ [Shirai, 1994; Aloni, 1982]. Недостаточное количество кислорода в питательной среде приводит к прекращению роста клеток микроорганизмов и биосинтеза БНЦ. Штаммы, используемые при статической ферментации, обладают более высокой генетической стабильностью для непрерывного производства БНЦ, но эффективность производства ограничена самим

способом: низкая скорость биосинтеза приводит к высокой стоимости, кроме того, требуются большие производственные площади, поэтому масштабирование затруднено [Ross, 1991; Zhong, 2020].

Идеологически перемешивание культуры было призвано интенсифицировать биосинтез за счет подачи кислорода, так как уксуснокислые бактерии – строгие аэробы, однако, было обнаружено, что эффективность биосинтеза идентична при подаче воздуха и без неё [Czaja, 2004; Inagaki, 1989; Toyosaki, 1995; Горомовых, 2018]. Более того, избыточная аэрация ведет к снижению выхода БНЦ [Czaja, 2004; Tantratian, 2005]. Способ получения БНЦ с перемешиванием легко масштабируется [Chen G., 2018], но часто отмечаются мутации – стихийно появляются не способные синтезировать БНЦ продуценты, что также ограничивает масштабирование процесса [Krystynowicz, 2002; Czaja, 2004; Chawla, 2009; Yang, 2014; Sani, 2010; Zhong, 2020].

Несмотря на несхожесть внешнего вида гелей БНЦ, полученных двумя способами, они демонстрируют схожую микроструктуру трехмерной сетчатой сети [CPKelco Inc, 2020]. Однако при этом гели БНЦ, полученные при перемешивании, имеют более низкую степень полимеризации, более низкую кристалличность, более низкую долю I α алломорфа, более низкий модуль Юнга по сравнению с показателями БНЦ, полученной в статической культуре [Watanabe, 1998; Krystynowicz, 2002; Kouda, 1996; Kouda, 1997, a; Kouda, 1997, b]. В динамических условиях повышаются водоудерживающая способность и вязкость суспензии [Krystynowicz, 2002]. Статический способ получения БНЦ позволяет получить гель-плёнки фиксированной заданной геометрии и поэтому качества получаемой БНЦ считается эталонной [Wang, 2019; Chao, 2001]. Сфера применения такой БНЦ очень широка: это нано-декоко, раневое покрытие, маска для лица, большинство композитов и т.д. Поскольку способ получения при перемешивании позволяет получить высокосuspendированную БНЦ, то такая БНЦ нашла коммерческое применение в напитках [Zhong, 2020]. Разработчики способа с

перемешиванием предлагали использовать гранулы БНЦ для доставки лекарств; для получения фрагментов и сшивания между собой сложных по форме имплантов [[Caro-Astorga, 2021](#)].

Применение биореакторов призвано повысить выход БНЦ и облегчить масштабирование биосинтеза БНЦ [[Campano, 2016](#); [Yang, 2014](#); [Wang, 2019](#)], биореакторы классифицируют по способу действия (табл. 1.8). Использование биореакторов с перемешиванием для увеличения уровня кислорода сопряжено с высокими энергозатратами. Поэтому был предложен эрлифтный биореактор с низким энергопотреблением [[Chao, 1997](#)], он был несколько раз модернизирован. Эрлифтные реакторы позволили получить БНЦ с эллиптической морфологией гранул [[Chao, 2000](#); [Chao, 2001](#)].

Вращающийся дисковый биореактор был предложен в 2002 [[Serafica, 2002](#)]. Несколько округлых дисков установлены на вращающемся центральном валу, при вращении поверхность БНЦ поочередно находится то в питательной среде, то на воздухе [[Куупе-Kinsey, 2003](#); [Ра'е, 2009](#)]. Конструкция позволяет получить БНЦ с однородной структурой в виде сгустков клееобразной массы. При этом БНЦ может производиться без повторного внесения инокулята в течение пяти циклов. Таким образом, БНЦ производится в полунепрерывном режиме в промышленном масштабе [[Lin, 2014](#)]. Перспективными являются модифицированные статические биореакторы. Реактор с подвижным слоем (оборудование для производства уксуса) предложен для производства БНЦ [[Lu, 2014](#)]. Конструкция реактора обеспечивает высокую концентрацию кислорода, при этом используется низкое напряжение сдвига. Биореактор обеспечивает высокую концентрацию клеток, хорошие показатели плёнок БНЦ по степени полимеризации, чистоте, термической стабильности. Однако, полученная БНЦ имеет неправильную форму. Поскольку высокая концентрация клеток ведет к интенсификации биосинтеза, то принцип иммобилизации способствует биосинтезу БНЦ в плёночном биореакторе [[Cheng K.-C., 2009](#); [Cheng K.-C., 2011](#)].

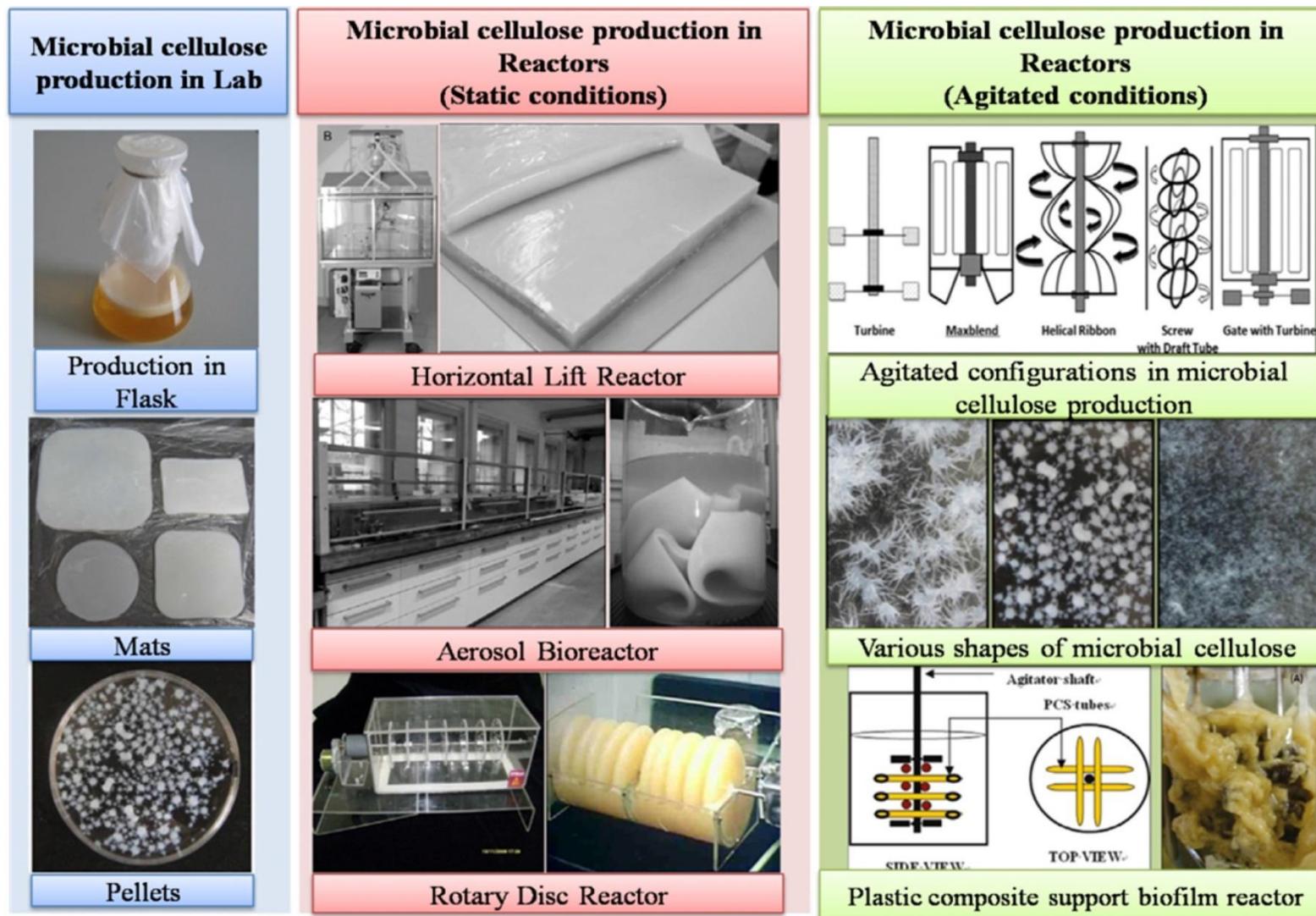


Рисунок 1.16 – Биореакторы для биосинтеза БНЦ [Shi, 2014]

Табл. 1.8 – Способы биосинтеза БНЦ, их преимущества и недостатки

Способ биосинтеза	Описание	Преимущества	Недостатки	Литература
Статический	<ul style="list-style-type: none"> – все компоненты среды смешиваются; – биосинтез происходит в лотке; – биосинтез происходит на границе раздела воздух-жидкость 	<ul style="list-style-type: none"> – простой метод, не требует сложного оборудования; – БНЦ образуется в виде пленки, иногда в виде сетчатой суспензии 	<ul style="list-style-type: none"> – трудоёмкость; – условия биосинтеза нельзя контролировать; – не применимо для крупномасштабного производства 	<p>Adebayo-Tayo, 2017; Budhiono, 1999; Huang, 2016; Keshk, 2006; Mikkelsen, 2009</p>
Статический с дискретной периодической загрузкой	<p>периодически на поверхность гель-плёнки подаются новые порции свежей питательной среды</p>	<ul style="list-style-type: none"> - простой метод; - повышение производительности по сравнению со стандартным статическим методом; – БНЦ образуется в виде пленки, иногда в виде сетчатой суспензии 	<ul style="list-style-type: none"> – условия биосинтеза нельзя контролировать; – не применимо для крупномасштабного производства 	<p>Dubey, 2018</p>
Технология бесклеточного экстракта	<p>механический / термический / ферментативный лизис клеток высвобождает все необходимые ферменты, необходимые для биосинтеза БНЦ, непосредственно в среду</p>	<ul style="list-style-type: none"> – простой метод; – может применяться для крупномасштабного производства в короткие сроки; - повышение производительности по сравнению со стандартным статическим методом 	<ul style="list-style-type: none"> – условия биосинтеза нельзя контролировать 	<p>Ullah, 2015; Ullah, 2016; Ullah, 2017</p>
С перемешиванием	<p>встряхивание со скоростью около 90–100 об/мин</p>	<ul style="list-style-type: none"> - может применяться для крупномасштабного производства; – преодоление многих ограничений в статической культуре, включая производственные площади, управляемость и масштабирование; – встряхивание позволяет клеткам расти быстрее 	<ul style="list-style-type: none"> – БНЦ представляет собой сферические частицы неправильной формы; - мутации культуры снижение или потеря способности к биосинтезу БНЦ 	<p>Watanabe, 1998; Czaja, 2004-2007; Yan, 2008; Hu, 2013; Tanskul, 2013; Esa, 2014</p>

Биореакторы:		– высокая производительность; – снижение трудозатрат; – масштабируемость	– ограничения непрерывной культуры	Krystynowicz, 2002; Kim, 2007; Pa'e, 2009
роторно-дисковый	диски то находятся в питательной среде, то на воздухе	– однородная структура БНЦ в виде ступок клеобразной массы	– энергозатратность	Seráfica, 2002; Kuype-Kinsey, 2003; Lin, 2014; Khairul, 2015
с мешалкой	реактор снабжен мешалкой		– энергозатратность	Wang, 2019
эрлифтный	эрлифтная аэрация	– маломощный двигатель		Chao, 1997; Chao, 2000; Chao, 2001
эрлифтный с барботажной колонной	эрлифтная аэрация, совмещенная с барботажем	– маломощный двигатель		Choi, 2009; Song, 2009
с подвижным слоем	оборудование для производства уксуса	– высокая концентрация кислорода, – высокая концентрация клеток, – низкое напряжение сдвига		Lu, 2014
пленочный реактор с иммобилизацией клеток	иммобилизация уксуснокислых бактерий на носителе	– высокая концентрация клеток	затраты на иммобилизацию	Cheng K.-C., 2009; Cheng K.-C., 2011

1.7.6 Примеры коммерциализации технологии бактериальной наноцеллюлозы

Донини и соавторы подсчитали, что производство БНЦ может достичь эффективности производства, сравнимой с ростом растительной целлюлозы, при достижении выхода БНЦ 15 г / л за 50 часов [Donini, 2010]. Впрочем, не совсем понятно, для какой климатической зоны приведен данный расчёт, так как в рост биомассы в Бразилии и в Сибири отличается в несколько раз. Производственные площади, необходимые для получения БНЦ, намного меньше, чем площади, необходимые для роста растений. Очистка БНЦ является простой и экологичной по сравнению с выделением чистой растительной целлюлозы, требующей освобождения от гемицеллюлоз, лигнина, экстрактивных и минеральных веществ. Если для биосинтеза БНЦ использовать агропромышленные отходы, то экологическая обстановка будет дополнительно улучшаться, а себестоимость производства снижаться [Hussain, 2019]. Таким образом, БНЦ всё чаще рассматривается как конкурентоспособная альтернатива целлюлозе растительного происхождения в определенных областях применения [Zhong, 2020; Mensah, 2022].

Согласно отчету ResearchMoz, рынок БНЦ в США в 2016 г составил 207,36 млн. долларов, ожидается, что в 2022 г он составит 497,76 млн долларов и превысит 700 млн долларов в 2026 году с такими производителями как Celluforce, US Forest Service, Innventia AB, Borregaard, University of Maine, Nippon, American Process [ResearchMoz and QY Research, 2017].

Ната де коко до сих пор является основным коммерческим продуктом из БНЦ, его получают статическим способом, основным сырьём является кокосовая вода. На рынке он продается в виде плит и кубиков в зависимости от требований заказчика. Цена на ната-де-коко варьирует в диапазоне 200–1000 долларов США за тонну [Ul-Islam, 2020].

Технико-экономический анализ биосинтеза БНЦ в промышленных масштабах был выполнен Доуродо с соавторами с использованием программного обеспечения Super-Pro Designer [Dourado, 2016a]. При создании производства мощностью 504 тонн влажной БНЦ в год, капитальные вложения составят 13 миллионов долларов США, при этом себестоимость оценивается в 7,4 млн долларов США / год, а чистая прибыль - 3,3 млн долларов США / год.

В настоящее время коммерциализированы статический способ получения БНЦ и способ с перемешиванием.

В Китае промышленное производство БНЦ было основано Чжун [Zhong, 1996], компания Hainan Yeguo Foods Co. Ltd, в настоящее время это ведущий мировой производитель. Производственный штамм *K. xylinus* 323 был выделен из ферментированной кокосовой воды, в настоящее время хранится в Китайской государственной коллекции микробиологических культур (China General Microbiological Culture Collection Center), N 1186 [Zhong, 2009]. Для получения БНЦ применяется статический способ. Кроме кокосовой воды в качестве сырья используются кукурузный экстракт, отходы спиртового производства, кожура ананаса, сок цитрусовых и яблочный сок.

Из-за высокой влажности БНЦ ~ 99 мас.% стоимость её транспортировки и хранения очень высока [Yamanaka, 1989]. Чжун разработала метод двухступенчатого отжима с последующей обработкой погружением в органическую кислоту [Zhong, 2008a]. Это предотвращает разрушение наноструктуры БНЦ и обеспечивает хорошую регидратационную способность (скорость регидратации до 95%). Hainan Yeguo Foods Co. Ltd выпускает ната-де-коко и маски для лица.

Способ получения БНЦ с перемешиванием также успешно коммерциализован. Получаемая БНЦ используется в качестве загустителя и / или суспендирующего агента [Swazey, 2014]. Глобальная компания CPKelco Inc. занимается производством гидроколлоидов природного происхождения, в том числе БНЦ. Компания выпускает продукт влажностью 80-90 %, для

предотвращения роста плесневых грибов в продукт добавляется сорбиновая кислота [Swazey, 2013]. А также компания выпускает сухие порошки с торговыми названиями AxCel®PX, AxCel®CG-PX, AxCel®PG, Cellulon™PX и серия под названием “К” [Swazey, 2010]. Порошки состоят из БНЦ или её смеси с ксантановой камедью, пектином, каррагинаном, поверхностно-активными веществами. Эти соагенты позволяют достигать лучшего диспергирования при регидратации, но снижают стабильность суспензии [Swazey, 2014]. Назначение порошков – гидроколлоиды для суспендирования активных веществ, декоративных частиц или ароматизированных наночастиц. Кроме того, получаемая БНЦ используется в моющих средствах (для инкапсулирования ферментов и ароматизаторов), средствах личной гигиены [CPKelco Inc, 2020].

Японская компания San-Ei Gen FFI, Inc. также производит БНЦ способом с перемешиванием, в жидкой форме, торговое название Sun Artist®, это суспендирующий агент для пищевой промышленности [San-Ei Gen, 2020].

Японская компания Kusano Sakko Inc. также производит БНЦ способом с перемешиванием, торговая марка Fibnano. Эта компания производит сахар из сахарной свёклы и сахарного тростника, а из мелассы производит БНЦ. С 2012 г. компания приложила огромные усилия к производству и разработке приложений БНЦ, это медицинские изделия, продукты питания, средства личной гигиены, моющие средства, специальная бумага и добавка в состав полиметилметакрилатной смолы [Kusano Sakko Inc, 2020]. Под торговой маркой Fibnano созданы также композиты БНЦ с карбоксиметилцеллюлозой, гидроксипропил-целлюлозой и гидроксипропил-целлюлозой [Tajima, 2017].

Примеры успешной коммерциализации БНЦ медицинского назначения приведены в табл. 1.9. Раневые покрытия из БНЦ используются как в виде сухих плёнок, так и в виде гель-плёнок, выпускаются импланты сердечных сосудов для коронарного шунтирования, материалы для репарции сухожилий [Mensah, 2022; Zhong, 2020].

Таблица 1.9 – Коммерческие продукты из бактериальной целлюлозы медицинского назначения [[Abeer, 2014](#); [Zhong, 2020](#); [Mensah, 2022](#)]

Коммерческий продукт	Клиническая практика	Форма использования	Производитель
Bioprocess®	ожоги	искусственная кожа	Biofill Produtos Biotechnologicos, São Paulo, Brazil
Gengiflex®	пародонтит	не рассасывающаяся целлюлозная мембрана	Biofill Produtos Biotechnologicos, São Paulo, Brazil
Dermafill®	ожоги	раневое покрытие	Fibrocel Produtos Biotechnologicos Ltd.a, Ibiopora, PR, Brazil
Membracell®	язвы, ожоги, рваные раны	искусственная кожа	Vuelo Pharma, Curitiba, PR, Brazil
Bionext®	язвы, ожоги, рваные раны	раневое покрытие	Bionext Produtos Biotechnologicos, Pacaembu, São Paulo, Brazil
BioFill®	ожоги	раневое покрытие	Robin goad, Milwaukee, WI, USA
Cellulon®	медицинские приложения, в том числе нетканые конструкции	связующее	CP Kelco, Atlanta, GA, USA
MTA protective tissue	уход за травмами и ранами	биосовместимый имплантат	Xylos corporation, Langhorne, PA, USA
Securian®	репарация сухожилий	матрица для укрепления тканей	Xylos corporation, Langhorne, PA, USA
Xcell®	венозные язвы	раневое покрытие	XCELL BIOLOGIX, Kennesaw, GA, USA
Nanoderm™ Nanoderm™ Ag	язвы, ожоги, рваные раны	раневое покрытие (сухая форма)	Axcelon Dermacare Inc, North York, Ontario, Canada
Basyc®	операция коронарного шунтирования	имплантаты сосудов	Jenpolymer materials Ltd. & co., Jena, Germany
Suprasorb®X	язвы, ожоги, рваные раны	раневое покрытие (гидрогелевая форма)	Lohmann and Rauscher International GmbH & Co., Германия
Suprasorb®X + PHMB	язвы, ожоги, рваные раны инфицированные	антибактериальное раневое покрытие	Lohmann and Rauscher International GmbH & Co., Германия
CelMat® MG & CelM®(R) MG	защита рабочих от возможных ожогов	защитные повязки	Government of Poland, Warsaw, Poland

Nanollose Ltd., австралийская технологическая компания, является пионером в области получения текстиля из БНЦ [Nanollose Ltd, 2020]. Совместно с нидонезийской компанией Supra Natami Utama в 2018 г было разработано превращение БНЦ в вискозное волокно NullarborTM. БНЦ получают путем ферментации кокосовой воды [Zhong, 2020].

1.8 Обоснование выбора направления исследований

Обоснование выбора сырья

Для выбора сырья использованы следующие критерии:

- (1) распространённость;
- (2) доступность для России;
- (3) промышленная значимость (например, не подойдут борщевик или крапива, так как, несмотря на широкую распространённость, эти виды сырья промышленно не возделываются);
- (4) высокое содержание в сырье целлюлозы;
- (5) технологичность переработки. Во-первых, поскольку сырьё выбирается для последующей биотехнологической трансформации, оно должно легко поддаваться предобработке и гидролизу до сбраживаемых сахаров. Этому критерию соответствует целлюлозосодержащее сырьё, выращенное в течение одного вегетативного года, но это не хлопок и не лубяные культуры. Во-вторых, подготовка сырья к переработке должна быть лёгкой: желательно, чтобы оно не требовало измельчения, чрезвычайно плохо, если требуется его очистка от песка и земли, как, например, при переработке соломы;
- (5) низкая стоимость;
- (6) устойчивость при хранении;
- (7) стандартность по химическому составу. Сложно выполнимое требование для растительного сырья, но к этому надо стремиться, соблюдая сроки сбора сырья. Не следует перемешивать несколько видов сырья.

С учётом приведенных критериев выбрано два вида сырья: массовый отход сельского хозяйства шелуха овса и биомасса энергетической злаковой культуры мискантус сорта Сорановский, районированного для Сибири.

Шелуха овса

Мировой урожай овса посевного составляет порядка 22 млн т в год [United...2021], причем Россия занимает первое место в мире по валовому сбору овса (4,72 млн т в 2018 году [Бюллетени...2020]).

Шелуха (лузга) овса – отходы, остающиеся после извлечения зерновки из колоска. Это сырьё, откалиброванное природой по размерам и структуре. Колосковые чешуи крупные, на спинке закруглённые, без кия, с 7-11 жилками, по краю плёнчатые. Нижняя цветочная чешуя на верхушке более или менее надрезана, двузубчатая или двуостная, на спинке с крепкой остью, реже без ости. Однородны по составу, имеют размер частиц шириной до 5,0 мм, длиной до 13,0 мм, толщиной до 0,2 мм. Не требуют измельчения.

В силу того, что овёс – плёнчатая культура, шелухи овса остаётся очень много – 28-30 % от массы зерна. Она имеет следующий химический состав: целлюлозы (35-45 %), гемицеллюлоз (32-35 %), кислотонерастворимого лигнина (17-20 %) и отличается высоким содержанием золы (4,5-5,2 %). Зола шелухи овса легкоплавкая, что затрудняет её использование в качестве топлива в виде пеллет [Земнухова, 2009].

Биологическая функция шелухи овса состоит в защите зерновки от механических, физических, химических и биологических факторов внешней среды. Но это недолговременная защита. При естественном выбросе семян защита требуется в течение зимы, весной семена прорастут, а шелуха почти полностью перегниёт в течение лета. Вот почему доля целлюлозы в сырьё примерно равна доле гемицеллюлоз, а лигнина сравнительно немного. Можно предположить, что такое сырьё относительно легко будет поддаваться переработке биотехнологическими методами.

На зерноперерабатывающих предприятиях шелуха овса накапливается в промышленных масштабах. Затраты на сбор, очистку и технологическую переработку овса в крупу, хлопья, слайсы, печенье и т.д. включены в себестоимость продукции пищевых предприятий, поэтому себестоимость шелухи овса можно считать нулевой.

Из-за высокого содержания гемицеллюлоз ранее шелуха овса рассматривалась как гемицеллюлозное сырье и источник получения фурфурола и ксилита [Холькин, 1983; Холькин, 1989], недавно эти работы были актуализированы [Tamanini, 2004; Zwer 2017, Kohli 2019]. В небольших объёмах шелуха овса использовалась как корм для животных [Thompson, 2000] и описано её воздействие на зубы животных для остановки развития кариеса [Kulp 2000]. В последнее время шелуха овса рассматривается в качестве сырья для глубокой химической и биотехнологической трансформации с использованием всех компонентов.

Из шелухи овса получены топливные пеллеты [Abedi, 2017], а также исследована их паровая газификация в синтез-газ [Abedi, 2019], исследован терокаталитический риформинг как метод трансформации шелухи овса в высококачественные био-масла, биоуголь и синтез-газ [Santos, 2020]. Шелуха овса была использована как источник целлюлозы, из которой затем были получены нановолокна [Paschoala, 2015; Valdebenito, 2017]; нанокристаллы, предназначенные для использования в качестве осушителей в упакованных пищевых продуктах [Oliveira, 2018]; нитраты целлюлозы [Sakovich, 2019]. Активно ведутся исследования по использованию шелухи овса в качестве сорбента широкого спектра веществ после её химической обработки кислотами [Banerjee, 2016; Huang, 2019; Свергузова, 2018] или после получения из неё активированного угля [Chuang, 2005; Ferraz, 2020].

Исследованы предобработка шелухи овса разбавленными кислотами [Demirel, 2018] и сочетание обработки разбавленной кислотой и микроволновой обработки [Germeç, 2017], органосольвентным способом с использованием этанола [Chopda, 2020], полученные гидролизаты

позиционируются для дальнейшей биотехнологической переработки. Гидролизаты из шелухи овса получены и путём ферментативного гидролиза [Kashcheyeva, 2019]; описано получение этанола [Lawford, 2001; Chaud, 2012], этанола и ксилита одновременно [Cortivo, 2018].

Мискантус

Мискантус (веерник) – многолетнее травянистое растение семейства злаковых (мятликовых). Представляет собой растение высотой до 400,0 см, стебли прямостоячие, листья простые пластинчатой формы, верхушка острая, основание клиновидное, соцветия в виде метелок. Род *Miscanthus Anderss.* представлен 14–20 видами [Iqbal, 2014; Dorogina, 2018]. Биологическими особенностями мискантуса являются высокое значение нарастания надземной вегетативной массы и способность произрастания в различных природно-климатических поясах. В технологических переработках используются в основном три вида мискантуса: *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus*, *Miscanthus giganteus*, продуктивность культур возрастает в указанной последовательности, но и возрастает требовательность к теплу и количеству солнечных дней в период вегетации. В данной работе в качестве сырья использован *M. sacchariflorus* сорта Сорановский, выведенный в Институте цитологии и генетики СО РАН, выращенный в условиях резко континентального климата Западной Сибири: средняя температура зимой составляет - 15,1 °С, летом +17,7 °С, среднегодовая норма осадков 459 мм.

Это техническая многолетняя быстрорастущая (другими словами, энергетическая) культура. С точки зрения технологии возделывания мискантус отличается способностью при однократной посадке давать стабильные урожаи в течение 15-20 лет, при этом требуются минимальные агротехнические затраты, так как культура способна расти на бедных почвах и при этом давать высокие урожаи биомассы (15-25 т/га). В настоящее время сбор мискантуса полностью механизирован, при сборе мискантус

скручивается в рулоны (валки) [Капустянчик, 2020; Капустянчик, 2021 а; Капустянчик, 2021 б; Якименко, 2021].

Особенности состава жировосковой фракции мискантуса определяют его микробиологическую стабильность при хранении. Химический состав мискантуса довольно сильно отличается в зависимости от его биологического вида, природно-климатической зоны и условий произрастания, но при этом от других трав (как однолетних, так и многолетних) его отличает высокое содержание целлюлозы – 45-50 %, что предопределяет успешность его переработки по биотехнологическому маршруту.

Совокупность данных признаков позволили мискантусу занять устойчивое лидирующее положение среди разнообразного целлюлозосодержащего сырья, применяемого, во-первых, для получения трех основных продуктов: целлюлозы, бумаги и биоэтанола второго поколения и, во-вторых, для получения широкого круга продуктов химического и биотехнологического синтеза [Brosse, 2010; Wahid, 2015; Yang, 2015; Luo, 2016; Xue, 2016; Baldini, 2017; Boakye-Boaten, 2017; Dubis, 2017; Cheng S., 2018; Zhang, 2018; Kang, 2019; Yang, 2019; Barbash, 2020; Sun, 2020; Murnen, 2007;].

При размещении небольших производств в непосредственной близости от плантаций мискантуса удаётся значительно удешевить производство. Значительные расходы при транспортировке целлюлозосодержащего сырья связаны с его с низкой плотностью [Lin, 2016; Zhang, 2018].

В РФ исследованиями переработки шелухи овса и мискантуса по химическому и биотехнологическому маршрутам [Макарова, 2013; Makarova, 2013; Макарова, 2015; Makarova, 2017; Макарова, 2017; Sakovich, 2018; Kashcheyeva, 2019] занимается научная школа ИПХЭТ СО РАН под руководством академика РАН Г.В. Саковича. Двухстадийная обработка сырья сначала азотной кислотой, а затем гидроксидом натрия позволяет получить из обоих видов сырья химически чистую целлюлозу, пригодную

для дальнейшей химической модификации с получением карбоксиметилцеллюлозы, метилцеллюлозы, нитратов целлюлозы (в том числе коллоксилина и пироксилина) [Будаева, 2013; Гисматулина, 2014; Gismatulina, 2015; Budaeva, 2016; Гисматулина, 2016; Gismatulina, 2017; Sakovich, 2018; Gismatulina, 2018; Gismatulina, 2019; Korchagina, 2019; Korchagina, 2020; Корчагина, 2021; Корчагина, 2022].

Обоснование выбора способа предобработки целлюлозосодержащего сырья

Целью работы является разработка промышленно значимой технологии, полный цикл которой после лабораторных испытаний будет масштабирован в условиях опытно-промышленного производства. Научные исследования, ориентированные на последующее промышленное применение, наиболее востребованы [Padella, 2019]. Поэтому выбраны щелочная и кислотная предобработки, оба эти метода наиболее жизнеспособны в промышленных условиях благодаря их сильному эффекту предварительной обработки и относительно простой схеме реализации процесса [Kim, 2016; Zabed, 2016].

Главная особенность щелочной предварительной обработки заключается в том, что она избирательно удаляет лигнин без разложения углеводов, поэтому далее будем её называть щелочной делигнификацией. Основные реакции во время щелочной делигнификации включают разложение лигнина и гемицеллюлоз и деэтерификацию (омыление) межмолекулярных сложноэфирных связей, которыми прошиты гемицеллюлозы и лигнин [Hu, 2012; Kim, 2013]. В результате омыления происходит расщепление этих связей и воздействие щелочи на микрофибриллы целлюлозы [Karimi, 2013]. Степень полимеризации целлюлозы снижается, одновременно происходит набухание целлюлозы, что приводит к увеличению её внутренней поверхности и делает целлюлозу более доступной для действия ферментов [Hu, 2012]. Реакции протекают в

мягких условиях и приводят к увеличению пористости и площади поверхности, тем самым усиливая ферментативный гидролиз [Kim, 2016]. По сравнению с кислотными предобработками в ходе щелочной делигнификации образуется гораздо меньше ингибирующих ферментативный гидролиз примесей, таких как фурфурол, оксиметилфурфурол, фенолы, различные кислоты. Еще одним преимуществом щелочной делигнификации является возможность многократного использования отработанного раствора [Kim, 2016; Hu, 2012; Chiaramonti, 2011; Sun, 2016; Karimi, 2013; Kang, 2019].

Ряд авторов отмечает большую эффективность щелочной делигнификации для травянистого сырья, чем для древесного, особо плохо поддаются щелочной делигнификации хвойные породы деревьев. Это объясняется особенностями строения лигнинов в целлюлозосодержащем сырье. [Kim, 2016; Bhatia, 2020]. Поэтому выбор щелочной делигнификации для предобработки шелухи овса и мискантуса представляется обоснованным.

Гидроксид натрия является одним из самых сильных щелочных катализаторов и по сравнению с другими щелочными предобработками, приводит к наибольшему повышению степени ферментативного гидролиза и технологически проще осуществляется, благодаря чему применяется шире всего. В этом смысле предобработку гидроксидом натрия можно считать классической [Hu, 2012; Kim, 2013; Sun, 2016; Karimi, 2013; Karimi, 2016; Chiaramonti, 2011; Lopes, 2016; Zheng, 2009; Mosier, 2005]. Недостатком гидроксида натрия является его частичная трансформация в соль и осаждение на целлюлозосодержащий материал, кроме того, готовый продукт очень сложно отмыть от остатков щелочи [Mosier, 2005; Hu, 2012; Agrawal, 2015; Zayed, 2016].

Основной кислотой, используемой для предобработки целлюлозосодержащего сырья является серная. Основной функцией обработки разбавленной кислотой является гидролиз гемицеллюлоз и разрушение структуры лигнина, при этом у предобработанной биомассы

повышается доступность для фермента к целлюлозе. Гемицеллюлоза гидролизуется до ферментативных сахаров в процессе предобработки, а при более жестких условиях основной сахар – ксилоза преобразуется в фурфурол, муравьиную кислоту, уксусную кислоту и уроновую кислоту. Это не только снижает выход сахаров гемицеллюлоз, но и приводит к нежелательному образованию ингибиторов. Если условия предобработки являются слишком жесткими, то начинается гидролиз целлюлозы, этот процесс катализируется кислотой и ускоряется при повышении температуры. Сначала наблюдается гидролиз аморфной части целлюлозы, затем кристаллической, вот почему кристалличность возрастает в процессе предобработки, а степень полимеризации снижается. Кислотная обработка не приводит к ощутимой делигнификации, а иногда наблюдается возрастание содержания нерастворимого в кислоте лигнина в процессе предобработки. Это является результатом повторной полимеризации продуктов разрушения полисахаридов (оксиметилфурфурола и фурфурола) и/или полимеризации лигнином с образованием лигниноподобного материала под названием «псевдолигнин». Таким образом, обработка разбавленной кислотой, проведенная в условиях высокой жесткости, приведет к образованию ингибирующих продуктов разрушения сахаров и к образованию псевдолигнина. Увеличение степени кристалличности целлюлозы и образование псевдолигнина могут привести к ингибированию ферментативного гидролиза. Поэтому режимы обработки разбавленной кислотой должны быть тщательно отработаны для каждого вида сырья.

Преимуществами предобработки разбавленной кислотой являются: высокая скорость реакции, удаление гемицеллюлоз, увеличение доступной поверхности для действия ферментов и высокий выход сахаров при ферментативном разрушении целлюлозы, изменения в структуре лигнина. Недостатками метода являются: удаление небольшого количества лигнина или его возрастание, возможное ингибирование ферментов, необходимость нейтрализации кислоты и необходимость утилизации ингибирующих солей,

кроме того, метод дорогой из-за высокой стоимости кислоты и необходимости использования специализированного нержавеющей оборудования [Hu, 2012; Sun, 2016; Karimi, 2013; Lopes, 2016].

В данной работе будет впервые использован авторский метод предобработки разбавленной азотной кислотой для последующего ферментативного гидролиза полученного субстрата. Технологической особенностью способа является проведение процесса при атмосферном давлении, в отличие от большинства описанных способов обработки разбавленными кислотами, в которых используется избыточное давление от 0,1 МПа. Работа при атмосферном давлении обеспечивает более безопасные и экологичные условия производства и снижает образование продуктов распада гемицеллюлоз и целлюлозы до ингибирующих веществ. Обязательным требованием для обеспечения требований промышленной безопасности является использование герметичного оборудования. По сравнению с классической обработкой разбавленной кислотой под давлением, при выборе атмосферного давления рабочая температура снижается до 94-96 °С, при этом ожидается увеличение продолжительности процесса предобработки.

Удивительные особенности азотной кислоты были подробно изучены и описаны в 1966 г. Никитиным Николаем Игнатьевичем [Никитин, 1966]. При температуре кипения разбавленного раствора азотной кислоты на первом этапе происходит не только разрыв химических связей между целлюлозой, гемицеллюлозами и лигнином (общее действие для всех разбавленных кислот), но и гидролиз гемицеллюлоз с образованием растворимых ксилозы и ее предшественников. На втором этапе происходит частичный гидролиз целлюлозы и превращение сахаров в простые органические кислоты (муравьиную, уксусную и т.д.) и углекислый газ, кроме того происходит окислительное нитрование лигнина. Никитин указал на перспективность азотнокислой варки для однолетнего целлюлозосодержащего сырья. В работе [Shishonok, 1997] в качестве сырья использована солома озимой ржи, при

этом показана возможность получения радиоактивно чистых целлюлозы и нитролигнина из загрязнённого радионуклидами сырья.

С развитием технологии биоэтанола, азотная кислота стала применяться не только для выделения целлюлозы, но и для химического гидролиза сырья. В работе [Rodríguez-Chong, 2004] гидролизу разбавленным раствором азотной кислоты подвергнута багасса, в работе [Marzialetti, 2008] – сосна. В работе [Yang, 2015] актуализирован двухстадийный способ, запатентованный в 1993 [Brink, 1993; Brink, 1996], а в качестве сырья использован *Miscanthus giganteus*.

Перспективным направлением является предобработка сырья разбавленным раствором азотной кислоты для последующего осахаривания полученного субстрата с помощью ферментных препаратов. Параллельно с нашими работами, в которых в качестве сырья использовались мискантус и шелуха овса, в работе [Fariás-Sánchez, 2017] использовались сосновые опилки (*Pinus pseudostrobus* L.), в работе [Kusmiyati, 2019] – отходы ствола пальмы. Параллельность и независимость проведения исследований доказывает адекватность и воспроизводимость этого способа на разных видах сырья, что является предпосылкой его успешного внедрения в промышленности.

Обоснование выбора ферментных препаратов

Выбраны промышленно выпускаемые, доступные на российском рынке комплексные ферментные препараты. Гетерогенная природа субстратов и гетерогенная природа процесса ферментативного гидролиза требуют синергетического действия смеси функционально различных целлюлолитических, гемицеллюлолитических и вспомогательных ферментов [Hu, 2012, Agrawal 2018, Caro 2019]. Поэтому в данной работе применены мультиэнзимные композиции из ферментных препаратов целлюлазно-глюканазно-ксилазназного действия: «Целлолюкс-А» (Россия), «Ультрафло Коре» (Дания), «Брюзайм ВГХ» (Польша).

За основу технологии ферментативного гидролиза положены работы Кащеевой (Макаровой) Е.И., выполненные в ИПХЭТ СО РАН [Макарова, 2013; Макарова, 2015; Макарова, 2017; Kashcheyeva, 2019].

Выбор конфигурации стадий осахаривания и сбраживания при получении биоэтанола

Наиболее часто применяемые конфигурации проведения осахаривания и сбраживания: традиционное раздельное осахаривание и сбраживание (separate hydrolysis and fermentation, SHF) и совмещенное осахаривание и сбраживание (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) [Ramachandran 1990, Olofsson 2008; Singhania, 2015; Kadhum 2019]. В процессе SSF образующаяся в результате ферментативного гидролиза глюкоза непрерывно превращается микроорганизмами в этанол, тем самым равновесие реакции ферментативного гидролиза смещается в сторону образования моносахаридов. SSF превосходит SHF также за счет меньшей продолжительности процесса, сниженного риска контаминации, меньшего потребления энергии и капиталозатрат, большим выходом этанола. Однако SHF может быть выгоднее из-за оптимальной температуры проведения ферментативного гидролиза (около 50 °C) [Huang, 2018]. В данной работе выбрана альтернативная конфигурация – совмещенное осахаривание и сбраживание с отсроченной инокуляцией (simultaneous saccharification and fermentation with delayed inoculation, dSSF) [Paulová 2014, Liu 2015], называемая также полуодновременное осахаривание и сбраживание (semi-simultaneous saccharification and fermentation, s-SSF) [Huang, 2018], предгидролиз с последующим осахариванием и сбраживанием (pre-hydrolysis and the simultaneous saccharification and fermentation (p-SSF) [Sewsynker-Sukai 2018, Dimos 2019].

Такой процесс проводится в одном сосуде, где субстрат подвергается предварительному осахариванию при оптимальной для целлюлозолитических ферментов температуре с последующим сбраживанием

сула при оптимальной для сбраживания температуре. dSSF позволяет избежать ограничений последовательного и одновременного проведения биокаталитических стадий: для SHF – это длительность процесса и ингибирование ферментов глюкозой на стадии гидролиза, для SSF – дефицит глюкозы в начале процесса [Paulová, 2014]. Таким образом, процесс имеет преимущества как раздельного, так и совмещенного процессов.

В технологии получения биоэтанола из практически любого вида целлюлозосодержащего проблемой является низкая концентрация этанола в бражке, что приводит к низкой рентабельности на стадиях дистилляции и ректификации. Низкая концентрация этанола в бражке объясняется низкой концентрацией субстрата при гидролизе, а повысить концентрацию технически очень трудно, так как целлюлозосодержащие субстраты имеют низкую плотность. То есть реактор полностью загружается, но при этом концентрация субстрата низкая. Кроме того, имеется сложность химической природы: при увеличении начальной концентрации субстрата снижается эффективность биоконверсии целлюлозы при осахаривании, а целлюлазы ингибируются при увеличении концентрации моносахаридов. [Agrawal, 2018]. Имеется сложность физической природы: при повышении начальной концентрации субстрата затрудняется перемешивание реакционной массы. Для решения данной проблемы предложен метод осахаривания с подпиткой, когда субстрат загружается через равные промежутки времени, что обеспечивает сохранение равномерности перемешивания и повышает выход сахаров [Kadhun, 2017; da Silva Martins, 2015]. Высокая концентрация сахаров имеет решающее значение в производстве этанола, и она зависит от типа субстрата, эффективности фермента и его дозировки, взаимодействия ферментов и биомассы. Высокая концентрация субстрата способствует увеличению выхода этанола, что приводит к повышению рентабельности процесса, но для осуществления такого процесса необходимы эффективные ферментные препараты [Sotaniemi, 2016; Kadhun, 2019].

Обоснование выбора продуцентов

Продуценты биоэтанола

Микроорганизм является решающим фактором для превращения в этанол образующихся гексоз и пентоз. В качестве продуцента биоэтанола были использованы негенномодифицированные промышленные штаммы спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Негенномодифицированные дрожжи, в отличие от генномодифицированных организмов, отлично зарекомендовали себя в условиях реального производства. Эти дрожжи способны сбраживать гексозные сахара (глюкоза, манноза, галактоза), обладают высокой толерантностью к ингибиторам и высокому осмотическому давлению, имеют высокую удельную скорость роста клеточной массы, дают высокий выход этанола, что крайне важно для реального производства [Almeida 2007, Zabed 2016; Sanchez, 2020]. Их недостатками являются отсутствие способности утилизировать пентозы и относительно невысокий температурный оптимум – до 30 °С.

Продуценты бактериальной целлюлозы

Низкая стабильность индивидуальных штаммов в производственных условиях (многократно зарегистрированы спонтанное снижение или полная потеря целлюлозосинтезирующей способности продуцентов) побуждает исследователей искать новые продуценты. Один путь – стабилизация работы штаммов методами генной инженерии, другой – использование консорциумов. *Medusomyces gisevii* является природным крайне консервативным и в то же время крайне устойчивым консорциумом. Консорциумы обладают высоким адаптивным потенциалом, а за счёт координированного потребления субстрата и образования метаболитов повышается устойчивость к питательным средам переменного состава и повышается выход целевого продукта (БНЦ), что особо важно в условиях реального производства [Marsh, 2014; Gama, 2016]. С технологической точки зрения крайне интересным является возможность использования

нестерильных питательных сред для культивирования *Medusomyces gisevii* [Marsh, 2014; Chakravorty, 2016]. Однако, эта возможность была только описана теоретически, но не исследована на практике.

Краткие итоги литературного обзора

Трансформация целлюлозосодержащего сырья в востребованные продукты химического и биотехнологического синтеза является крайне привлекательной с точки зрения переработки дешевого, воспроизводимого, крупнотоннажного, устойчивого сырья, но экономические показатели такой трансформации малопривлекательны для капиталистического общества. Единой технологической схемы переработки целлюлозосодержащего сырья не выработано. Описано несколько интегрированных технологических схем, в которых в товарные продукты превращены все компоненты целлюлозосодержащего сырья, именно это позволило успешно реализовать на практике ряд производств по переработке целлюлозосодержащего сырья.

Для предварительной обработки сырья будет использован авторский метод – обработка разбавленным раствором азотной кислоты при атмосферном давлении и температуре кипения раствора. Далее будет проведен ферментативный гидролиз и полученный раствор сахаров будет превращен с помощью традиционных, негенномодифицированных культур микроорганизмов в классический биотехнологический продукт – биоэтанол и новый продукт с высокой добавленной стоимостью – бактериальную наноцеллюлозу – уникальный полимер с выдающимися свойствами.

Кроме того, будут исследованы возможности технологической химической и биотехнологической переработки отходов на каждой технологической стадии.

2 МЕТОДОЛОГИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Организация выполнения работы

Теоретические и экспериментальные исследования выполнены с 2010 по 2022 годы в лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН).

Отдельные этапы работ выполнены в рамках проектов, представленных ниже (с выделением роли диссертанта).

1. Проект № 5 Программы Президиума РАН № 3 «Химическое обогащение возобновляемого «концентрированного» целлюлозосодержащего сырья» – 2009-2011 гг. – исполнитель.

2. Интеграционный проект СО РАН № 73 Научные основы технологий выращивания и переработки нового вида целлюлозосодержащего сырья – Мискантуса китайского – 2009-2011 гг. – исполнитель.

3. РАН, Проект V.40.2.1 «Разработка физико-химических основ технологии получения полупродуктов и биотоплив из недревесного растительного сырья» (Программы V.40.2 «Фундаментальные исследования синтеза высокоэнергетических соединений с большим содержанием азота и композиций на их основе, полупродуктов и биотоплив из растительного сырья. Разработка основ технологии их получения и переработки»). № Государственной регистрации темы 01201051012. – 2010-2012 гг. – исполнитель

4. РАН, проект № 5 Программы президиума № 3 Химическое обогащение возобновляемого «концентрированного» целлюлозосодержащего сырья». № Государственной регистрации темы 01201257826– 2012 г. – исполнитель.

5. РАН, совместный интеграционный проект № 11 фундаментальных исследований «Химическая, механохимическая и ферментативная деструкция целлю-

лозосодержащего сырья для получения ценных продуктов». № Государственной регистрации 01201257825. – 2012-2014 гг. – ответственный исполнитель.

6. ФАНО, V.47.1.2 Фундаментальные исследования химических и биотехнологических процессов получения новых материалов и компонентов топлив из недревесного сырья (программы V.47.1 Фундаментальные проблемы химических и биотехнологических процессов получения новых материалов, реагентов и топлив из возобновляемого сырья. Биоэнергетика). № Государственной регистрации темы 01201358390 – 2013-2016. – заместитель руководителя.

7. РАН, проект № 5 Программы президиума № 3 «Химическое обогащение возобновляемого «концентрированного» целлюлозосодержащего сырья в различных средах в реакторах под давлением». № Государственной регистрации темы проекта 01201358396, 2013-2014. – ответственный исполнитель.

8. СО РАН, Проект «Технологическое оборудование для комплексной переработки растительного сырья в целлюлозосодержащие продукты и исходные компоненты для химического синтеза и биотопливо», № Государственной регистрации АААА-Б15-215120170058-4; 2013-2015 гг. – ответственный исполнитель.

9. РФФИ, № 16-48-220983 p_сибирь_a «Создание установки получения серии востребованных продуктов из недревесного растительного сырья», № Государственной регистрации АААА-А16-116041110233-1, 2016. – ответственный исполнитель.

10. ФАНО, Минобрнауки, базовый проект Фундаментальные технологические основы биорефайнинга возобновляемого недревесного сырья (программы V.47.1 Фундаментальные проблемы химических и биотехнологических процессов получения новых материалов, реагентов и топлив из возобновляемого сырья. Биоэнергетика), № Государственной регистрации АААА-А17-117011910006-5, 2017-2020 гг. – заместитель руководителя.

11. РФФИ, грант РФФИ 17-19-01054 «Фундаментальные инженерные аспекты технологии получения бактериальной наноцеллюлозы из легковозобновляемого

целлюлозосодержащего сырья», № Государственной регистрации АААА-А17-117072710004-4, 2017-2019 гг., 2020-2021 гг. – основной исполнитель.

12. Минобрнауки, СО РАН, Проект 15.3 «Разработка упрощенной технологии получения биоэтанола из мискантуса для синтеза этилена» П.1. Комплексной программы ФИ СО РАН «Междисциплинарные интеграционные исследования», Номер проекта по госзаданию V.47 № 0385-2018-0013, Госрегистрация темы АААА-А17-117113040004-2, 2018-2019 гг. – руководитель блока.

13. НИОКТР ФПНИ в рамках государственного задания на 2021-2023 гг. Фундаментальные основы создания интегрированной технологии переработки легковозобновляемого непищевого растительного сырья в востребованные экономикой РФ продукты. Номер государственного учета 121061500030-3. – заместитель руководителя.

14. РФФ, грант РФФ 22-13-00107 «Фундаментальные подходы к переработке технической культуры мискантус в ценные материалы и биопродукты для снижения углеродного следа» – исполнитель.

В данную диссертационную работу частично вошли материалы трех диссертационных работ на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) [Байбакова, 2017; Гладышева, 2018; Миронова Г.Ф., 2021], выполненных под руководством Скибы Е.А.

Структурно-методологическая схема исследований представлена на рис. 2.1. На первом этапе проводился анализ литературы по теме исследования, формулировались цель и задачи собственных исследований.

Второй этап исследований посвящен экспериментальным исследованиям: разработке и исследованиям процессов предварительной химической обработки и ферментативного гидролиза предобработанного целлюлозосодержащего сырья; исследованиям процессов микробиологического синтеза биоэтанола и бактериальной наноцеллюлозы на средах ферментативных гидролизатов легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья.

Третий этап связан с разработкой промышленных биотехнологий производ-

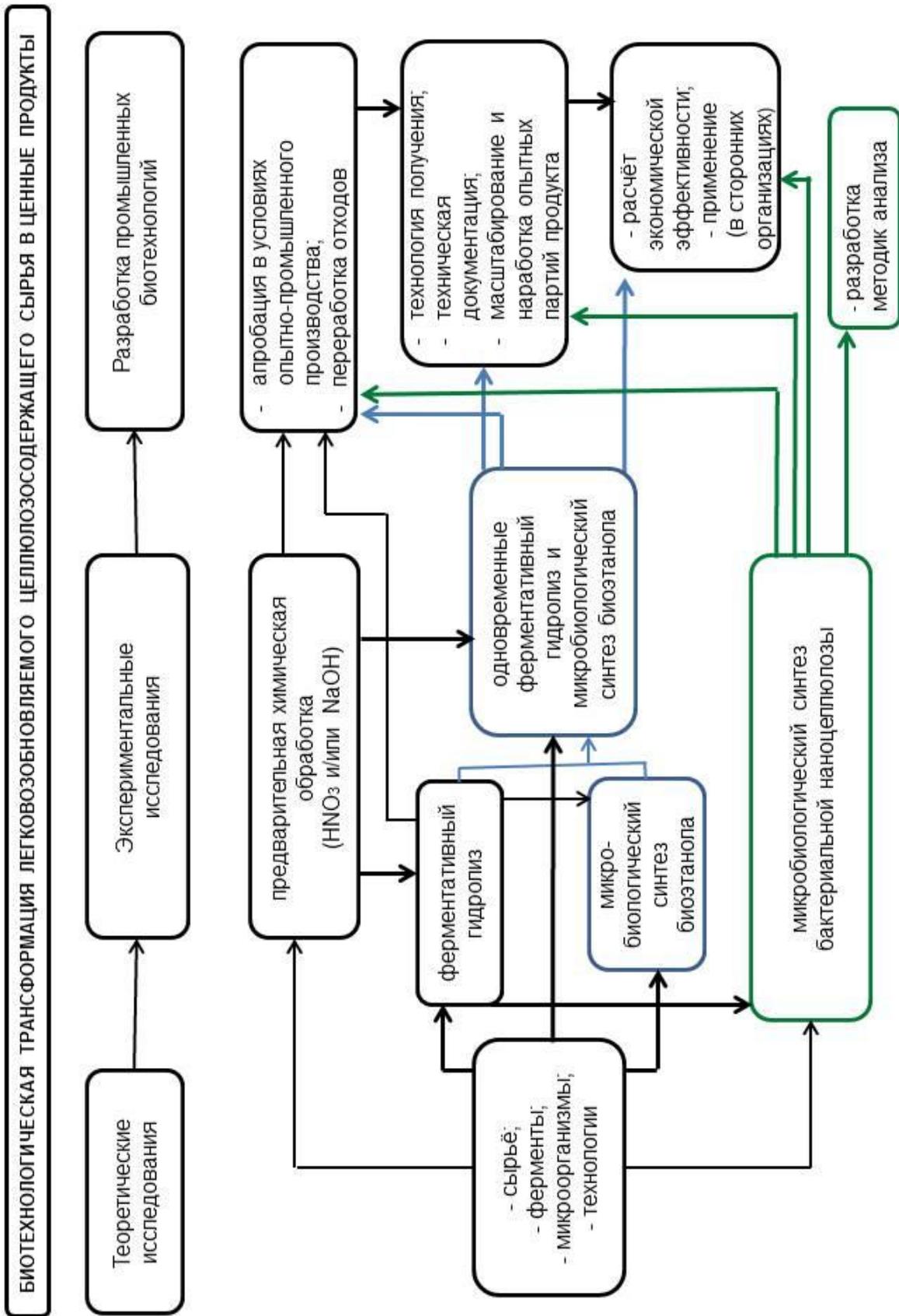


Рис. 2.1 Схема проведения исследований

ства биоэтанола и бактериальной наноцеллюлозы из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья. Для обоих продуктов разработаны технологии получения и техническая документация, технологии прошли этап первичного масштабирования в условиях опытно-промышленного производства ИПХЭТ СО РАН. Для обоих продуктов выполнен расчёт экономической эффективности. Применение выполнено в сторонних организациях (ИК им. Г.К. Борескова СО РАН; ФГБУ ГНЦ Минздрава РФ; ФГБОУ ВО АГМУ).

2.2 Материалы и оборудование

2.2.1 Характеристика сырья

В работе использовано легковозобновляемое целлюлозосодержащее сырьё двух видов: массовый отход сельского хозяйства шелуха овса и многолетняя энергетическая культура мискантус (надземная часть растения).

Шелуха овса была любезно предоставлена ЗАО «Бийский элеватор» в 2010-2021 гг.

Мискантус (*Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack) селекционирован в Институте цитологии и генетики, г. Новосибирск и в 2013 г зарегистрирован как сорт «Сорановский». В 2011 г. на территории ИПХЭТ СО РАН была заложена экспериментальная деляна этого сорта мискантуса. В работе использована биомасса мискантуса (стебель и листья), выращенная в г. Бийске и в г. Новосибирске, урожаи 2011-2021 гг [[Капустянчик, 2020](#); [Капустянчик, 2021 а](#); [Капустянчик, 2021,б](#); [Якименко, 2021](#)]. Приводятся усреднённые данные по химическому составу мискантуса.

2.2.2 Характеристика ферментных препаратов

В данной работе были применены такие ферментные препараты (ФП), как «Целлюлюкс-А» (порошкообразный, ООО ПО «Сиббиофарм», Россия), «Уль-

траффо Коре» (жидкий, «Novozymes A/S», Дания) и «Брюзайм ВGX» (жидкий, «Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A.», Польша). «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; «Ультраффо Коре» стандартизован по β -глюканазе (К.Ф. 3.2.1.6); «Брюзайм ВGX» стандартизован по ксиланазе (К.Ф. 3.2.1.8), активности приведены в таблице 2.1. По значениям плотности жидких ФП (плотность «Ультраффо Коре» 1,22 г/мл, плотность «Брюзайм ВGX» 1,20 г/мл) пересчитаны их активности из объемных (мл) в массовые (г).

Таблица 2.1 – Характеристика ФП

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

2.2.3 Характеристика микроорганизмов

а) продуценты биоэтанола

В работе использовались три штамма спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: Y-1693, Y-3137, Y-3136, их характеристики приведены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Характеристика штаммов спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*

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

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

Штаммы *S. cerevisiae* У-3137 и *S. cerevisiae* У-3136 (Коллекция микроорганизмов для спиртовой, уксусной, ферментной и дрожжевой промышленности (куратор коллекции Римарева Л.В., ВНИИПБТ, г. Москва) применяются в спиртовой промышленности для сбраживания осахаренного суслу из зернового сырья. Они осмофильны, выдерживают повышенные концентрации спирта (до 13-14 % об.) и кроме того снижают образование побочных метаболитов в процессе получения спирта [пат. РФ 2331666; пат. РФ 2331667].

б) продуценты бактериальной наноцеллюлозы

В работе использованы микроорганизмы, приобретённые в ВКПМ: симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 и индивидуальные штаммы уксуснокислых бактерий, а именно: *Komagataeibacter xylinus sucrofermentans* В-12428, *Komagataeibacter xylinus* ВКПМ В-12429 и *Komagataeibacter xylinus* ВКПМ В-12431.

Таблица 2.3 – Происхождение штаммов *Komagataeibacter xylinus*, использованных в работе

№	Штамм	Происхождение штамма
1	В-12428	DSMZ 15973. Выделен Toyosaki в 1996 г.
2	В-12429	DSMZ 2004. Выделен Brown в 1886 г.
3	В-12431	DSMZ 2325. Выделен Brown в 1886 г.

В состав *Medusomyces gisevii* входят 8-10 родов бактерий, таких как *Komagataeibacter*, *Gluconobacter*, *Lyngbya*, *Bifidobacterium* и др. и 15-30 родов дрожжей,

таких как *Candida*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomycetes*, *Schizosaccharomyces*, и др. [Marsh, 2014; Chakravorty, 2016], подробнее в п. 1.7.1.4.

Происхождение использованных штаммов *Komagataeibacter xylinus* приведено в таблице 2.3. Остальные данные штаммов *Komagataeibacter xylinus* согласно паспортам ВКПМ совпадают:

- культурально-морфологические признаки штаммов: клетки от эллиптических до палочковидных, прямые или слегка изогнутые, встречаются по одной, в парах или цепочках, грамм отрицательные;
- оптимальная температура роста от: 28 до: 30 °С;
- область промышленного применения штаммов: продуценты бактериальной целлюлозы.

в) продуценты кормового белка

Все продуценты комового белка получены из ВКПМ.

Штамм *Pachysolen tannophilus* Y-1532 предназначался для производства спирта на гидролизатах древесины.

Штамм *Pichia stipitis* Y-3263 получен из DSMZ, использовался для производства кормового белка.

Штамм *Debariomyces castellii* Y-968 не имеет промышленного применения.

Все микроорганизмы, использованные в работе безопасны: они не являются генетически модифицированными штаммами, не относятся к микроорганизмам, патогенным для человека согласно классификации микроорганизмов, приведенной в санитарных правилах СП 1.3.2322-08. Работа со штаммами не требует специальных мер предосторожности.

2.2.4 Используемое оборудование

Химическая лабораторная комната: мешалки верхнеприводные «Velp Stirrer ES» (Velp, Италия), вакуумные насосы для фильтрования суспензий «Laborport N 811 KT.18» (KNF, Германия), сушильные шкафы «ED-23» (Binder, Германия); аналитические весы «EP-214C» (Ohaus, Швейцария), анализаторы влажности

«МВ-23» (Ohaus, Швейцария), вискозиметры «ВПЖ-3» (ООО «Экротех», Россия), термостаты погружные «Termex M01» (Россия), печь муфельная «Nabertherm L3/11/B180» (Германия), колбонагреватели «LN-150» (Россия).

Биотехнологическая лабораторная комната: горизонтальные перемешивающие устройства «ПУ-6410 М» (Россия), спектрофотометр «Unico UV-2804» (United Products & Instruments, Inc., США), спектрофотометр «Cary-60» (Agilent, США); шейкер-инкубатор «Unimax» (Heidolph, США), ферментатор конструкции Павлова И.Н. ёмкостью 11 л для проведения ферментативного гидролиза, установка для подготовки воды, высокоэффективный жидкостной хроматограф «Милхром А-02» (ЗАО Институт хроматографии «Эконова», Россия), иономер И-160МИ (ООО «Измерительная техника», Россия), набор ареометров для спирта АСП по ГОСТ 3639-79 (Россия), центрифуга MiniSpin 5452 («Eppendorf A.G.», Германия), центрифуга «ЦЛУ 6-3» (ООО «Фирма «Поликом», Россия), лиофильная сушилка «HR7000-M» (Harvest Right, LLC, США).

Микробиологическая лабораторная комната: паровой стерилизатор «ВК-75-01» (Россия), суховоздушные термостаты «ТС-80» (Россия), камера климатическая «Binder-400» (Германия), холодильники, оптический микроскоп «Optika В-150» (Италия), сканирующий электронный микроскопом «JSM-840» (JEOL Ltd., Япония).

Часть приборов и оборудования входят в Бийский региональный центр коллективного пользования (БиЦКП), входящего в систему центров коллективного пользования Сибирского отделения РАН (Постановление Президиума СО РАН № 556 от 27.10.2008 г.).

Кроме того, использовано оборудование АО ФНПЦ «Алтай», г. Бийск: газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором «Кристалл – 2000 М» (ЗАО СКБ «Хроматэк», г. Йошкар-Ола, Россия); термогравиметрический анализатор ДТЖ 60, (Shimadzu, Япония; толщиномер с индикатором часового типа ИЧ-10 класса 1 (Кировский завод «Красный инструментальщик», Россия); термомеханический анализатор «ТМА-60» (Shimadzu, Япония) и оборудование ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск: многофункци-

ональный рентгеновский дифрактометр «ДРОН-6» (АО «ИЦ Буревестник», Россия); ИК-спектрофотометр «Инфралюм ФТ-801» (ООО «НПФ Люмэкс-Сибирь», Россия).

Использовано стандартное емкостное оборудование объемом до 250 л, предназначенное для проведения химических процессов, опытно-промышленного производства ИПХЭТ СО РАН. Подробный оборудования список приводится в п. 4.8.1 и п. 5.5.

Информационные ресурсы: Elibrary, ScienceDirect online Elsevier B.V., Springer Journals, Springer Protocols, Springer Materials, Springer Materials Web of Science, American Chemical Society (ACS), Reaxys, Академия Google.

2.3 Методы проведения исследований

2.3.1 Предварительная химическая обработка целлюлозосодержащего сырья

Предобработка проводилась на опытном производстве при атмосферном давлении при температуре 90-96 °С. Использовалось стандартное емкостное оборудование объемом 250 л, все оборудование и обвязка изготовлены из нержавеющей стали. Разовая загрузка сырья составляла 10 кг. Использовался легкий предригрозис: сырьё загружалось в 250 л аппарат, затем туда подавался 1 % раствор азотной кислоты. Гидромодуль составил 1:20, продолжительность процесса 2-4 ч, температура 90 °С. После этого реакционная масса охлаждалась до 60 °С и фильтровалась на вакуумном фильтре. Полученный целлюлозосодержащий продукт промывался на фильтре водой до нейтральной реакции промывных вод. Предгидролиз проводился с целью удаления протеиновой компоненты и пыли, кроме того, в этих условиях происходит начальный гидролиз связей между целлюлозой, гемицеллюлозами и лигнином.

Далее из целлюлозосодержащего продукта получали субстраты четырьмя способами воздействием разбавленными (4 мас. %) растворами азотной кислоты или гидроксида натрия в одну или две стадии.

1) субстрат 1 – предобработка азотной кислотой в одну стадию

Азотнокислая обработка осуществлялась разбавленным раствором азотной кислоты с концентрацией 4 % мас., гидромодуль 1:20, температура 94-96 °С, продолжительность 4-10 ч. Полученный субстрат отжимался от раствора азотной кислоты на фильтре под вакуумом и тщательно промывался водой до получения промывных вод нейтральной реакции.

2) субстрат 1 – предобработка гидроксидом натрия в одну стадию

Для осуществления щелочной делигнификации в емкостном аппарате подготавливался 4 % раствор гидроксида натрия, в него загружалось сырьё после предгидролиза, содержимое аппарата нагревалось до 94-96 °С. Реакционная масса выдерживалась при указанной температуре при постоянном перемешивании в течение 5-12 ч. По окончании процесса реакционная масса охлаждалась до 75 °С и фильтровалась на вакуумном фильтре. Далее проводилась промывка: в 150 л 1 %-ного раствора гидроксида натрия, нагретого до 50 °С, загружался продукт, полученный на предыдущем этапе и перемешивался в течение 1 ч при температуре 50 °С. Постепенное снижение концентрации щелочи позволяет более качественно отмыть субстрат от остатков щелочи. Полученный субстрат фильтровался на вакуумном фильтре и промывался водой. Операция промывки повторялась до получения фильтрата со значением рН 6-7.

Далее проводили операцию декатионирования: субстрат обрабатывался 2 % раствором азотной кислоты при гидромодуле 1:20, температуре 20-25 °С при перемешивании в течение 1 ч. Затем реакционная масса фильтровалась на вакуум-фильтре, промывалась водой до нейтральной реакции и отжималась. Декатионирование проводилась с целью удаления ионов и солей натрия, которые, как известно, плохо удаляются после щелочной делигнификации целлюлозосодержащего сырья [[Mosier, 2005](#); [Hu, 2012](#); [Agrawal, 2015](#)].

3) субстрат 3 – двухстадийная обработка азотной кислотой и гидроксидом натрия

В 4 %-ный раствор гидроксида натрия помещался субстрат 1, масса нагревалась до 94-96 °С и выдерживалась в течение 1-5 ч. Далее осуществлена тщательная промывка от ионов натрия, аналогичная промывке для субстрата 2.

4) *субстрат 3 – двухстадийная обработка гидроксидом натрия и азотной кислотой*

В 4 %-ной раствор азотной кислоты помещался субстрат 2, масса нагревалась до 94-96 °С и выдерживалась в течение 1-5 ч. Полученный субстрат отжимался от раствора азотной кислоты на фильтре под вакуумом и тщательно промывался водой до получения промывных вод нейтральной реакции.

Субстраты во влажном виде (78-82 %) использовали в качестве субстратов для ферментативного гидролиза.

Выход каждого субстрата от массы сырья рассчитан по формуле (2.1):

$$\eta_{сб} = \frac{m_{ст}}{m_c} \cdot 100, \quad (2.1)$$

где $\eta_{ст}$ – выход субстрата из сырья, %;

$m_{ст}$ – масса субстрата после предварительной обработки, кг;

m_c – масса сырья, кг.

2.3.2 Ферментативный гидролиз субстратов

а) определение реакционной способности субстрата к ферментативному гидролизу

Ферментативный гидролиз субстратов проводили в колбах Эрленмейера объёмом 250 мл при концентрации субстрата 33,3 г/л в 0,1 М ацетатном буфере (рН 4,6), при температуре (46±1) °С в течение 72 ч при непрерывном перемешивании (150 об/мин). Ферментные препараты внесены в избытке: «Целлолюкс-А» 40 мг/г субстрата, «Брюзайм ВGX» 200 мг/г субстрата. Оптимальные условия стадии ферментативного гидролиза установлены в работах [Kashcheyeva, 2019].

б) ферментативный гидролиз в ферментёре авторской конструкции Павлова И.Н. объёмом 11 л

Ферментативный гидролиз субстратов проводили в ферментере объёмом 11 л в водной среде при загрузке аппарата 70 % при (47±2) °С в течение 24-72 ч. Ферментные препараты внесены в избытке: «Целлолюкс-А» 40 мг/г субстрата, «Брюзайм ВGX» 200 мг/г субстрата. Уровень активной кислотности поддерживали на уровне (4,7±0,2) с помощью гидроксида аммония и ортофосфорной кислоты

начальная концентрация субстрата варьировала: при получении биоэтанола она составляла 60 г/л, при получении бактериальной наноцеллюлозы 40 г/л. Скорость перемешивания варьировала от 500 об/мин в начале процесса до 150 об/мин.

По результатам ферментативного гидролиза рассчитывались: выход РВ от массы субстрата по формуле (2.2) и степень гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз субстрата по формуле (2.3).

$$\eta_{РВ} = \frac{C_{РВ}}{C_{ст}} \cdot 0,9 \cdot 100 \%, \quad (2.2)$$

$$H = \frac{C_{РВ}}{C_{ст} \cdot (100 - Л - З)} \cdot 0,9 \cdot 100 \cdot 100 \%, \quad (2.3)$$

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

H – степень гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз субстрата, %;

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

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

$C_{ст}$ – концентрация субстрата, г/л;

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

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

в) совмещение стадии ферментативного гидролиза и спиртового брожения

Процесс осуществлялся в колбах Эрленмейера объёмом 2 л и в ферментёре объёмом 11 л. Ферментативный гидролиз проводили согласно п.2.3.2, б, отличие состояло в том, что через 24 ч от начала ферментативного гидролиза реакционную массу охлаждали до 28-30 °С, вносили засевные дрожжи в количестве 10 % и далее в статических анаэробных условиях осуществляли совмещенный процесс ферментативного гидролиза и спиртового брожения в течение 48-96 ч. рН 4,9 поддерживали внесением 30 % раствора ортофосфорной кислоты.

2.3.3 Приготовление питательных сред и получение инокулята

а) для продуцентов биоэтанола

Штамм поддерживался на скошенном агаре, на среде сладкого солодового

сусла. Среду стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм в течении 30 мин. В колбы Эрленмейера (250 мл) со 100 мл среды солодового экстракта вносили посеивную петлю из клеток дрожжей, штамм культивировали в течение 2 суток при температуре 28 °С, далее культуру перевивали в 2 л колбы со средой солодового экстракта, штамм культивировали в течение 1 суток при температуре 28 °С. После этого культуральную жидкость использовали в качестве засеивной культуры для получения инокулята.

Для синтеза биоэтанола на средах ферментативных гидролизатов готовили адаптированную среду, состоящую из солодового экстракта и ферментативного гидролизата в соотношении 1:1 Засев составлял 10 %, температура 28 °С, продолжительность культивирования 1 сутки. Ферментативный гидролизат шелухи овса для приготовления питательной среды получали в 11-л ферментёре. Параметры ферментативного гидролиза приведены в п. 2.3.2 б, в.

Инокулят, полученный на адаптированной питательной среде, вносили в количестве 10 %, концентрация клеток дрожжей в инокуляте составляла 110 ± 10 млн. КОЕ/мл. Контроль качества инокулята осуществлялся согласно [Лихтенберг, 1999; Римарева, 2005].

б) для продуцента бактериальной наноцеллюлозы – симбиотической культуры *Medusomyces gisevii*

Для поддержания жизнедеятельности продуцента использовали стандартную для симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* полусинтетическую питательную среду, состоящую из глюкозы и экстракта чёрного чая [Goh, 2012]. Данная питательная среда являлась контрольной и готовилась следующим образом: навеску сухого чёрного чая [ГОСТ 32573-2013] (10 г сухого чёрного чая на 1 л питательной среды, что соответствует содержанию экстрактивных веществ чёрного чая в среде 3,2 г/л) заливали кипятком, вносили глюкозу в количестве 20 г/л, ёмкость для экстракции закрывали крышкой, выдерживали содержимое при температуре 94-96 °С 15 минут, после чего охлаждали и отфильтровывали с помо-

щью металлического сита. Стерилизацию питательной среды проводили в течение 15 мин при 0,5 атм либо не проводили.

Приготовление питательных сред на основе ферментативных гидролизатов приводили следующим образом: ферментативные гидролизаты центрифугировали при частоте вращения 3500 об/мин в течение 10 мин, после чего стандартизировали по глюкозе, приводя среду к содержанию глюкозы 20 г/л. Стандартизованные гидролизаты нагревали до 100 °С и использовали в качестве экстрагентов для извлечения экстрактивных веществ черного чая. Витамины и стимулирующие добавки не использовались. Далее среды готовили аналогично контрольной среде.

Как правило, инокулят готовили на контрольной среде. Для биосинтеза БНЦ на среде ферментативного гидролизата целлюлозосодержащего сырья, использовался инокулят, полученный на этой же среде. Культивирование инокулята проводили в статических условиях при температуре $(27 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ в течение 7 суток. Активную кислотность в процессе культивирования не регулировали, что оптимально для большинства продуцентов БНЦ [Campano, Balea, Blanco, & Negro, 2015; Velásquez-Riaño & Bojacá, 2017; Gladysheva, Skiba, Zolotukhin, & Sakovich, 2018; Hussain, Sajjad, Khan, & Wahid, 2019].

В качестве инокулята использовалась культуральная жидкость, при этом контролировалась численность дрожжей и уксуснокислых бактерий. Использован метод прямого подсчета на камере Горяева. Количество микроорганизмов в инокуляте в зависимости от среды, на которой он был получен, варьировало: общее количество дрожжей – от 12,9 до 13,2 млн. клеток в 1 см^3 ; общее количество уксуснокислых бактерий от 1,6 до 2,2 млн. клеток в 1 см^3 .

в) для продуцентов бактериальной наноцеллюлозы – индивидуальных штаммов *Komagataeibacter xylinus*

Для поддержания жизнедеятельности использовали классическую для продуцентов БНЦ среду Хестрина-Шрамма, в состав которой входят: глюкоза – 2%, пептон – 0,5%, дрожжевой экстракт – 0,5%, Na_2HPO_4 – 0,27 %, лимонная кислота – 0,115 %. рН 6,0, для установления данной активной кислотности использовали HCl и NaOH. Среду стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм в течении 30 мин.

При биосинтезе БНЦ на среде ферментативного гидролизата целлюлозосодержащего сырья, использовался инокулят, полученный на этой же среде. От п. 2.3.3, б отличие состояло в том, что в гидролизные среды вносили компоненты, соответствующие среде Хестрина-Шрамма: пептон – 0,5%, дрожжевой экстракт – 0,5%, Na_2HPO_4 – 0,27 %, лимонная кислота – 0,115 %.

г) для кормовых дрожжей

Для поддержания жизнедеятельности кормовых дрожжей использовали глюкозо-пептонную синтетическую питательную среду, имеющую следующий состав: глюкоза – 20 г/л, пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, рН 4-5 ед. рН. Среду стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм в течении 30 мин.

Для синтеза кормовых дрожжей на средах ферментативных гидролизатов и барды (после сбраживания ферментативных гидролизатов), готовили адаптированную среду, состоящую из синтетической среды и ферментативного гидролизата (барды) в соотношении 1:1. Засев составил 10 %, температура культивирования 30 °С, перемешивание 180 об/ мин, продолжительность 1-3 суток.

2.3.4 Микробиологический синтез

а) Микробиологический синтез биоэтанола

Синтез биоэтанола проводили в анаэробных условиях, статически в колбах Эрленмейера объёмом 2 л и в ферментёре объёмом 11 л. Вносили 10 % инокулята и проводили спиртовое брожение при 28-30 °С в течение 48-96 ч, рН 4,9 поддерживали внесением 30 % раствора ортофосфорной кислоты.

При масштабировании биосинтеза биоэтанола методики и оборудование приведены в экспериментальной части.

б) Микробиологический синтез бактериальной наноцеллюлозы

При биосинтезе БНЦ на средах ферментативных гидролизатов целлюлозосодержащего сырья культивирование проводили в стеклянных емкостях объёмом 250 мл, при этом объём питательной среды составил 100 мл. Для каждого опыта задействовано по 18 емкостей. Инокулят вносили в количестве 10 % от объема

питательной среды. В качестве контроля использована полусинтетическая глюкозная среда (п. 2.3.3, б). Культивирование проводили при температуре 27 °С в статических условиях в течении 24 суток. Активную кислотность в процессе культивирования не регулировали. Каждый опыт проведен дважды.

в) Микробиологический синтез биомассы кормовых дрожжей

Среда в количестве 100 мл автоклавировалась при 0,5 атм. 30 мин. После проверки стерильности вносилось 10 % инокулята. Температура культивирования 30 °С, перемешивание при частоте 180 об/мин, продолжительность культивирования 3-4 суток.

Приготовление питательных сред, пересев культур, подсчет клеток проводились стандартными методами [Аникеев, 1983; Бабьева, 1979; Градова, 2016; Егоров, 1989; Крикунова, 1998; Нетрусов, 2006].

2.3.5 Очистка целевых продуктов

а) дистилляция биоэтанола

Биоэтанол подвергали фракционному разделению с помощью бражной колонны GS-2, произведенной в г. Щелково, Московской области компанией «Гоним Спирт». Колонна снабжена перегонным кубом объемом 25 л, управляющим электронным блоком автоматики (автоматическая стабилизация давления в системе); цифровым контролем температуры пара; холодильником Димрота; профессиональным пищевым баком с двойными стенками и сливным краном; дополнительным холодильником на колонне, охлаждающим выходящий дистиллят; двумя ТЭНами, встроенными в бак.

б) очистка бактериальной наноцеллюлозы

БНЦ промывали пассивным методом при 20 °С для избежания изменения структуры БНЦ [Keshk, 2014]. Сначала промывали образцы 2 %-ным раствором гидроксида натрия в течение 2 суток, затем водой, затем проводили декатионирование соляной кислоты при рН 3 в течение суток, наконец, снова водой согласно до достижения нейтральной реакции промывных вод. После промывки тонкие об-

разцы БНЦ становились прозрачными, толстые – жемчужно-белыми, желтоватый оттенок БНЦ не допускается.

2.3.6 Расчёт выхода целевых продуктов

а) расчёт выхода биоэтанола

Выход биоэтанола (%) на стадии брожения рассчитывался как отношение экспериментальной концентрации биоэтанола к теоретической, рассчитанной от концентрации сбраживаемых сахаров по стехиометрическому уравнению брожения по формуле (2.4):

$$Y_{PB} = \frac{K}{C_{PB} \cdot 0,6479} \cdot 100 \%, \quad (2.4)$$

где Y_{PB} – выход биоэтанола, %;

K – концентрация биоэтанола, % об.;

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

0,6479 – коэффициент конверсии глюкозы в этанол.

Выход биоэтанола (%) при ферментативном гидролизе, совмещенном со спиртовым брожением, рассчитывался как отношение экспериментальной концентрации биоэтанола к теоретической, рассчитанной от по стехиометрическому уравнению брожения от массы субстрата с учетом коэффициента 0,9 (т.е. от теоретической концентрации сбраживаемых сахаров) (2.5):

$$Y_{CT} = \frac{K}{C_{CT} \cdot 0,6479} \cdot 0,9 \cdot 1000 \cdot 100 \%, \quad (2.5)$$

где Y_{CT} – выход биоэтанола, %;

K – концентрация биоэтанола, % об.;

C_{CT} – концентрация субстрата, г/л;

0,6479 – коэффициент конверсии глюкозы в этанол;

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

Выход биоэтанола (дал/т сырья) рассчитывался как произведение выходов на стадиях химической предварительной обработки, ферментативного гидролиза и спиртового брожения по формуле (2.6):

$$Y = \eta_{\text{ст}} \cdot \eta_{\text{РВ}} \cdot Y_{\text{РВ}} \cdot 100 \% \quad (2.6)$$

где Y – выход биоэтанола, дал/т шелухи овса;

$\eta_{\text{ст}}$ – выход субстрата от массы чырья на стадии предобработки, доли;

$\eta_{\text{РВ}}$ – выход РВ от субстрата на стадии ферментативного гидролиза, доли;

$Y_{\text{РВ}}$ – выход биоэтанола от РВ, доли.

б) расчет выхода БНЦ

После промывки пленки БНЦ были высушены в расплавленном состоянии на воздухе или лиофильным способом.

Выход БНЦ был рассчитан по следующей формуле (2.7):

$$\eta_{\text{БНЦ}} = \frac{m}{C_{\text{Г}} \cdot V \cdot 0,9} \cdot 100 \% \quad (2.7)$$

где $\eta_{\text{БНЦ}}$ – выход БНЦ, %; m – масса БНЦ в пересчете на абсолютно сухое вещество, г; $C_{\text{Г}}$ – концентрация глюкозы в среде, г/л; V – объем питательной среды, л; 0,90 – коэффициент, обусловленный отщеплением молекул воды от мономерных звеньев глюкозы в процессе синтеза БНЦ. Подобный расчет выхода БНЦ был использован в работах (Budaeva et al., 2020; Hestrin & Schramm, 1954). В расчете принято, что влажность БНЦ составила 99,0 %, что многократно было нами определено методом гравиметрического анализа после лиофильного высушивания. Это хорошо согласуется с литературными данными (Abol-Fotouh et al., 2020; Gromovykh et al., 2020).

Производительность БНЦ была рассчитана по следующей формуле (2.8):

$$П = \frac{m}{V} \quad (2.8)$$

где $П$ – производительность БНЦ, г/л;

m – масса сухой БНЦ, г;

V – объем питательной среды, л.

2.3.7 Методики анализа

Исследование химического состава растительного сырья и полученных субстратов (содержание целлюлозы, пентозанов, кислотонерастворимого лигнина и золы) проводилось согласно методикам: [ГОСТ 6840-78](#); [ASTM D 1103-60,1978](#); [ГОСТ 10820-75](#); [Kurschner & Hoffer, 1993](#); [ГОСТ 18461-93](#); [TAPPI T 222 om-83, 1988](#); [TAPPI T 211 om-85, 1985](#); [Obolenskaya, Yelnitskaya, & Leonovich, 1991](#). Определение массовой доли влаги сырья и субстратов проводилось на анализаторе влажности. Определение степени полимеризации проводилось вискозиметрическим методом с использованием кадоксена согласно методике [[ГОСТ 25438-82](#); [Hallac and Ragauskas 2011](#)]. Определение массовой доли пентозанов в пересчёте на ксилозу и пентоз в питательных средах проводилось спектрофотометрическим методом с использованием железоорсинового реактива согласно методике [[Obolenskaya, Yelnitskaya, & Leonovich, 1991](#)] при длине волны 630 нм; для построения градуировочного графика использовались растворы ксилозы с известными концентрациями; относительная погрешность метода 5,0 %.

Уровень активной кислотности измерялся с помощью рН-метра. Моносахаридный состав определялся на микроколоночном жидкостном хроматографе с помощью персонального компьютера с аналого-цифровым преобразователем и программой «МультиХром». Концентрация РВ в пересчёте на глюкозу определялась спектрофотометрическим методом при длине волны 530 нм с использованием реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты согласно методике [[Miller,1959](#)], относительная погрешность метода 3,45 %. Концентрация глюкозы определялась глюкозооксидазно-пероксидазным методом спектрофотометрически при длине волны 530 нм [[Dotsenko, 2018](#)].

Микробиологические показатели контролировали методом прямого подсчёта при использовании камеры Горяева (площадь = 1/400 мм²; высота = 0,100 мм) и оптического микроскопа [[Градова, 2001](#)].

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 ±0,1 %

об. Анализ полученного биоэтанола выполнялся согласно [ГОСТ 32039-2013] методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором.

Растровую электронную микроскопию лиофильно высушенных образцов БНЦ проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа «JSM-840» с рентгеновским микроанализатором Link-860 серии II. Инфракрасную спектроскопию проводили на инфракрасном спектрофотометре в диапазоне частот 4000-500 см⁻¹ в таблетках KBr. Термогравиметрический анализ проводили на термогравиметрическом анализаторе. Толщину образцов БНЦ определяли толщиномером. Прочность БНЦ определяли на термомеханическом анализаторе «ТМА-60», исследуемый образец растягивался со скоростью 5,0 г мин⁻¹ от 0,0 г до максимальной нагрузки 400,0 г до разрыва, температура проведения опыта 23,0°C.

Рентгеноструктурный анализ проводили на рентгеновском дифрактометре «ДРОН-6» на монохроматизированном кристаллом пиролитического графите Fe-K_α излучении в интервале углов рассеяния от 3 до 145°. Спектральные характеристики рентгенограмм рассчитывались в программном комплексе PdWin [Ahvenainen, 2016; Terinte, 2011]. Подробно методика расчета размеров индекса кристалличности и методика полнопрофильного анализа описаны в [Torloпов, 2018].

Исследования выполнены при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск, Россия). Экспериментальные результаты получены в многократных повторностях, статистически обработаны с применением стандартных методов с помощью программ Microsoft Office Excel 2019, Statistica 6.0 и MathCad 14.0 и являются достоверными.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ХИМИЧЕСКОЙ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ И ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ПРЕДОБРАБОТАННОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

3.1 Предварительная химическая обработка сырья

В таблице 1 представлены химические составы субстратов, полученных после химической обработки двух видов сырья (шелухи овса и мискантуса) четырьмя способами: 1 – одностадийная обработка азотной кислотой; 2– одностадийная обработка гидроксидом натрия; 3 – двухстадийная обработка (кислота, щелочь); 4– двухстадийная обработка (щелочь, кислота).

Таблица 3.1 – Химический состав сырья и субстратов из него

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

Одностадийная обработка шелухи овса авторским способом – разбавленным раствором азотной кислоты – приводит к и снижению содержания пентозанов в субстрате 1 в 3,6 раза (8,8 % против 31,4 %) и снижению содержания лигнина в субстрате 1 в 2,1 раза по сравнению с сырьём (9,1 % против 18,8 %). Гидролиз по-

лисахаридов целлюлозосодержащего сырья характерен для любой кислотной предобработки [Hu, 2012] и в этом плане азотнокислая обработка не является исключением. Но осталось довольно много лигнина, что впоследствии может негативно повлиять на ферментативный гидролиз и биотехнологическую конверсию полученного гидролизата в ценные продукты.

При одностадийной предобработке с помощью гидроксида натрия наблюдается делигнификация: содержание лигнина в субстрате 2 по сравнению с сырьём снижается в 5,8 раз (5,4 % против 31,4 %), что более эффективно, чем кислотная предобработка с получением палп 1. Кроме того, происходит гидролиз гемицеллюлоз и их содержание снижается в 3,1 раза (10,1 % против 31,4 %), однако, остаточное содержание гемицеллюлоз после щелочной обработки выше, чем после кислотной. Полученные результаты вполне отвечают классическим представлениям о механизме щелочной делигнификации, хорошо описанном в литературе (см. литобзор). Известным недостатком щелочной делигнификации, проводимой с помощью гидроксида натрия является сложность отмывки получаемых палп от ионов натрия [Mosier, 2005; Hu, 2012; Agrawal, 2015; Zabed, 2016]. Эти ионы могут негативно повлиять на последующую биотехнологическую конверсию.

В связи с тем, что биосинтез любых ценных продуктов на средах ферментативных гидролизатов целлюлозосодержащего сырья является крайне сложным биотехнологическим процессом, а их продуценты могут быть чувствительны к ингибиторам, содержащихся в гидролизных средах, была осуществлена двухстадийная химическая обработка сырья, позволившая получить химически более чистые субстраты.

Субстрат 3 имеет низкое содержание лигнина – всего 0,8 %, что в 11,4 раз ниже, чем в палп 1 (9,1 %) и в 23,5 раза ниже, чем в сырье (18,8%). Массовая доля пентозанов составляет 3,8 %, что в 2,3 раза ниже, чем в палп 1 (8,8 %) и в 8,3 раза ниже, чем в сырье (31,4 %). Химический состав субстрата 4 также значительно улучшился, а именно: массовая доля лигнина составила всего 0,5 %, что в 10,8 раз ниже, чем в субстрате 2 (5,4 %) и в 37,6 раз ниже, чем в сырье (18,8 %). Мас-

совая доля пентозанов также снизилась и составила 9,4 %, что в 1,1 раз ниже, чем в субстрате 2 (10,1 %) и в 3,3 раза ниже, чем в сырье (31,4 %).

Сравнивая между собой субстраты 3 и 4, можно отметить, субстрат 3 характеризуется минимальной массовой долей пентозанов, а субстрат 4 – минимальной массовой долей лигнина. Самой большой массовой долей целлюлозы (94,2 %) характеризуется субстрат 3, а самой большой суммой гидролизуемых веществ (99,1 %) – субстрат 4. По химическим составам субстратов 3 и 4 невозможно определить фаворита, так как они очень близки.

Выходы четырех субстратов коррелируют с их химическим составом: $2 > 1 > 4 > 3$, то есть, чем чище палыч, тем ниже его выход, что вполне закономерно.

Описанные закономерности по изменению химического состава в зависимости от способа обработки сырья и по выходу полностью справедливы и для субстратов из мискантуса.

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

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

3.2 Ферментативный гидролиз полученных субстратов

В табл.3.2 приведены результаты ферментативного гидролиза через 72 ч в среде ацетатного буфера при концентрации субстрата 30 г/л. Нативное сырьё плохо поддается ферментативному гидролизу в связи с труднодоступностью целлюлозы и гемицеллюлоз для ферментных препаратов. Через 72 часа ферментативно-

го гидролиза для шелухи овса концентрация РВ составляет 4,5 %, что соответствует выходу РВ от массы субстрата 15,8 %; для мискантуса концентрация РВ составляет всего 4,1 г/л, что соответствует выходу РВ от массы субстрата 11,1 %.

Таблица 3.2 – Результаты ферментативного гидролиза полученных субстратов

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

По эффективности ферментативного гидролиза субстратов можно построить ряд в порядке убывания: 2>4>2>3 для шелухи овса и 4>1>2>3 для мискантуса и в обоих случаях это не совпадает с рядом, соответствующим убыванию суммы гидролизуемых веществ: 2>1 > 4 >3, одинаковым для обоих видов сырья. Именно его мы пытались использовать для прогнозирования выхода РВ.

Однако для обоих видов сырья, наименее гидролизуемым оказался субстрат 3, характеризующийся наивысшей химической чистотой. То есть химическая чистота субстрата не является гарантом эффективности ферментативного гидролиза. Видимо, при использованной двухстадийной предобработке изменяется модификация целлюлозы и она становится более устойчивой к ферментативному гидролизу. Это требует дополнительных исследований для расширения знаний о механизме ферментативного гидролиза целлюлозы.

Вклад ксилозы в общий состав РВ в гидролизатах из шелухи овса составляет 9,0-15,7 %, а в гидролизатах из мискантуса – всего 0,8-5,7 %, что объясняется природой сырья: в нативной шелухе овса доля пентозанов высока – 31-35%. Для

обоих видов сырья наибольшая концентрация ксилозы (4,4 г/л для шелухи овса и 1,7 г/л для мискантуса) обнаружена в гидролизатах субстратов 2, что объясняется способом их получения: под действием щёлочи делигнификация проходит хорошо, а гидролиз гемицеллюлоз ограниченно, поэтому доля ксилозы в гидролизатах из субстратов 2 относительно высока. Использование в предобработке азотной кислоты (субстраты 1) позволяет получить преимущественно глюкозные гидролизаты из обоих видов сырья.

Интересно, что гидролиз четырех субстратов из шелухи овса прошел несколько эффективнее, чем гидролиз четырех субстратов из мискантуса (примерно на 2 % для каждого способа), хотя по сумме гидролизуемых компонентов лидировал мискантус.

В целом можно сделать вывод о том, что для обоих видов сырья все четыре вида предобработки сырья являются эффективными для последующего ферментативного гидролиза, так как по сравнению с нативным сырьём реакционная способность к ферментативному гидролизу увеличивается в 6,1-6,9 раз для шелухи овса и в 6,5-7,3 раз для мискантуса.

3.3 Азотнокислая обработка целлюлозосодержащего сырья: проблемы, решения, перспективы

3.3.1 Зависимость эффективности азотнокислой обработки от концентрации азотной кислоты в растворе

Результаты предварительной обработки шелухи овса растворами 2, 4 и 6 мас.% HNO_3 оценивали в первую очередь по изменению химического состава: содержания целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина (рис.3.1). Обращает на себя внимание факт снижения выхода продукта азотнокислой обработки (ПАО): при повышении концентрации азотной кислоты от 2 % до 6 % выход ПАО падает от 71 % до 43 %. При этом содержание целлюлозы меняется в обратной зависимости и повышается от 54,0 % (для 2 % HNO_3) до 74,3 % (для 6 % HNO_3). Рассмотрим

изменения содержания в ПАО нецеллюлозных компонентов при повышении концентрации азотной кислоты на стадии предобработки: содержание пентозанов снижается от 12,1 % (для 2 % HNO_3) до 4,6 % для (для 6 % HNO_3), содержание лигнина снижается от 26,7 % (для 2 % HNO_3) до 12,6 % (для 6 % HNO_3). На рис. 3.2 представлено сравнение накопления редуцирующих веществ в ходе ферментативного гидролиза субстратов из нативной и обработанной шелухи овса.

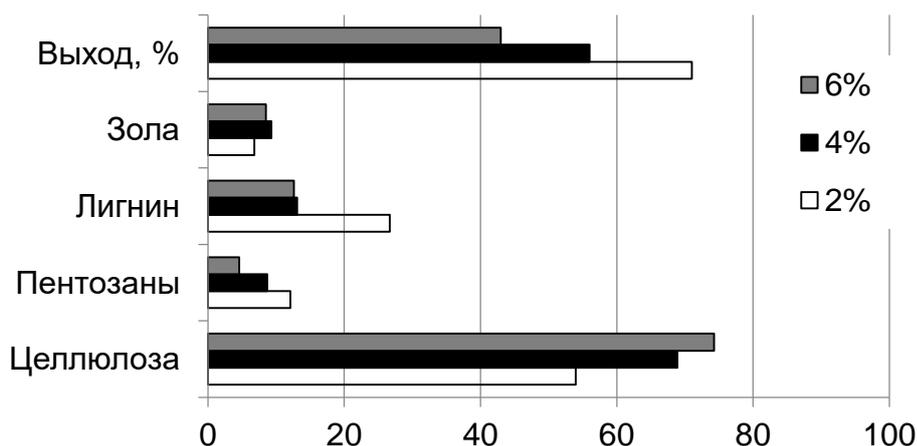


Рисунок 3.1 – Химический состав ПАО в зависимости от концентрации азотной кислоты на стадии предобработки

Предварительная обработка раствором 2 мас.% HNO_3 позволяет увеличить выход РВ всего лишь в 2,4 раза по сравнению с необработанным. Такое незначительное повышение реакционной способности связано с недостаточным разрушением лигноцеллюлозной матрицы исходного сырья и высвобождением целлюлозы, что препятствует доступности поверхности целлюлозы для действия ферментов. Это подтверждается и полученными результатами по изменению химического состава оболочек овса после обработки (рис. 3.1). Наилучший выход по редуцирующим веществам получен при ферментативном гидролизе субстрата из шелухи овса, обработанной раствором 4 мас.% HNO_3 : получена концентрация редуцирующих веществ 27 г/л, что эквивалентно выходу 81%.

Обработка шелухи овса раствором 6 мас.% HNO_3 не дает дальнейшего увеличения концентрации редуцирующих веществ после гидролиза. Причиной является изменение химического состава после предварительной обработки. Видимо, повышение жесткости в условиях кислотной обработки приводит к образованию

побочных продуктов, ингибирующих ферментативный гидролиз [Jönsson, 2016], поэтому реакционная способность к ферментативному гидролизу при обработке 6 % HNO_3 снижается по сравнению с 4 % HNO_3 . Концентрация редуцирующих веществ после гидролиза 6 % HNO_3 составляет 23 г/л, что эквивалентно выходу 69%.

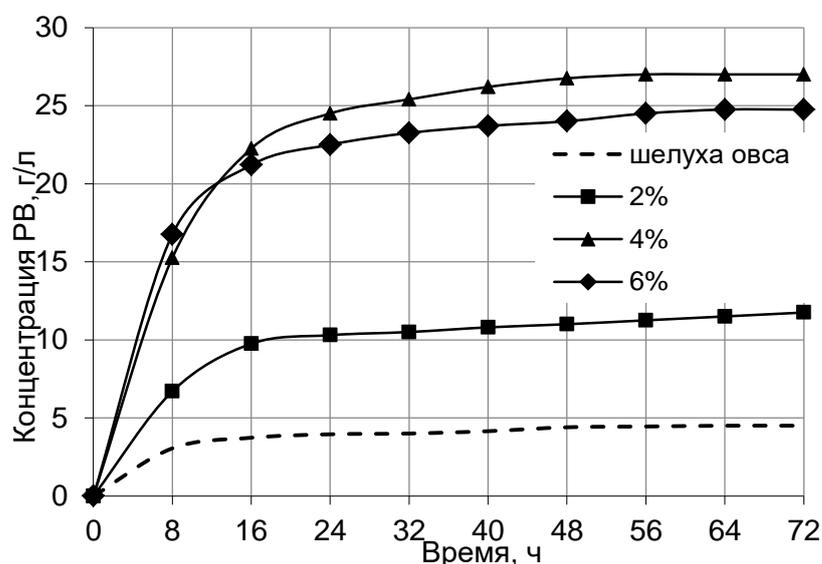


Рисунок 3.2 – Ферментативный гидролиз ПАО в зависимости от концентрации азотной кислоты на стадии предобработки

Проведенная оценка субстратов показала, что обработка шелухи овса 4 мас.% раствором HNO_3 приводит к самой высокой реакционной способности к ферментативному гидролизу, при этом выход редуцирующих веществ увеличивается в 6,8 раза по сравнению с нативным сырьём.

3.3.2 Критическая точка азотнокислой обработки

На практике было обнаружено, что критической точкой получения субстратов методом азотнокислой обработки является их промывка после обработки, именно она определяет эффективность ферментативного гидролиза. Обычно промывку субстратов мы проводим до получения промывных вод нейтральной реакции, однако, в случае азотнокислой обработки этого оказалось недостаточно.

Продукт азотнокислой обработки (ПАО) шелухи овса отжимался от раствора азотной кислоты (4 мас. %) на фильтре под вакуумом и промывался водой двумя способами: до получения промывных вод нейтральной реакции, но окрашенных в оранжево-жёлтый цвет (ПАО 1) и до получения промывных вод нейтральной реакции, и при этом бесцветных (ПАО 2), то есть ПАО 2 получен из ПАО 1. По химическому составу ПАО идентичны.

ПАО 1 был дополнительно промыт в емкостном оборудовании при гидро-модуле 1:20, при перемешивании с частотой оборотов 100 об/мин в течение 30 мин при температуре 60 °С. Полученные при этом промывные воды имели оранжево-жёлтый цвет и нейтральную реакцию. Промывные воды собирали, подвергали вакуум-выпариванию с последующим вакуум-высушиванием. Выход высушенного продукта (далее – ингибитора) составил $0,019 \pm 0,001$ мас. % от массы субстрата.

Было сделано предположение, что в состав ингибитора входит нитрованный лигнин. Для проверки этого предположения специально был получен нитрованный лигнин из шелухи овса. Для этого шелуха овса была обработана 4 %-ным раствором гидроксида натрия при атмосферном давлении при температуре 94-96 °С в течение 4 ч, модуль 1:20. Выделение лигнина из щелока проведено следующим образом: нейтрализация соляной кислотой для коагуляции лигнина, нагрев до 50 С, выдержка 30 минут, фильтрация лигнина с последующей промывкой, сушка на воздухе. Выделенный из щёлока лигнин подвергнут нитрованию 4 %-ной азотной кислотой при температуре 94-96 °С в течение 3 ч.

ПАО 1 и ПАО 2 подвергнуты ферментативному гидролизу в одинаковых условиях. Как видно из рис. 3.3 лучше гидролизуется тщательно промытый ПАО 2. Зависимости выхода РВ в пересчете на массу субстрата и на сумму гидролизующих компонентов от способа промывки приведены в табл.3.3. Тщательная промывка ПАО 2 позволяет повысить выход РВ на 27 % по сравнению с ПАО 1, что очень существенно.

Несмотря на достаточно высокое содержание в субстрате кислотонерастворимого лигнина – от $9,1 \pm 0,1$ % до $12,5 \pm 0,1$ % в разных наших исследованиях,

энзиматический гидролиз ПАО 1 и 2, прошел с высоким выходом, что позволяет исключить версию об ингибировании энзимов лигнином, высказываемую в литературе [Chang, 2000; Jordan, 2012; Limayem, 2012; Zhao, 2012; Rezania, 2020].

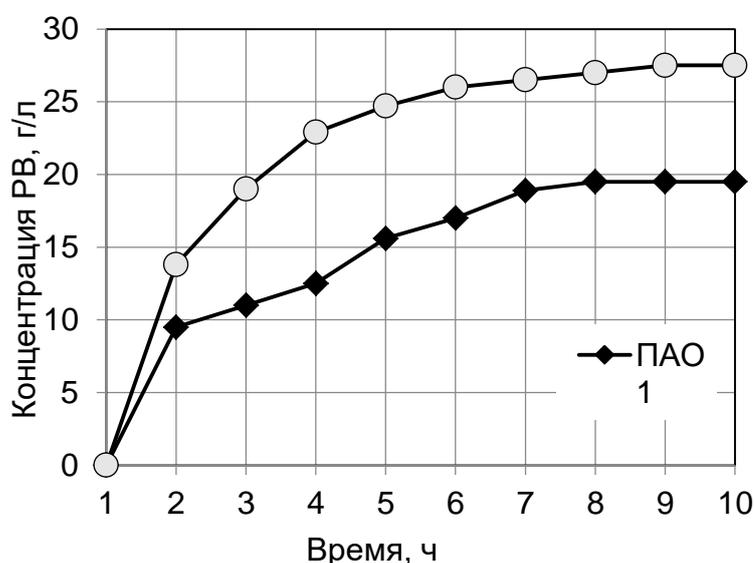


Рисунок 3.3 – Зависимость эффективности ферментативного гидролиза от режима промывки ПАО

Таблица 3.3 – Зависимость выхода РВ от способа подготовки субстрата

Субстрат	Выход РВ через 72 ч энзиматического гидролиза	
	на массу субстрата	на сумму гидролизующих веществ
ПАО 1	52,7 ± 0,3	65,9 ± 0,3
ПАО 2	74,3 ± 0,3	93,0 ± 0,3

Можно предположить, что кислотонерастворимый лигнин представляет собой совокупность продуктов обработки лигнина азотной кислотой, которые химически неактивны и неспособны влиять на процесс энзиматического гидролиза. Это принципиально отличает предобработку азотной кислотой от других видов кислотных предобработок, когда продукты взаимодействия кислот с лигнином являются ингибиторами энзимного гидролиза [Saha, 2003; Sjulander, 2020; Sun, 2016]. Для предобработки азотной кислотой это справедливо лишь отчасти: снижение реакционной способности субстрата 1 по сравнению с субстратом 2 на 27 % свидетельствует о наличии в нем водорастворимого ингибитора, отравляющего действие катализаторов, хотя концентрация ингибитора очень мала – всего 0,019±0,01 % w/w от массы субстрата.

На рис. 3.4 представлены ИК-спектры ингибитора, выделенного в результате промывки ПАО 1 от продуктов нитрования и нитрованного лигнина.

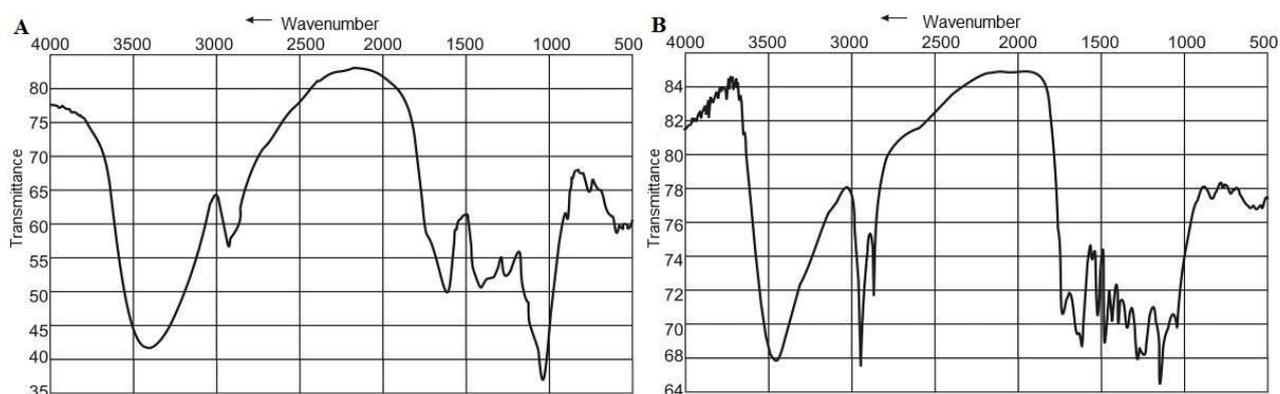


Рисунок 3.4 – ИК-спектры: а – ингибитора, выделенного из ПАО шелухи овса; б – нитрованного лигнина

Химическая природа ингибитора сложна. В ИК-спектрах ингибитора и нитрованного лигнина надежно идентифицируется полоса поглощения валентных колебаний связей О–Н спиртового и фенольного характера с максимумом поглощения при 3500 см^{-1} . В спектрах лигнинов наблюдается интенсивная полоса колебаний карбонильной группы ($\text{C}=\text{O}$) около 1700 см^{-1} , обусловленная как наличием карбонильных групп в структуре лигнина, так и присутствием в нем ацетилированных спиртовых фрагментов. При 1600 см^{-1} регистрируется явно выраженная полоса поглощения валентных колебаний двойных связей углерод–углерод ($\text{C}=\text{C}$), относящихся как к связям в ароматическом кольце лигнина, так и к алифатическим фрагментам $\text{C}=\text{C}$. Наблюдаемое изменение интенсивностей пиков в обоих спектрах свидетельствует о деструкционных и конденсационных процессах во время нитрования и окисления лигнина. Таким образом, качественно ИК-спектр ингибитора сопоставим с ИК-спектром нитрованного лигнина, продукты деструкции лигнина являются основной составной частью ингибитора.

Возможность получения нитрованного лигнина из продуктов обработки соломы ржи азотной кислотой обсуждаются в работе [Shishonok, 1997]. В соответствии со справочником [Аким, 2006], на окислительный характер превращения лигнина указывает увеличение в лигнине карбоксильных групп и его деметокси-

лирование; на реакции нитрования – появление в его составе азота; на реакции фрагментации (гидролиза) – разрушение поперечных сшивок с образованием растворимых даже в водной среде низкомолекулярных фрагментов, а также увеличение содержания фенольных гидроксиллов. Лигнин представляет собой сетчатый полимер ароматической природы нерегулярного строения. Общим элементом для всех лигнинов является фенилпропановое звено. Идентификация лигнина шелухи овса и детальное изучение модификации лигнина в результате реакций нитрования и окисления в процессе предварительной обработки шелухи овса разбавленным раствором азотной кислоты при атмосферном давлении не входила в задачу данного исследования.

Ингибитор находится на поверхности субстрата и тщательная промывка водой позволяет от него избавиться. Индикатором качества промывки является цвет раствора: вместо оранжево-коричневого раствор должен стать бесцветным. Поскольку азотная кислота, используемая для предобработки сырья, совмещает функции кислотного гидролиза, нитрования и окисления, необходимо удалить из твёрдого субстрата именно растворимые продукты превращения лигнина, которые оказывают ингибирующее действие на ферментативный гидролиз, в отличие от кислотонерастворимого лигнина. Таким образом, установлено, что предобработка сырья разбавленным раствором азотной кислоты при атмосферном давлении с последующей промывкой твердой фазы до получения бесцветных промывных вод позволяет получать качественный субстрат для ферментативного гидролиза.

3.3.3 Многократное использование отработанного раствора азотной кислоты

Варочный раствор использовали десятикратно (обработки I-X). Эксперименты проводили в двух сериях: в первой серии опытов концентрацию HNO_3 стандартизовали на уровне 4.4 % в начале варки для каждой новой партии шелухи

овса, во второй серии опытов концентрацию HNO_3 эмпирически повышали для каждой новой партии шелухи.

В табл. 3.4 представлено изменение кислотности раствора HNO_3 при его десятикратном использовании в первой серии опытов. При азотнокислой обработке протекают процессы частичного окисления целлюлозы, кислотного гидролиза и окисления гемицеллюлоз, частичные деструкция и нитрование лигнина. В результате окислительных процессов в отработанной кислоте накапливаются органические кислоты, в основном муравьиная и уксусная. Кислотность варочного раствора в каждом цикле снижается с 4,4 % до 2.4-2.5 %.

Таблица 3.4 – Серия 1. Изменения кислотности раствора HNO_3 в процессе десятикратного использования

№ азотнокислой обработки	Кислотность до обработки, %	Кислотность после обработки, %
I	4.40±0.2	2.51±0.1
II	4.39±0.2	2.47±0.1
III	4.41±0.2	2.38±0.1
IV	4.40±0.2	2.42±0.1
V	4.39±0.2	2.51±0.1
VI	4.41±0.2	2.54±0.1
VII	4.42±0.2	2.49±0.1
VIII	4.40±0.2	2.44±0.1
IX	4.40±0.2	2.50±0.1
X	4.41±0.2	2.47±0.1

В таблице 3.5 представлены результаты определения выхода и химического состава продуктов азотнокислой обработки (ПАО) шелухи овса, полученных в результате десятикратного использования одного варочного раствора.

Установлено, что с I по X обработку выход ПАО возрастает на 15.3 %, при этом наибольший рост выхода ПАО происходит с VI по X обработку (на 11.6 %). Обработки I-V позволили получить образцы ПАО близкого химического состава, при этом после обработки массовая доля целлюлозы в ПАО I-V в сравнении с сырьем увеличилась на 25.9-27.0 %, а массовые доли лигнина и пентозанов снизились на 3.9-4.2 % и на 22.1-23.0 % соответственно. При обработках VI-X происходит ухудшение качества полученных ПАО шелухи овса по сравнению с образца-

ми ПАО I-V. В образце ПАО X снижается массовая доля целлюлозы на 8.6 %, возрастают массовые доли лигнина на 4.6 % и пентозанов на 3.1 % по сравнению с образцом ПАО V. Массовая доля золы в образцах ПАО при всех десяти обработках находится на близком уровне (9.8-10.5 %). Таким образом, установлено, что раствор 4.4 %-ной HNO_3 не может быть использован более 5 раз, при последующих обработках наблюдается некоторое снижение массовой доли целлюлозы в образцах ПАО и повышение содержания лигнина и пентозанов.

Таблица 3.5 – Серия 1. Выход и химический состав продуктов азотной обработки шелухи овса

ПАО	Выход, %	Массовая доля, %			
		целлюлозы по Кюршнеру	лигнина	золы	пентозанов
I	41.3±0.2	66.1±0.4	14.1±0.1	9.9±0.001	10.1±0.1
II	41.9±0.2	66.4±0.4	14.2±0.1	9.8±0.001	10.3±0.1
III	42.3±0.2	66.2±0.4	14.3±0.1	9.9±0.001	10.3±0.1
IV	43.0±0.2	65.4±0.4	14.3±0.1	10.3±0.001	10.7±0.1
V	43.9±0.2	65.0±0.4	14.4±0.1	10.0±0.001	11.0±0.1
VI	45.0±0.2	62.8±0.4	15.1±0.1	10.3±0.001	12.1±0.1
VII	47.1±0.2	60.9±0.4	16.2±0.1	10.0±0.001	12.9±0.1
VIII	49.9±0.2	58.8±0.4	17.5±0.1	10.2±0.001	13.5±0.1
IX	53.5±0.2	57.1±0.4	18.7±0.1	10.4±0.001	13.8±0.1
X	56.6±0.2	56.4±0.4	19.0±0.1	10.5±0.001	14.1±0.1

По внешнему виду образцы ПАО шелухи овса представляют собой рыхлую массу. С каждой последующей варкой углубляется тон окраски, а цвет изменяется от желто-оранжевого к коричневому. Цветность образцов коррелирует с содержанием лигнина в них (рис. 3.5).



Рисунок 3.5 – Цветность образцов в зависимости от кратности использования раствора азотной кислоты: 0 –шелуха овса, I-X – ПАО шелухи овса

Результаты определения эффективности ферментативного гидролиза образцов ПАО, полученных в первой серии опытов, представлены в таблице 3.6. Уста-

новлено, что образцы ПАО I-V обладают максимальной реакционной способностью к ферментативному гидролизу: выход редуцирующих веществ от массовой доли гидролизуемых компонентов в субстрате составляет 95-99 %. Однако, для образцов ПАО VI-X выход редуцирующих веществ при ферментативном гидролизе снижается до 70.0-88.5 %, что свидетельствует о неэффективности обработки партий шелухи овса одним варочным раствором с концентрацией HNO_3 4.4 % более 5 раз.

Известно, что выделяющиеся при азотнокислой обработке оксиды азота катализируют процессы окисления лигнина и гемицеллюлоз, обеспечивая удаление нецеллюлозных компонентов. Наличие оксидов азота оценивалось визуально по образованию желтых паров над поверхностью реакционной массы («лисий хвост»). При каждой последующей обработке выделение оксидов азота наблюдалось в более позднее время, и было менее интенсивным, что в целом приводило к замедлению процесса обработки. Так, при первой обработке оксиды азота появились при нагреве свыше 80 °С (через 1 ч после начала нагрева), а при пятой – при нагреве до температуры 90-95 °С (через 4-5 ч после начала нагрева). По-видимому, это связано с тем, что уксусная и муравьиная кислоты реагировали с оксидом азота и тормозили окислительный процесс. При шестой обработке оксиды не появлялись после 5 ч обработки.

Таблица 3.6 – Серия 1. Результаты ферментативного гидролиза продуктов азотнокислой обработки шелухи овса

Субстрат	Концентрация РВ, г/л	Выход РВ от массы субстрата, %	Выход РВ от м.д. гидролизуемых компонентов, %
ПАО I	25.0±0.5	75.1±1.6	98.9±1.8
ПАО II	25.1±0.5	75.2±1.6	98.8±1.8
ПАО III	25.0±0.5	75.0±1.6	98.9±1.8
ПАО IV	24.9±0.5	74.8±1.6	99.2±1.8
ПАО V	24.0±0.5	72.0±1.5	95.2±1.6
ПАО VI	22.0±0.5	66.0±1.5	88.5±1.6
ПАО VII	21.5±0.5	64.5±1.5	87.4±1.6
ПАО VIII	20.6±0.5	61.8±1.5	85.5±1.6
ПАО IX	18.7±0.2	56.1±0.6	79.1±0.7
ПАО X	16.5±0.2	49.5±0.6	70.0±0.7

Поэтому во второй серии экспериментов концентрацию HNO_3 увеличили при VI обработке до 4.9 %, что сразу привело к появлению оксидов через 1 ч. Поскольку концентрация органических кислот в отработанной кислоте после каждой обработки повышалась, то во второй серии экспериментов эмпирически повышали и концентрацию HNO_3 : при седьмой и девятой обработках – до 5.4 %, при десятой – до 5.6 %. Изменение кислотности раствора HNO_3 в процессе десятикратного использования представлено в табл.3.7.

Таблица 3.7 – Серия 2. Изменения кислотности раствора HNO_3 в процессе десятикратного использования

№ азотнокислой обработки	Кислотность до обработки, %	Кислотность после обработки, %
I	4,40±0,2	2,52±0,1
II	4,40±0,2	2,48±0,1
III	4,42±0,2	2,40±0,1
IV	4,39±0,2	2,41±0,1
V	4,42±0,2	2,49±0,1
VI	4,91±0,2	2,84±0,1
VII	5,42±0,3	3,20±0,2
VIII	5,43±0,3	3,31±0,2
IX	5,43±0,3	3,50±0,2
X	5,61±0,3	3,58±0,2

В табл.3.8 приведены выход и химический состав полученных во второй серии экспериментов образцов ПАО. Установлено, что повышение концентрации HNO_3 в отработанном варочном растворе (начиная с образца VI) позволяет улучшить качественные показатели образцов ПАО: так, химический состав образцов I-X очень близок. Поэтому многократное использование раствора HNO_3 при повышении концентрации кислоты представляется целесообразным к применению. Из табл. 3.8 следует, что десятикратное использование варочного раствора HNO_3 – это не предел, однако уточнить кратность использования отработанного раствора можно только в производственных условиях, так как именно при масштабировании могут быть выявлены узкие места данного процесса.

По результатам оценки эффективности ферментативного гидролиза ПАО шелухи овса через 72 ч (см. таблицу 3.9) установлено, что реакционная способность образцов ПАО I-X находится на одном уровне – выход редуцирующих ве-

ществ от массы субстрата составляет 73-76 %. Выход редуцирующих веществ от массовой доли гидролизуемых компонентов (95-99 %) свидетельствует о полном гидролизе доступной части субстратов в сахара. При этом концентрация лигнина (табл. 3.8) в ПАО I-X находится также примерно на одном уровне и окисленный нитрованный лигнин не оказывает негативного воздействия на эффективность ферментативного гидролиза.

Таблица 3.8 – Серия 2. Выход и химический состав продуктов азотнокислой обработки шелухи овса

ПАО	Выход, %	Массовая доля, %			
		целлюлозы по Кюршнеру	лигнина	зола	пентозанов
I	41.0±0.2	66.9±0.4	13.9±0.1	9.8±0.001	9.4±0.1
II	42.2±0.2	66.2±0.4	14.1±0.1	9.8±0.001	9.9±0.1
III	42.9±0.2	65.7±0.4	14.3±0.1	9.8±0.001	10.2±0.1
IV	43.8±0.2	64.6±0.4	14.4±0.1	10.2±0.001	10.8±0.1
V	44.2±0.2	63.9±0.4	14.6±0.1	10.3±0.001	11.2±0.1
VI	43.9±0.2	64.0±0.4	14.6±0.1	10.2±0.001	11.2±0.1
VII	43.1±0.2	64.9±0.4	14.4±0.1	10.2±0.001	10.5±0.1
VIII	42.6±0.2	65.7±0.4	14.2±0.1	10.0±0.001	10.1±0.1
IX	41.8±0.2	65.9±0.4	14.0±0.1	10.3±0.001	9.8±0.1
X	41.5±0.2	66.3±0.4	13.9±0.1	10.3±0.001	9.5±0.1

Таблица 3.9 – Серия 2. Результаты ферментативного гидролиза продуктов азотнокислой обработки шелухи овса

Субстрат	Концентрация РВ, г/л	Выход РВ от массы субстрата, %	Выход РВ от м.д. гидролизуемых компонентов, %
ПАО I	25.2±0.5	75.6±1.6	99.1±1.8
ПАО II	25.0±0.5	75.0±1.6	98.6±1.8
ПАО III	24.8±0.5	74.4±1.6	98.0±1.8
ПАО IV	24.9±0.5	74.7±1.6	99.1±1.8
ПАО V	24.3±0.5	72.9±1.6	97.1±1.8
ПАО VI	24.8±0.5	74.4±1.6	98.9±1.8
ПАО VII	24.5±0.5	73.5±1.6	97.5±1.8
ПАО VIII	24.1±0.5	72.2±1.6	95.2±1.8
ПАО IX	24.7±0.5	74.1±1.6	97.9±1.8
ПАО X	24.8±0.5	74.3±1.6	98.0±1.8

Таким образом, при контроле варочного раствора по концентрации HNO_3 (4,4 %) возможно проведение пяти рециклов. Визуальным контролем служит цвет субстрата (продукта азотнокислой обработки) – цвет должен быть золотисто-оранжевым, покоричневение не допускается, инструментальным – повышение массовой доли лигнина в субстрате (выше 14,5 % не допускается). Установлено снижение реакционной способности к ферментативному гидролизу от 98,9 до 70,0 % при однократном и десятикратном использовании варочного раствора.

При контроле варочного раствора HNO_3 по концентрации оксидов азота возможно проведение десяти рециклов, при этом концентрация HNO_3 в варочном растворе в десятом цикле повышается до 5,6 %. Установлена стабильность реакционной способности к ферментативному гидролизу при десятикратном использовании варочного раствора. Выход редуцирующих веществ от массовой доли гидролизуемых компонентов (95-99 %) свидетельствует о полном гидролизе доступной части субстратов в сахара. При этом содержание лигнина в субстратах не возрастает и не оказывает негативного воздействия на эффективность ферментативного гидролиза.

Рециклизация варочного раствора HNO_3 при предварительной химической обработке шелухи овса с целью получения субстратов для ферментативного гидролиза, может быть эффективно применена десятикратно в лабораторных условиях. Возможность повышения количества рециклов должна исследоваться в условиях опытно-промышленного производства.

3.3.5 Использование отработанного раствора азотной кислоты

Под действием HNO_3 происходит гумификация органических веществ, из которых состоит целлюлозосодержащее сырьё. Гуминовые вещества, растворимые в кислотах, относят к фракции фульвокислот [Попов, 2004]. Рострегулирующие свойства гуминовых веществ широко обсуждаются в литературе, однако при этом сведений об использовании фракции фульвокислот очень мало [Егорова, 2000; Духанина, 1998]. Это связано с тем, что обычно используются фракции, из-

влекаемые с помощью щёлочи, например, из торфа или из других источников гуминовых веществ [Попов, 2004; Егорова, 2000; Духанина, 1998; Суханова, 2017].

В данном подразделе приводится исследование рострегулирующей активности раствора, полученного после обработки мискантуса разбавленным раствором HNO_3 на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН, на примере семян гороха посевного и моркови посевной, а также исследование химического состава этого раствора.

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) предоставлен ООО «Курай Агро Плюс» (Алтайский край, Бийский р-н, пос. Боровой). По посевным качествам семена гороха соответствовали 2 классу согласно ГОСТ 10246-86. Морковь посевная (*Daucus carota* subsp. *sativus*) сорта Нантская 4 (агрофирма «Семена Алтая», Алтайский край, г. Барнаул) приобретена в магазине.

Исследования энергии прорастания и всхожести проведены рулонным методом согласно ГОСТ 12038-84. Опыты проведены в 4 повторностях и обработаны статистически. Допускаемое отклонение результатов анализа отдельных проб от среднего составило не более ± 6 %. Рострегулирующая активность удобрения исследована при степенях разведения препарата от 1:10 до 1: 1 000 000. Продолжительность выдержки семян в препарате составила 2 ч. В качестве контроля использовалась водопроводная вода.

Энергия прорастания и всхожесть при разведениях препарата от 1:10 до 1:100 000 представлены на рис. 3.6. Степень разведения препарата 1:10 является недостаточной, так как при её использовании энергия прорастания уменьшается на 35 %, а всхожесть – на 17 % по сравнению с контролем. При степенях разведения от 1:100 до 1:10000 наблюдается повышение энергии прорастания и всхожести на 2-6 % по сравнению с контролем. Дальнейшее увеличение степени разведения до 1: 100 000 приводит к результатам, аналогичным контролю, то есть это разведение является избыточным.

Эти выводы подтверждаются при измерении длины стеблей и корней (рис. 3.7). Энергия прорастания определяется через 4 суток. В этот момент при степенях разведения от 1:100 до 1:10000 длина стеблей выше контроля на 12-28 %, а

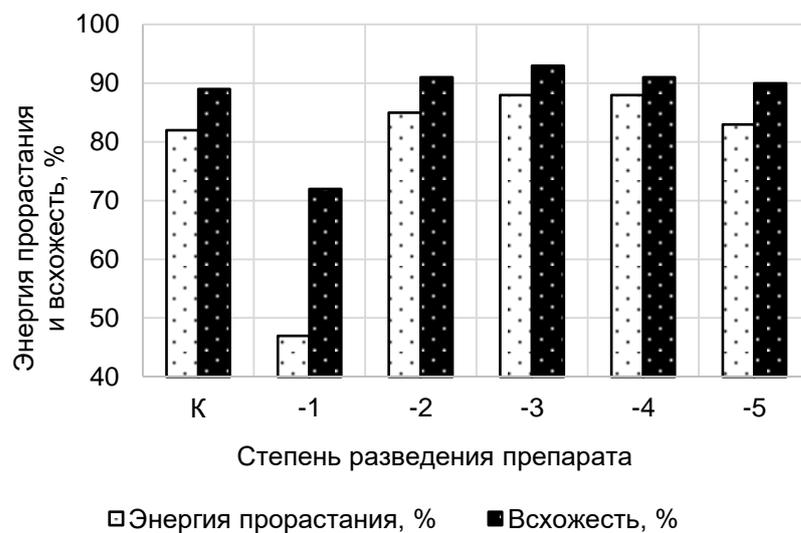


Рисунок 3.6 – Энергия прорастания и всхожесть гороха посевного при разведениях препарата от 1:10 (степень разведения -2) до 1:100 000 (-5)

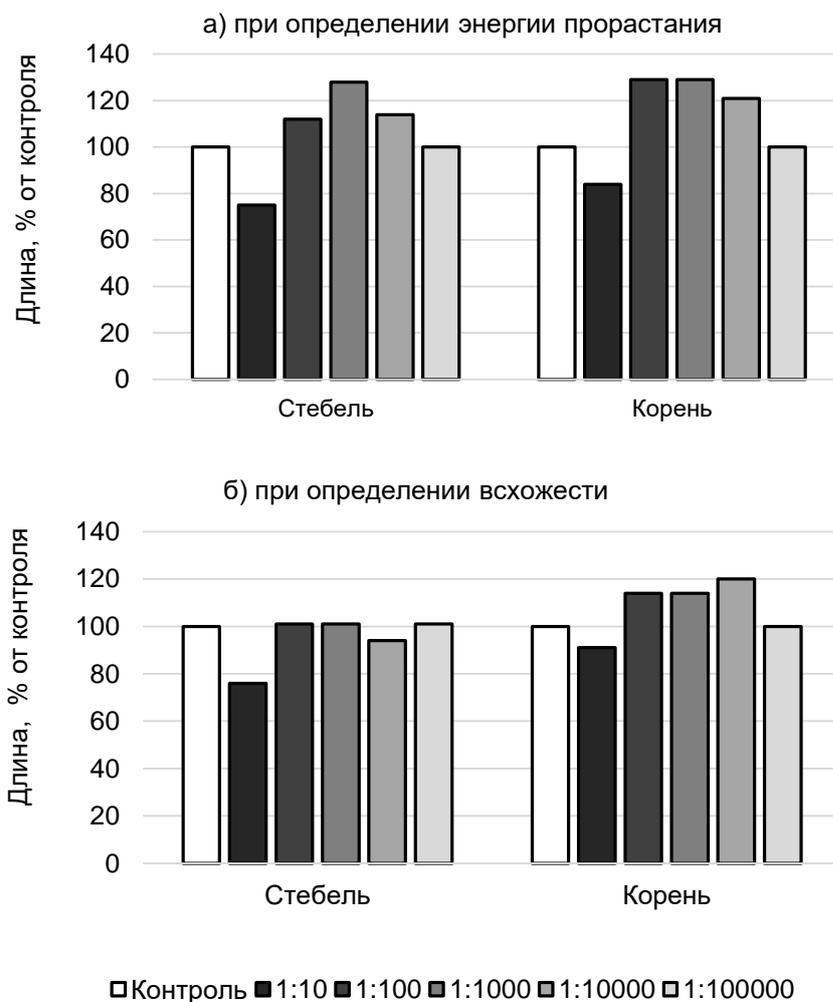


Рисунок 3.7 – Длина стеблей и корней гороха посевного при различных степенях разведения препарата

длина корней выше на 21-29 %. Степень разведения 1:10 является недостаточной: длина стеблей меньше на 25 %, корней на 16 % по сравнению с контролем, то есть при этой степени разведения препарат действует как ингибитор роста семян гороха. Степень разведения 1: 100 000 является избыточной: длина стеблей и корней примерно равны контрольным, то есть при этой степени разведения препарат перестаёт действовать в силу избыточного разбавления.

Всхожесть семян гороха определяется через 8 суток. При степени разведения 1:10 отставание длины стеблей от контрольной сокращается до 24 %, корней – до 9 %, то есть частично снимается ингибирующее воздействие. При степенях разведения от 1:100 до 1:10 000 длина стеблей в контрольном и опытных вариантах сравнивается, а длина корней выше, чем в контроле на 14-20 %. То есть исследуемый препарат обладает гормоноподобным действием и проявляет себя как ауксин. При степени разведения 1: 100 000 длина стеблей и корней остаются примерно равными контрольным.

Явление, когда в зависимости от концентрации вещество может быть стимулятором или ингибитором роста растения многократно описано в литературе [Духанина, 1998; Белопухов, 2012; Прусакова, 2008]. Поскольку новый препарат показал ростстимулирующую активность, можно считать подтвержденным, что он является комбинированным лигногуминовым удобрением. Ростстимулирующая активность проявляется при степенях разведения от 1:100 до 1:10 000, именно этот диапазон следует считать рабочим.

В литературных источниках при проращивании семян гороха в воде приводятся следующие данные: энергия прорастания 45 %, при этом длина стебля 0,71 см, длина корня 3,3 см [Павлова, 2014]. В контрольном опыте в данной работе энергия прорастания составила 82 %, при этом длина стебля 2,4 см, длина корня 5 см. Расхождения могут быть обусловлены использованием разных сортов гороха.

Химический состав препарата приведен в табл. 10. Основными действующими веществами являются нитрат аммония и лигногуминовые вещества. При высушивании препарата на воздухе выпадали игольчатые кристаллы, визуально

похожие на кристаллы нитрата аммония. Для идентификации веществ, входящих в состав препарата был снят его инфракрасный спектр (ИК-спектр).

Таблица 3.10 – Химический состав препарата

Показатель	М.д., %
сухие вещества	4,54±0,07
лигногуминовые вещества	0,60±0,05
редуцирующие сахара	1,13±0,05
в том числе глюкоза	0,17±0,05
зольность	0,14±0,05
NH ₄ NO ₃ (расч.)	2,67

Наложение ИК-спектров препарата и нитрата аммония показали сходство основных характеристических частот, что свидетельствует о том, что основным компонентом удобрения является нитрат аммония (рис. 3.8). ИК-спектр нитрата аммония характеризуется наличием характерных полос колебаний ионов аммония в области $\nu = 3335\text{--}3030\text{ см}^{-1}$ и $\delta = 1485\text{--}1390\text{ см}^{-1}$ и нитрат иона в области $\nu = 1410\text{--}1340\text{ см}^{-1}$ и $\delta = 860\text{--}800\text{ см}^{-1}$. На ИК-спектре препарата пик в области 1600 см^{-1} свидетельствует о наличие ароматического кольца. Так как пик один, можно предположить, что это продукты конденсации лигнина [Жбанков, 1972].

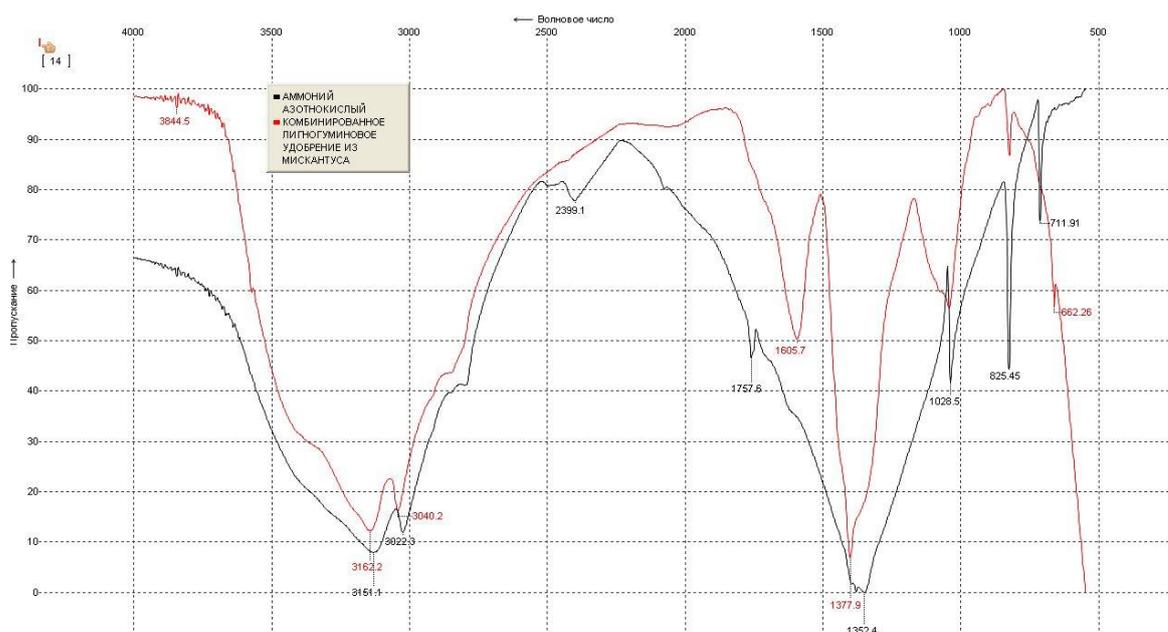


Рисунок 3.8 – ИК-спектры препарата (красная линия) и нитрата аммония (синяя линия)

В литературе описано пролонгирование выживания популяций различных микроорганизмов под действием гуминовых веществ, что объясняется их стресс-потенцирующим и антиоксидантным действием [Николаев, 2020] и повышение плодородия [Пашкеева, 2021], такие работы планируется провести с данным препаратом.

Итак, впервые исследована рострегулирующая активность препарата. Выявлено, что при малых степенях разведения препарат действует как ингибитор, а при высоких действие препарата перестаёт проявляться. Установлено, что рабочим диапазоном для семян гороха посевного является степень разведения от 1:100 до 1:10 000, при этом наблюдается повышение энергии прорастания и всхожести на 2-6 % по сравнению с контролем и стимулируется рост корней на 21-29 %. То есть, выявлено ауксиноподобное ростстимулирующее действие препарата.

Поскольку новый препарат в определенных условиях показал ростстимулирующую активность, подтверждено, что он является комбинированным лигногуминовым удобрением. Это подтверждает, что азотнокислый способ предобработки мискантуса соответствует таким критериям зелёной химии, как безотходность и экологичность. Показана возможность в одном производственном цикле получать два полезных продукта: твёрдую фазу, обогащённую целлюлозой и комбинированное лигногуминовое удобрение, что повышает экономическую эффективность процесса. Комплексному использованию всех компонентов целлюлозосодержащего сырья уделялось значительное внимание в советских технологиях [Риц, 1983; Холькин, 1983; Холькин, 1987]. Таким образом, азотнокислый способ предобработки мискантуса – это перспективный способ предобработки целлюлозосодержащего сырья, который можно рассматривать к внедрению в химической промышленности.

3.3.5 Вопрос экологии при предобработке с помощью азотной кислоты

Применение азотной кислоты для предварительной обработки лигноцеллюлозного сырья с целью получения биоэтанола мало изучено и вопросы экологии занимают немаловажное место.

Предобработка с помощью азотной кислоты принципиально отличается от предобработки с помощью других кислот: на первом этапе помимо разрыва химических связей между целлюлозой, гемицеллюлозами и лигнином происходит гидролиз гемицеллюлоз с образованием растворимых ксилозы и ее предшественников, а на втором этапе происходит частичный гидролиз целлюлозы и превращение сахаров в простые органические кислоты и углекислый газ, окислительное нитрование лигнина [Никитин, 1966]. Учитывая химизм процесса, при азотнокислотной обработке должно использоваться оборудование и обвязка из нержавеющей стали во избежание коррозии.

На стадии обработки использован 4 %-ный раствор (w/v) при модуле 1:20 (w/v), поэтому сразу возникает вопрос об утилизации отработанного раствора азотной кислоты. В лабораторных условиях нами установлено, что возможно десятикратное использование отработанного раствора (п. 3.3.3). Предварительная обработка азотной кислотой проводится в герметично закрытом оборудовании с обратным холодильником, что исключает попадания оксидов азота в атмосферу, поэтому процесс является экологичным.

Отработанные растворы азотной кислоты нейтрализуют аммиаком с получением комбинированных лигногуминовых удобрений. Нейтрализуются как азотная кислота, так и образующиеся в процессе обработки сырья органические кислоты и углекислый газ. Минеральный азот представлен как аммонийной так и нитратной составляющими (п. 3.3.4).

Еще одним экологическим вопросом является промывка полученного пальпа от отработанного раствора азотной кислоты. Оптимизации по сокращению объемов промывной воды в рамках данной работы не проводилось в связи с невозможностью реализации поставленной задачи в условиях опытного производства. Нет сомнений, что эта задача может быть успешно решена, опираясь на опыт действующих целлюлозно-бумажных комбинатов.

3.3.6 Соответствие азотнокислого способа мировым критериям

В табл. 3.11 приведены критерии так называемой идеальной предобработки, при этом разработчики критериев подчеркивают, что идеальной предобработки не существует.

Таблица 3.11 – Критерии идеальной предобработки целлюлозосодержащего сырья и соответствие им азотнокислого способа

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

Азотнокислый способ соответствует 5,5 критериям из 7,0, что позволяет утверждать, что разработан новый эффективный способ предобработки легкового обновляемого целлюлозосодержащего сырья, который успешно может быть внедрён в промышленности. Потери гемицеллюлоз и связанный с этим относительно низкий выход субстрата (два пункта несоответствия критериям идеальности) не снижают ценности разработанного способа, так как образующийся побочный продукт – отработанный раствор азотной кислоты – планируется реализовывать как комбинированное лигногуминовое удобрение. Именно возможность коммерческой реализации всех продуктов трансформации целлюлозосодержащего сырья делают технологии его переработки промышленно реализуемыми [Padella, 2019].

3.4 Кинетика ферментативного гидролиза при различных концентрациях субстрата

Экспериментально была изучена кинетика ферментативного гидролиза в ацетатном буфере субстрата 1 (ПАО) из шелухи овса и из мискантуса при различных концентрациях субстрата. Повышение концентрации субстрата при ферментативном гидролизе целлюлозосодержащего сырья является важной технологической задачей.

Математические модели, описывающие кинетику процесса ферментативного гидролиза построены на основе модифицированного уравнения Михаэлиса-Ментен, предложенного Бриггсом и Холдейном [Варфоломеев, 2005]. Константы скоростей реакции определяли путем аппроксимации экспериментальных данных методом наименьших квадратов [Айвазян, 1983].

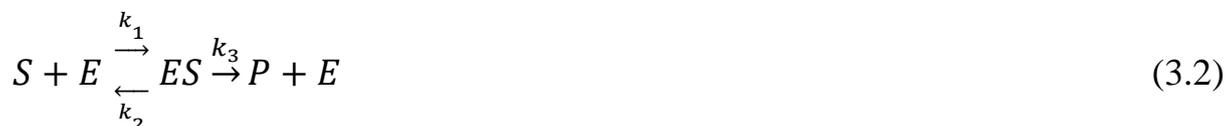
Зависимости концентрации и выхода РВ от начальной концентрации субстратов представлены в табл. 3.12. Для всех начальных концентраций субстратов получены высокие выходы РВ – от 55 до 98 %.

Таблица 3.12 – Зависимости концентрации и выхода РВ от начальной концентрации субстратов

Продолжительность гидролиза, ч	Начальная концентрация ПАО шелухи овса, г/л				Начальная концентрация ПАО мискантуса, г/л			
	33,3	60	90	120	33,3	60	90	120
	Концентрация РВ в гидролизате, г/л							
8	19,6	30,4	32,7	39,5	17,4	31,9	36,5	44,3
20	28,2	38,1	46,3	52,5	24,7	36,2	43,2	49,6
24	33,8	43,5	52,8	59,1	25,4	41,6	48,2	59,8
36	36,6	45,9	56,5	60,2	27,2	36,8	55,9	63,8
48	36,4	47,2	57,0	70,3	30,6	49,7	67,4	76,3
60	36,5	51,3	61,9	75,3	32,5	50,3	70,9	80,9
72	36,6	58,3	61,7	73,1	36,6	62,9	76,7	88,6
Выход РВ через 72 ч, % от массы субстрата	97,9	87,5	61,7	54,8	97,9	94,4	76,7	66,5

Согласно классической теории ферментативного катализа Михаэлиса-Ментен, получение конечного продукта (РВ) из субстрата проходит через образо-

вание фермент-субстратного комплекса ES. Реакция образования фермент-субстратного комплекса характеризуется константой скорости k_1 , реакция его распада – k_2 , реакция образования конечного продукта (P) – k_3 . Такой механизм описывается следующей схемой химической реакции:



где S – субстрат (ПАО); E – фермент; ES – фермент-субстратный комплекс; P – продукт (PB) [Варфоломеев, 2005].

Обозначив концентрации исходного и промежуточного веществ и продукта реакции (в пересчете на концентрацию PB) как C_S , C_{ES} и C_P можно записать систему уравнений, описывающую кинетику процесса ферментозиса. Уравнения, описывающие процесс ферментативного гидролиза ПАО шелухи овса и мискантуса, при их математической записи будут идентичными и отличаться только значениями коэффициентов k_1 , k_2 , k_3 и C_m (C_m – равновесная концентрация PB).

В начальный момент времени: $t=0$; $C_S=C_m$; $C_{ES}=C_P=0$.

Кинетические уравнения, описывающие превращения субстрата в PB, записываются следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{dC_S}{dt} &= -k_1 C_S + k_2 C_{ES} \\ \frac{dC_{ES}}{dt} &= k_1 C_S - (k_2 + k_3) C_{ES} \end{aligned} \quad (3.3)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = k_3 C_{ES}$$

Решением системы уравнений (3.3) являются выражения [Новый справочник... 2006]:

$$C_S = C_m \left\{ \frac{\lambda_2 - k_1^{-1} k_3}{\lambda_2 (\lambda_2 - \lambda_3)} \exp(-\lambda_2 k_1 t) + \frac{k_1^{-1} k_3 - \lambda_3}{\lambda_3 (\lambda_2 - \lambda_3)} \exp(-\lambda_3 k_1 t) \right\} \quad (3.4)$$

$$C_{ES} = \frac{C_m}{\lambda_2 - \lambda_3} [\exp(-\lambda_2 k_1 t) - \exp(-\lambda_3 k_1 t)], \quad (3.5)$$

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

Для построения математической модели необходимо определить величины C_m , k_1 , k_2 и k_3 . Коэффициенты скоростей реакций k_1 , k_2 и k_3 зависят от природы субстрата и от внешних условий (температуры, pH, условий перемешивания субстрата и др.), которые в наших экспериментах не изменялись. Поскольку в нашей работе фермент взят в избытке, данные коэффициенты не зависят от соотношения фермента и субстрата. Коэффициент C_m , кроме отмеченных факторов, зависит также и от концентрации субстрата. Поэтому при нахождении коэффициентов системы уравнений для обоих субстратов данные обстоятельства были учтены. При обработке экспериментальных данных уравнения (3.4) и (3.5) были объединены в выражение (3.6), описывающее изменение концентрации РВ:

$$C_P = C_m - (C_S + C_{ES}). \quad (3.6)$$

Выражение (3.6) использовалось в качестве аппроксимирующей функции, определяющей коэффициенты моделей для субстратов. Аппроксимация экспериментальных данных, представленных в таблице 3.12, выполнялась по уравнению (3.6) методом наименьших квадратов [Айвазян, 1983].

Из рассчитанных значений коэффициентов математических моделей определены константа диссоциации фермент-субстратного комплекса k_s (предложенная Михаэлисом и Ментен) и константа Михаэлиса k_m (предложенная Бриггсом и Холдейном) [Варфоломеев, 2005]:

$$k_s = k_2 / k_1; \quad (3.7)$$

$$k_m = k_s + k_3 / k_1 \quad (3.8)$$

Таблица 3.13 – Расчетные значения коэффициентов и констант математических моделей процесса ферментативного гидролиза

Начальная концентрация субстрата, г/л	ПАО шелухи овса				ПАО мискантуса			
	33,3	60	90	120	33,3	60	90	120
C_m , г/л	36,95	51,63	60,20	71,69	33,1	53,08	74,98	83,79
k_1 , ч ⁻¹	0,587				0,496			
k_2 , ч ⁻¹	3,346				4,939			
k_3 , ч ⁻¹	0,627				0,662			
k_s	5,700				9,958			
k_m	6,768				11,293			

Из представленных в таблице 3.13 данных следует, что с увеличением концентрации субстратов скорость нарастания равновесной концентрации РВ C_m , характеризующей конечную концентрацию РВ, для ПАО мискантуса больше, чем для ПАО шелухи овса. То есть, превращение субстрата ПАО мискантуса в РВ характеризуется более высоким выходом, чем ПАО шелухи овса.

Графическая интерпретация результатов численного моделирования в виде частных решений уравнения (3.6) с наложением на них экспериментальных точек представлена на рис. 3.9. Видно, что построенные по выражению (3.6) математические модели согласуются с экспериментальными данными. Адекватность моделей с учетом коэффициентов, приведенных в таблице 3.13, была подтверждена значениями критерия Фишера. Для моделей, описывающих ферментативный гидролиз ПАО ПОО и ПАО М, они составили:

$F_{\text{ПАО шелухи овса}} = 1,13 < F_{\text{табл}} = 19,46$ и $F_{\text{ПАО мискантуса}} = 3,77 < F_{\text{табл}} = 19,46$ при уровне значимости $\alpha = 0,05$. При этом дисперсии воспроизводимости моделей составили: $s^2_{\text{ПАО шелухи овса восп}} = 9,44$ и $s^2_{\text{ПАО мискантуса восп}} = 11,24$, при числах степеней свободы 2.

Дисперсии адекватности моделей составили $s^2_{\text{ПАО шелухи овса ад}} = 9,90$ и $s^2_{\text{ПАО мискантуса ад}} = 35,54$, при числах степеней свободы $f_{\text{ПАО шелухи овса ад}} = f_{\text{ПАО мискантуса ад}} = 26$ [Новый справочник... 2006].

Величины доверительных интервалов концентраций РВ для ПАО шелухи овса и ПАО мискантуса (при значении коэффициента Стьюдента $t(0,95; 3)$ равном 4,3) составляют 7,63 и 8,32 г/л соответственно.

Так как коэффициенты математической модели получены путем аппроксимации экспериментальных данных, то ограничениями по модели в обоих случаях являлись области исходной концентрации ПАО от 33 до 120 г/л и продолжительности процесса ферментализа от 0 до 72 ч.

Согласно математической модели, кинетику ферментализа можно представить в виде поля концентрации РВ в зависимости от времени и начальной концентрации субстратов. Графическое изображение такого поля концентраций РВ для обоих видов сырья представлено на рис. 3.10.

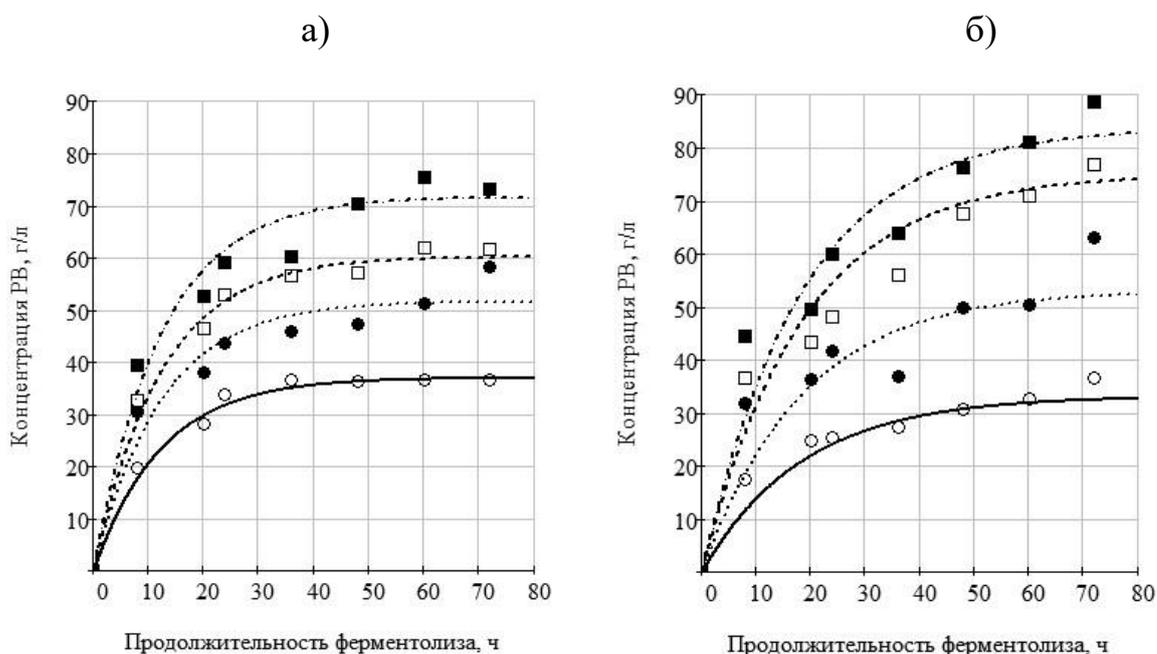


Рисунок 3.9 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности Ферментативного гидролиза для концентраций субстратов ПАО шелухи овса (а) и ПАО мискантуса (б), г/л: 33,3 (○), 60 (●), 90 (□), 120 (■).

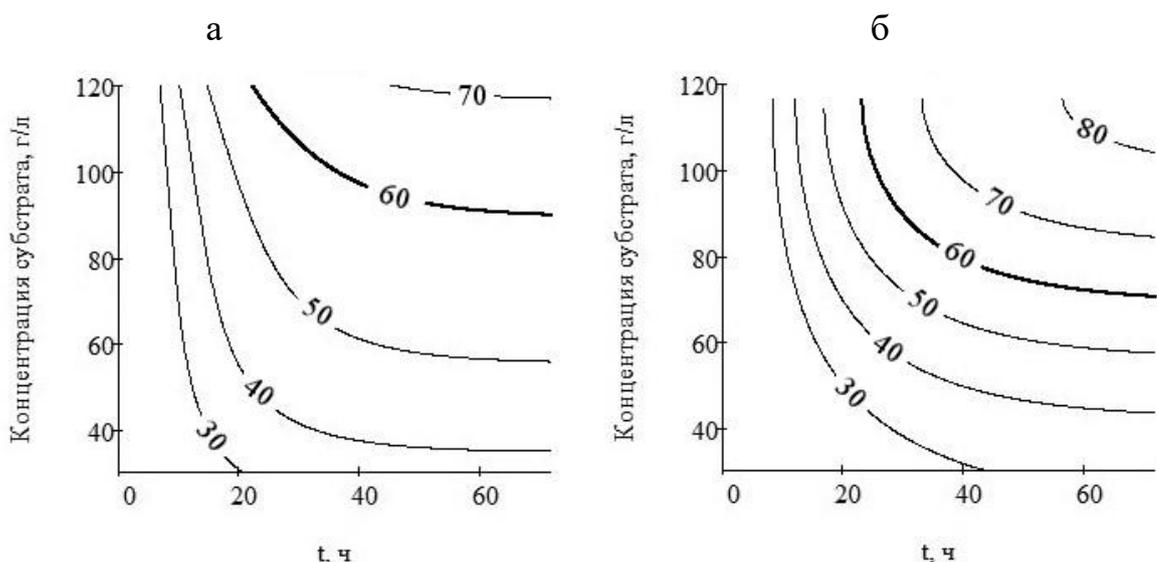


Рисунок 3.10. – Зависимости концентрации РВ от начальной концентрации субстратов и продолжительности процесса ферментативного гидролиза: а – для ПАО шелухи овса; б – для ПАО мискантуса

Из рис. 3.10 можно определить оптимальные условия получения требуемой концентрации РВ для каждого из исследованных видов сырья. За минимальный требуемый уровень концентрации РВ в гидролизатах принимали значение не ниже 60 г/л, которое необходимо для обеспечения достаточной концентрации

спирта при сбраживании РВ в биоэтанол. Например, концентрация субстрата ПАО шелухи овса 100 г/л позволяет получить гидролизат с концентрацией РВ 60 г/л через 40 ч. Из такого гидролизата при 100 %-ной конверсии РВ в этанол теоретически возможно получение бражки с крепостью 3,9 об. %.

Известно, что эффективность ферментативного гидролиза определяется двумя параметрами: начальной скоростью гидролиза и выходом РВ [Синицын, 1995]. Из результатов, представленных в таблице 3.13, следует, что отношение коэффициентов k_2 к k_1 (величина k_s) для ПАО шелухи овса почти в два раза ниже, чем для ПАО мискантуса (5,700 против 9,958). Величина k_s обратно пропорциональна скорости образования фермент-субстратного комплекса: чем больше k_s , тем медленнее происходит образование фермент-субстратного комплекса. Из полученных данных можно сделать вывод, что из ПАО шелухи овса будет значительно быстрее образовываться фермент-субстратный комплекс, следовательно, скорость образования РВ будет выше.

Скорость образования РВ зависит от величин k_3 и C_{ES} . При этом у фермент-субстратного комплекса, образованного с участием ПАО шелухи овса, величина k_3 сопоставима с аналогичной величиной для фермент-субстратного комплекса, образованного с участием ПАО мискантуса. Таким образом, скорость получения РВ в исследуемых процессах у ПАО шелухи овса будет выше, чем у ПАО мискантуса.

Графическое изображение зависимости начальных скоростей ферментативного гидролиза и выхода РВ от концентрации субстрата представлено на рис. 3.11. Из рис. 3.11, а следует, что начальная скорость ферментализа для ПАО шелухи овса на 1 г/(л•ч) выше, чем для ПАО мискантуса во всем рассмотренном диапазоне начальных концентраций субстратов – от 33,3 до 120,0 г/л.

Выход РВ существенно зависит от начальной концентрации субстратов (рис. 3.11, б). При низких значениях начальных концентраций выходы РВ для обоих субстратов близки. При начальной концентрации субстрата 120 г/л выход

РВ из ПАО мискантуса примерно на 20 % превышает аналогичный показатель для ПАО шелухи овса.

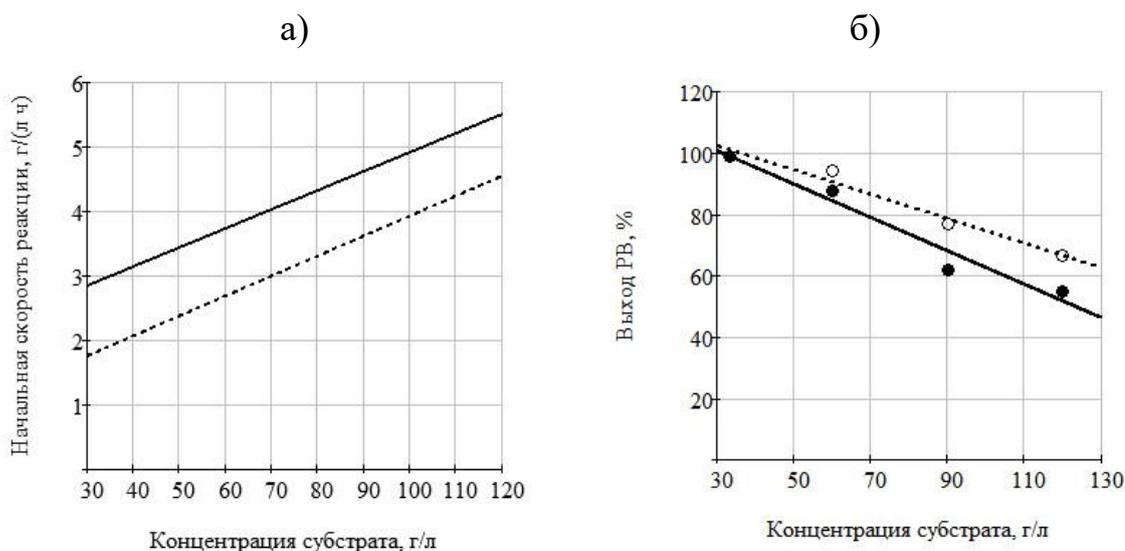


Рисунок 3.11 – Зависимость начальной скорости гидролиза (а) и выхода РВ (б) от концентрации субстрата: ПАО шелухи овса (1, ●), ПАО мискантуса (2, ○); линии – расчет, точки – эксперимент

Исследование кинетики ферментативного гидролиза целлюлозы является предметом многих научных работ [Синицын, 1995; Li, 2014; Ioelovich, 2012], но в данной работе это выполнено для субстратов, содержащих 11-14 % негидролизуемого компонента (лигнина). Показано, что увеличение концентрации субстратов с 33,3 г/л до 120 г/л приводит к снижению выхода РВ в 1,5–2 раза, что обусловлено субстратным ингибированием.

3.5 Оптимизация состава мультиэнзимной композиции

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

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 ± 2) °С, скорость перемешивания – 150

об/мин, продолжительность процесса – 72 ч. Процесс велся в конических колбах объемом 0,5 л с использованием горизонтального перемешивающего устройства ЭКРОС ПЭ-6410 с нагревом («Экохим», Россия).

Применено симплекс-центроидное планирование опытов для трехкомпонентного состава МЭК. МЭК рассматривалась как трехкомпонентная смесь ФП. При таком подходе содержание ФП в МЭК должно удовлетворять условию (3.9):

$$x_1 + x_2 + x_3 = 1, \quad (3.9)$$

где $x_1 = (X_1 - X_{1min}) / (X_{1max} - X_{1min})$, $x_2 = (X_2 - X_{2min}) / (X_{2max} - X_{2min})$, $x_3 = (X_3 - X_{3min}) / (X_{3max} - X_{3min})$ – относительные концентрации ФП «Целлолюкс-А», «Ультрафлю Коре» и «Брюзайм ВГХ» соответственно;

X_1, X_2, X_3 – концентрации ферментных препаратов «Целлолюкс-А», «Ультрафлю Коре» и «Брюзайм ВГХ» в составе МЭК, мг/г субстрата;

$$X_{1max} = 40 \text{ мг/г субстрата,}$$

$$X_{2max} = 100 \text{ мг/г субстрата,}$$

$X_{3max} = 200$ мг/г субстрата – максимальные концентрации ФП «Целлолюкс-А», «Ультрафлю Коре» и «Брюзайм ВГХ» в составе МЭК;

$X_{1min} = X_{2min} = X_{3min} = 0$ мг/г субстрата – минимальные концентрации ФП «Целлолюкс-А», «Ультрафлю Коре» и «Брюзайм ВГХ» в составе МЭК.

Оценка гидролитической способности МЭК велась по динамике накопления РВ в реакционной смеси (табл. 3.14). В результате численного моделирования на основе проведенных экспериментов зависимость концентрации РВ от состава МЭК описывается уравнением (3.10):

$$C = 23,1x_1 + 24,1x_2 + 14,2x_3 + 11,6x_1x_2 + 28,7x_1x_3 + 24,7x_2x_3, \quad (3.10)$$

где C – конечная концентрация РВ, г/л.

Расчет коэффициентов в выражении (3.2) осуществлялся по методике, изложенной в работе [Зедгенидзе, 1976]. 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 3.14. Адекватность предложенной зависимости была подтверждена по критерию Фи-

шера при уровне значимости 0,05. Графическое представление функции отклика S показано на рис. 3.12 в виде тернарного графика.

Таблица 3.14 – 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

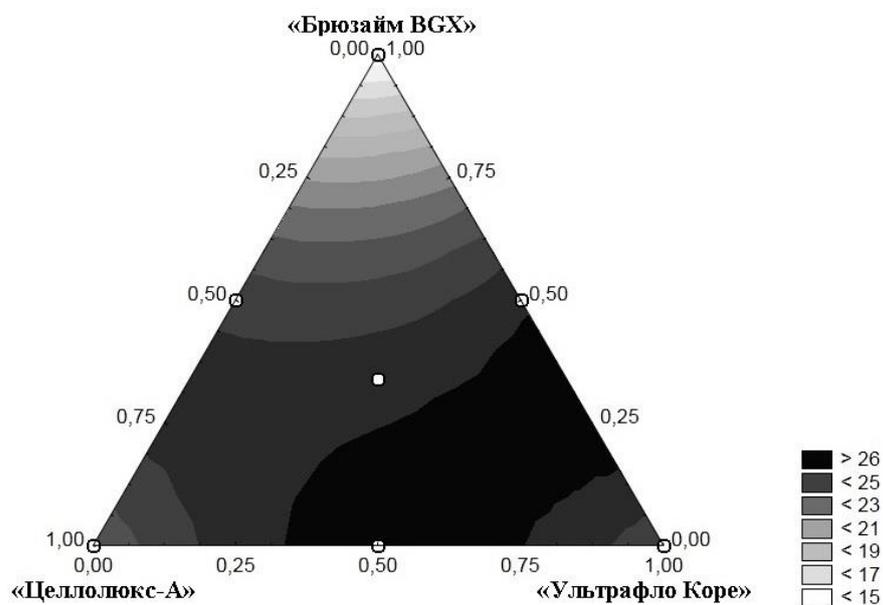


Рисунок 3.12 – Тернарный график влияния состава МЭК на концентрацию РВ (г/л)

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

При пересчёте на активности ферментных препаратов получим следующие значения. Для ФП «Целлолюкс-А»: целлюлазная активность – 36 ед. ЦлС/г, ксиланазная – 14 ед. КС/г, β-глюканазная – 27 ед. β-ГкС/г. Для ФП «Ультрафло Коре»: целлюлазная активность – 38 ед. ЦлС/г, β-глюканазная – 87 ед. β-ГкС/г. Совместно, в композиции этих двух ФП: целлюлазная активность – 74 ед. ЦлС/г, ксиланазная – 14 ед. КС/г, β-глюканазная – 114 ед. β-ГкС/г.

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.

3.6 Исследование побочных продуктов ферментативного гидролиза

На стадии ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья образуется производственный отход. Это твердый остаток, представляющий собой смесь лигнина, негидролизованых полисахаридов и минеральных веществ, свойства которого мало изучены [Wattanasiriwech, 2010]. В п.3.5 целью является исследование состава неорганических компонентов шелухи овса и продуктов её химической и ферментативной трансформации.

Аморфный диоксид кремния (кремнезём) широко используется в разных отраслях промышленности в зависимости от характеристики продукта [Айлер,

1992; Чукин, 2008], главным образом его получают из минерального сырья, переработка которого связана с большими затратами на подготовку сырья и очистку от сопутствующих примесей. Возобновляемым сырьем для производства аморфного кремнезема высокой чистоты могут служить кремнефильные растения, к которым относятся, в частности, такие злаковые культуры, как рис и овес, и их многотоннажные отходы (солома, лузга или шелуха) [Сергиенко, 2004; Земнухова, 2009; Земнухова, 2014; Sun, 2010]. Полученные из растений кремнийсодержащие продукты различаются в зависимости от сырья и способа извлечения содержанием основного вещества (SiO_2) и примесей, размером частиц, удельной поверхностью, объёмом пор и другими характеристиками [Земнухова, 2009; Земнухова, 2014].

Ферментативную трансформацию продукта азотнокислой обработки шелухи овса проводили в ферментёре авторской конструкции объёмом 11 л. Через 48 ч ферментативный гидролизат отфильтровывали от осадка, осадок отмывали от остатков сахаров и красящих веществ дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

В работе представлены три объекта исследования, представляющих собой золы, полученные сжиганием воздушно-сухих навесок образцов шелухи овса, продукта её азотнокислой обработки и твёрдого остатка, остающегося после ферментативной трансформации продукта азотнокислой обработки шелухи овса в раствор сахаров. Сжигание проводилось в три этапа. На первом этапе образец обугливался на воздухе в кварцевой чашке для удаления летучих компонентов; на втором нагревался в муфельной печи 10 мин и далее обжигался при $600\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 4 ч; на третьем этапе образец нагревался в течение 1 ч до $800\text{ }^\circ\text{C}$ и далее обжигался при $800\text{ }^\circ\text{C}$ 2 ч. В результате озоления получены три образца золы с выходами 4.93%; 5.35% и 58.16% от навесок вышеуказанных образцов соответственно: А – зола шелухи овса; Б – зола продукта азотнокислой обработки шелухи овса; В – зола твёрдого остатка после ферментативного гидролиза продукта азотнокислой обработки шелухи овса.

Элементный анализ образцов золы, высушенных при 105 °С, выполняли методом энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного анализа (ЭД РФЛА) по стандартной методике, спектрометр Shimadzu EDX 800 HS (Япония); концентрацию элементов рассчитывали по методу фундаментальных параметров. ИК спектры поглощения образцов в вазелиновом масле регистрировали в области 400–4000 см⁻¹ с использованием Фурье-спектрометра Shimadzu FTIR Prestige-21 (Япония), точность определения частоты ±1 см⁻¹. Рентгенофазовый анализ (РФА) выполняли на рентгеновском дифрактометре ДРОН-2.0 в Cu K_α-излучении с использованием программы EVA с банком порошковых данных PDF-2. Образцы золы при съемке ИК спектров и рентгенограмм не подвергались сушке.

Результаты исследования элементного состава (в пересчете на оксиды) образцов золы из шелухи овса, высушенной при 105 °С, приведены в табл. 3.15.

Анализ результатов показывает, что ряды накопления элементов в образцах А-В распределились следующим образом:

А: **Si >>> K >> Ca>Mg > P, S > Fe > Mn > Zn, Cu, Cr, Sr, Rb, Na;**

Б: **Si >>> Ca >> Fe, S, Mg > K, Zn, Mn, > Cr, Ti, Cu, Sr, Ni, Na;**

В: **Si >>>Ca, S >Fe, K, P > Zn, Cu, Mn, Cr, Sr, Na.**

Основным элементом в исследованных образцах является кремний. Кроме перечисленных в табл. 3.15 элементов, в образцах золы (А, Б и В) присутствуют следовые количества (< 0,005 %) натрия и стронция, а в образце А – рубидия и брома. Особенностью золы исходной шелухи овса (образец А), отмеченной также в работе [Земнухова, 2009], является высокое содержание калия. Токсичные элементы в этом образце (Pb, As, Cd, Hg) не обнаружены, что свидетельствует о потенциальной пригодности использования сырья в пищевой и фармацевтической промышленности.

Минеральный состав сырья существенно изменяется в процессе технологических обработок. При азотнокислой обработке из шелухи овса извлекаются в раствор водорастворимые компоненты, в первую очередь, соединения калия (табл. 3.15). Повышение содержания железа и хрома в образце Б, а также появление никеля можно объяснить их переходом из технологического оборудования.

Кроме того, в образце Б по сравнению с образцом А содержание Si возрастает на 3.4% (42.1% против 38.7%), однако общая зольность увеличивается незначительно: 5.4% против 4.9%. Зольность твердого остатка после ферментативного гидролиза (образец В) возрастает в 12 раз по сравнению с сырьём (до 58.16%), при этом доля Si в образце золы увеличивается до 45.7%, а доля примесных элементов снижается.

Таблица 3.15– Элементный состав образцов золы, полученной из шелухи овса (А) и продуктов ее переработки (Б, В), % масс.

Состав	Образец		
	А	Б	В
Si (SiO ₂)	71,05 (84,42)	80,57 (90,43)	95,35 (98,34)
K (K ₂ O)	14,13 (6,32)	0,50 (0,21)	0,17 (0,06)
Ca (CaO)	6,15 (2,90)	13,49 (6,37)	1,65 (0,66)
Mg (MgO)	3,74 (4,39)	1,17 (1,30)	н/о*
P	2,17	<0,01	<0,01
S	2,15	1,64	1,54
Fe (Fe ₂ O ₃)	0,30 (0,14)	2,19 (0,94)	0,98 (0,38)
Mn (MnO)	0,15 (0,06)	0,12 (0,05)	0,04 (0,01)
Zn (ZnO)	0,07 (0,03)	0,13 (0,04)	0,06 (0,02)
Cu	0,04	0,04	0,05
Cr	0,02	0,07	0,04

Примечания: в скобках приведен пересчёт на соответствующий оксид; н/о – не обнаружено.

Основным неорганическим веществом во всех образцах является, по данным элементного анализа (табл. 3.15) и ИК спектроскопии (рис. 3.13), диоксид кремния. Отнесение полос поглощения проведено в соответствии с [Власов, 1972; Osana, 1982; Osana, 1987]. Все спектры содержат полосы поглощения, отвечающие колебаниям силоксановых связей Si–O–Si: деформационным (область 466–474 см⁻¹), валентным симметричным (область 790–799 см⁻¹) и асимметричным (область 1097–1105 см⁻¹). Полосы в области около 1640 и 3600–3200 см⁻¹ принадлежат деформационным и валентным колебаниям ОН-групп воды соответственно. Данные ИК спектроскопии (рис. 3.13) указывают на отсутствие в исследуемых образцах золы силикатов, для которых характерны колебания силоксановых связей в более низкочастотной области (1005–1018 и 419–455 см⁻¹).

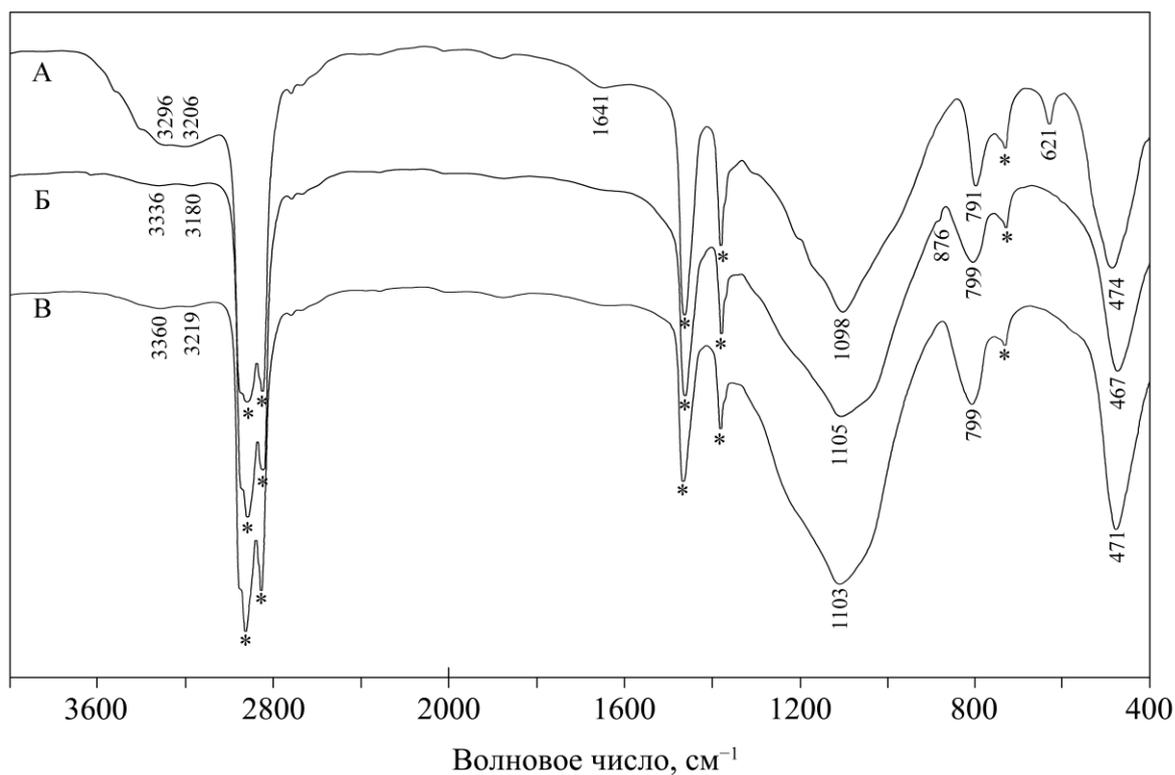


Рисунок 3.13 – ИК спектры поглощения: А) зола шелухи овса; Б) зола продукта азотнокислой обработки шелухи овса; В) зола твердого остатка после ферментативного гидролиза продукта азотнокислой обработки шелухи овса

Вместе с тем, в ИК спектрах (рис. 3.13) наблюдается ряд отличий, по которым образцы можно разделить на две группы. К первой группе относится зола шелухи овса, ИК спектр которой имеет, кроме полос поглощения силоксановых связей Si–O–Si, находящихся в диоксиде кремния, полосу при 621 см^{-1} , характерную для кристаллических форм [Ocana, 1987]. Ко второй группе относятся образцы Б и В, характеризующиеся аморфной структурой диоксида кремния [Власов, 1972; Ocana, 1982]. Силанольные связи Si–OH в образцах Б и В практически отсутствуют, поскольку в ИК спектрах этих продуктов отсутствует характерная полоса при $\sim 964\text{ см}^{-1}$. Аналогичные ИК спектры имеют образцы аморфного диоксида кремния, полученные из отходов производства риса и овса, исследованные ранее в [Земнухова, 2009; Земнухова, 2014]. Между собой образцы Б и В отличаются шириной линии в области валентных асимметричных колебаний силоксановых связей, указывая на меньший набор энергетически неравноценных связей

Si–O–Si в образце В, что свидетельствует о более упорядоченной структуре данного образца.

На рис. 3.14, 3.15 приведены рентгенограммы исследованных образцов. Их анализ показывает, что диоксид кремния в золе шелухи овса (рис. 3.14) находится в кристаллическом состоянии в виде двух фаз: крестобалита и тридимита. Известно, что степень кристалличности биогенного кремнезёма зависит как от температуры прокаливании, так и от количества примесей катионов металлов, особенно K^+ , которые могут катализировать плавление диоксида кремния [Wang, 2012]. Эти данные коррелируют с результатами элементного анализа (табл. 3.15) и согласуются с исследованиями, проведёнными ранее, когда было показано, что диоксид кремния в золе, полученной из шелухи овса при $650\text{ }^\circ\text{C}$, находится в аморфном состоянии, а прокалывание золы при $1000\text{ }^\circ\text{C}$ приводит к образованию кремнезёма в форме крестобалита [Земнухова, 2014].

В золе образцов Б и В (рис. 3.15), в отличие от шелухи овса, диоксид кремния – рентгеноаморфен, так как дифрактограммы образцов имеют характерный для аморфного состояния вид с широким максимумом в области $2\theta \approx 22^\circ$, что соответствует межплоскостному расстоянию 4.11 \AA .

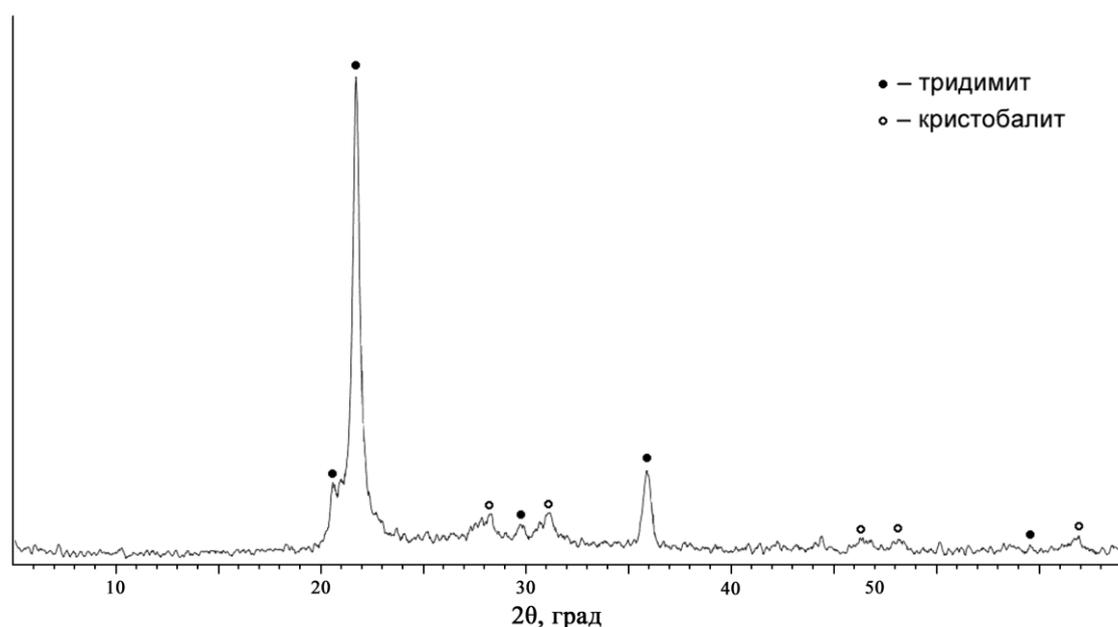


Рисунок 3.14 – Рентгенограмма золы шелухи овса

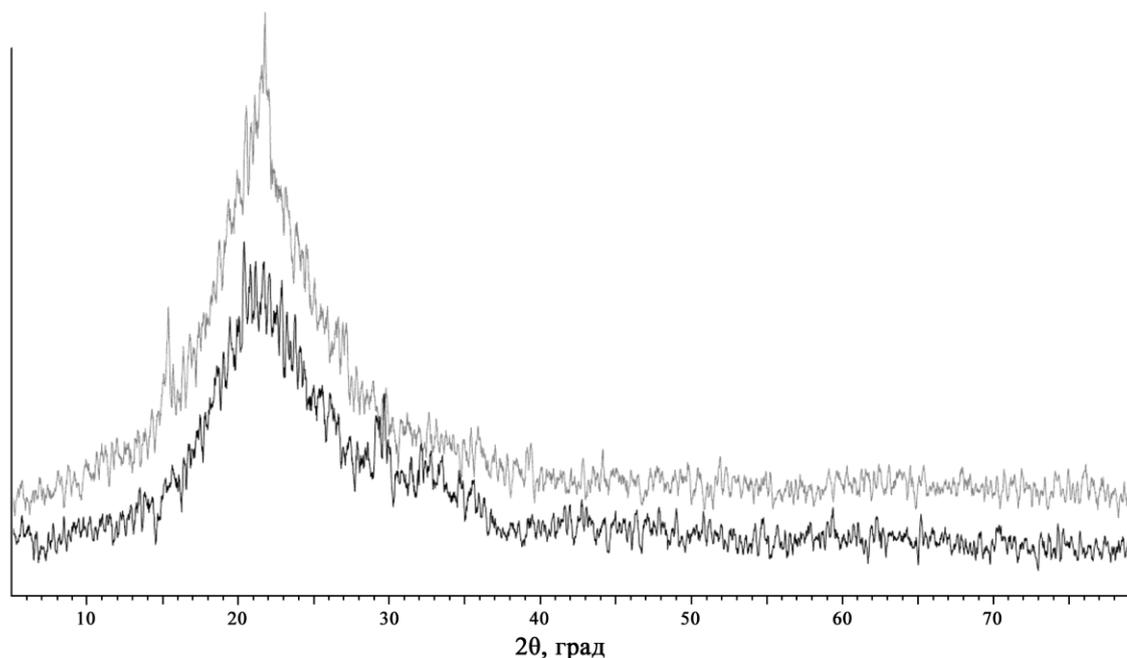


Рисунок 3. 15– Рентгенограммы золы образцов Б и В
(верхняя линия – образец В, нижняя линия – образец Б)

Воздействие азотной кислоты на неорганические компоненты шелухи овса можно рассматривать как типичное: продукт азотнокислой обработки шелухи овса имеет несколько большую зольность, чем исходная шелуха, что обусловлено минерализацией сырья под действием кислоты, при этом диоксид кремния выделяется при озолении в аморфном состоянии. Полученные данные хорошо коррелируют с литературными, касающимися обработки шелухи овса разбавленным раствором соляной кислоты [Земнухова, 2009].

Ферментативный гидролиз приводит к деструкции целлюлозы до глюкозы, а гемицеллюлоз – до смеси гексоз и пентоз, то есть касается только углеводных полимеров сырья, при этом лигнин и лигниноподобные вещества не гидролизуются, однако небольшая часть водорастворимых лигнинов может переходить в раствор при гидролизе полисахаридов. Минеральные компоненты не гидролизуются, поэтому в процессе ферментативного гидролиза зольность твёрдого остатка повышается в 10 раз и возрастает чистота аморфного диоксида кремния. Таким образом, твердый остаток, образующийся в процессе ферментативного гидролиза продукта азотнокислой обработки шелухи овса, может быть успешно использован для извлечения из него биогенного кремнезема. Вопрос влияния на процесс фер-

ментативного гидролиза кремнийорганических соединений, их качественного и количественного состава, изменений в процессе технологической переработки сырья, должен быть рассмотрен подробнее. Это не только улучшит понимание ферментативной трансформации целлюлозосодержащего сырья, но позволит использовать сырьё комплексно.

При масштабировании процесса ферментативного гидролиза продукта азотнокислой обработки в емкостном оборудовании объёмом 63 л, выход редуцирующих веществ составляет 87,5 % от массы субстрата (при концентрации субстрата 60 г/л), при этом выход твердого осадка достигает 12 % от массы субстрата в пересчёте на абсолютно сухое вещество. Учитывая, что на 58 % твердый остаток состоит из золы, а зола на 98 % – из аморфного диоксида кремния, этот источник выделения аморфного диоксида кремния следует считать перспективным. В представленной технологической схеме выход аморфного диоксида кремния из 1 т шелухи овса может достигать 17,4 кг (при выходе биоэтанола 16,2 дал). Применительно к технологии бактериальной целлюлозы, масштабирование ферментативного гидролиза будет ещё более рентабельно, поскольку, в отличие от биоэтанола, не требуются высокие концентрации редуцирующих веществ в ферментативных гидролизатах. Это связано с тем, что продуцент бактериальной целлюлозы *Medusomyces gisevii* показывает максимальную продуктивность при концентрации глюкозы в среде от 20 г/л до 25 г/л. Таким образом, концентрация субстрата может быть снижена до 33,3 г/л, при этом выход редуцирующих веществ повысится до 97,9 % от массы субстрата, а твердый остаток, вследствие более полного гидролиза полисахаридов, будет содержать больше диоксида кремния.

Изменения, происходящие с шелухой овса в процессе химической и ферментативной трансформации исследованы методом РЭМ. На рис. 3.16 представлены микрофотографии шелухи овса, продуктов её переработки и их зол. Поверхность шелухи овса ровная, волокна расположены рядами, с внешней стороны волокна застёгнуты в замок (рис. 3.16, а). Такая структура распространена в природе, позднее, имитируя её, был изготовлен замок-молния, сейчас широко исполь-

зубный в отделке одежды. Примечательно, что структура замка-молнии сохраняется после озоления шелухи овса (рис. 3.16, б).

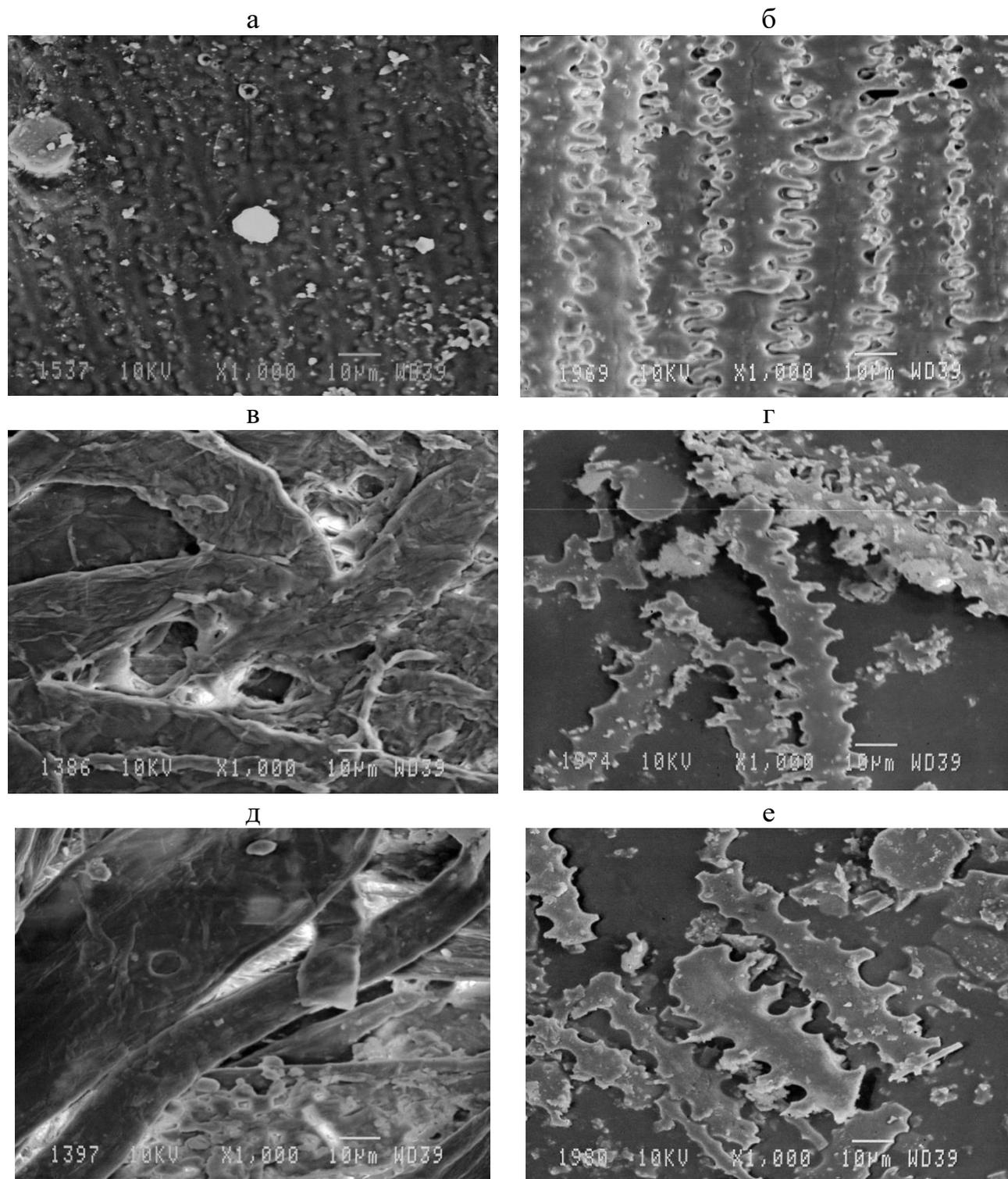


Рисунок 3.16 – Шелуха овса и продукты её переработки, РЭМ, $\times 1000$
а – нативная шелуха овса, внешняя поверхность, б – её зола;
в – продукт азотнокислой обработки шелухи овса; г – его зола;
д – твердый остаток после ферментативного гидролиза
продукта азотнокислой обработки шелухи овса, е – его зола

Продукт азотнокислой обработки шелухи овса имеет более развитую поверхность, чем нативная шелуха. Основная часть продукта представлена рыхлой массой, не сохранившей исходного строения (рис. 3.16, в), это объясняется химическими преобразованиями исходной матрицы сырья. Малая часть волокон продукта азотнокислой обработки шелухи овса представлена «гребёнками», представляющими собой половинки замков-молний, наблюдаемых в сырье (фото не приводится). В золе продукта азотнокислой обработки шелухи овса наблюдаются плоские «гребёнки» размером (10-20) мкм × (40-90) мкм, аналогичные «гребёнкам» в нём до озоления, а также наблюдаются диски диаметром около 10-15 мкм (рис.3.16, г).

Твердый остаток после ферментативного гидролиза продукта азотнокислой обработки шелухи овса сфотографирован спустя 2 суток ферментативного гидролиза. Наблюдается уменьшение волокон в размерах. Доля «гребёнок» увеличивается. «Гребёнки» отчётливо видны в золе, причём есть широкие «гребёнки» размером (10-20) мкм × (40-60) мкм и узкие «гребёнки» размером (2-4) мкм × (20-40) мкм, также наблюдаются диски диаметром около 10-15 мкм. Таким образом, именно «гребёнки» образованы кремниевыми структурами и отвечают за прочность шелухи овса. Сравнение образцов золы исходного сырья и остатка после ферментативного гидролиза (рис. 3.16 б и е) свидетельствует об абсолютном сходстве структурных элементов «гребёнок», которые в последнем случае находятся в разъединённом состоянии.

Следует отметить, что возможность представленной в данной работе визуализации методом РЭМ процессов химической и ферментативной трансформации шелухи овса обусловлена уникальной морфологией этого вида лигноцеллюлозного сырья, представляющего собой тонкие пластины с размерами в узких диапазонах длины и ширины. Эти пластины образуются в колосе овса очень быстро, в течение двух-трех месяцев, вокруг формирующегося зерна и выполняют исключительно защитные функции. Можно предположить, что подобная картина наблюдается при ферментативном гидролизе плодовых оболочек других видов растений

(риса, подсолнечника и др.), но не соломы растения или биомассы, представляющей собой смесь различных вегетативных частей растения.

Таким образом, получены кремнийсодержащие образцы золы из шелухи овса и продуктов ее химической обработки с использованием азотной кислоты и последующего ферментативного гидролиза в производственном цикле получения бактериальной наноцеллюлозы. Основным веществом в образцах золы является диоксид кремния, состояние (кристаллическое или аморфное) и содержание которого (83–98%) зависят от условий извлечения. Наиболее чистым является аморфный кремнезем в остатке, образующемся после ферментативной трансформации продукта азотнокислой обработки шелухи овса. Твердый остаток после ферментативного гидролиза имеет зольность 58 %, а зола на 98 % состоит из аморфного диоксида кремния. Таким образом, реализованный в промышленных масштабах ферментативный гидролиз шелухи овса можно считать альтернативным способом получения аморфного диоксида кремния.

ГЛАВА 4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ БИОЭТАНОЛА НА СРЕДАХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ

4.1 Спиртовое брожение в зависимости от способа предварительной химической обработки сырья

Основные показатели брожения ферментативных гидролизатов четырех видов субстратов, полученных из двух видов сырья приведены в табл. 4.1.

Таблица 4.1 – Спиртовое брожение в зависимости от способа предварительной химической обработки двух видов сырья

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

Анализ зависимости выхода биоэтанола от способа предобработки сырья проведём на примере субстратов из шелухи овса. По выходу РВ в результате ферментативного гидролиза субстраты в порядке убывания можно расположить в ряд: 4≥1>2>3. Это хорошо коррелирует с тестовым ферментативным гидролизом в среде ацетатного буфера при концентрации субстратов 33,3 г/л описанном в

п. 3.2. Отличием является существенное снижение выхода РВ с 83,4-74,3% (для концентрации субстратов 33,3 г/л) до 50,0-41,6 % (для концентрации субстратов 60 г/л). При повышении концентрации субстрата снижение выхода РВ неизбежно, что можно объяснить следующими факторами: явлением субстратного ингибирования, проявляющегося индивидуально для разных видов сырья и типов его предварительной обработки; трудностью массопереноса целлюлолитических ферментов в высоковязкой суспензии субстрата, необратимой адсорбцией ферментов на поверхности субстратов, ингибирующим эффектом образующихся сахаров [Hu, 2012; Ioelovich, 2011; Zhiying, 2012]. Кроме того, при гидролизе в водной среде для последующего сбрасывания рН корректировался вручную с помощью растворов фосфорной кислоты и гидроксида аммония, что обусловило нестабильность буферной системы, а колебания рН весьма чувствительны для используемой мультиэнзимной композиции.

По крепости бражек субстраты в порядке убывания можно расположить в ряд: 4=3>1>2. Это вполне закономерно, так как субстраты 3 и 4 получены двухстадийно и являются химически чистыми, поэтому в них нет технологически вредных веществ, снижающих биологическую доброкачественность гидролизатов. Однако, крепость бражки зависит не только от биологической доброкачественности данного субстрата, но и от выхода РВ на предшествующей стадии ферментативного гидролиза. Поэтому более показательным является сравнение субстратов не по крепости бражек, а по выходу биоэтанола от концентрации РВ. В этом случае абсолютно чётко прослеживается зависимость эффективности брожения от химической чистоты субстрата: чем она выше, тем выше выход биоэтанола и, таким образом, 3>4>1>2. То есть субстрат 3 плохо гидролизуется, но это компенсируется высоким выходом биоэтанола от концентрации РВ на стадии брожения, таким образом, крепости бражек для субстратов 3 и 4 равны.

Наименьшая крепость бражки получена при использовании в качестве субстрата продукта щелочной делигнификации (субстрат 2). Это объясняется несколькими причинами:

– сложностью химического состава данного субстрата;

- необратимой адсорбцией ферментов на поверхности субстратов [Zhiying, 2012], при этом известно, что данные субстраты, полученные методом щелочной делигнификации, отличаются более развитой поверхностью [Hu, 2012];
- трудностью массопереноса целлюлолитических ферментов в высоковязкой суспензии субстрата: шелуха овса всегда даёт вязкие субстраты, это усугубляется способом предобработки;
- неполным гидролизом целлюлозы и гемицеллюлоз;
- наличием в гидролизате пентозанов, не усваиваемых сахаромикетами;
- наличием в гидролизате ионов натрия [Mosier, 2005].

Таким образом, определения реакционной способности субстрата к ферментативному гидролизу при низкой концентрации субстрата недостаточно для прогнозирования выхода биоэтанола. Важнейшим критерием является проведение процесса в водной среде и при высокой концентрации субстрата.

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

Аналогичный ряд получен и для субстратов из мискантуса. Таким образом, наиболее эффективным способом предобработки сырья следует считать одностадийную азотнокислую обработку.

Сравнивая субстраты из мискантуса и шелухи овса можно отметить, что в водной среде ферментативный гидролиз субстратов из шелухи овса прошел несколько эффективнее, чем гидролиз субстратов из мискантуса, хотя по сумме гидролизуемых компонентов в субстратах лидировал мискантус (что совпадает с результатом ферментативного гидролиза всех субстратов в ацетатном буфере). В итоге и выход биоэтанола из субстратов, полученных из шелухи овса выше, чем выход биоэтанола из субстратов, полученных из мискантуса на 10-26 %. Здесь есть три версии объяснения: 1) жирно-восковая фракция мискантуса, предназначением которой в природе является защита травы от гниения, оказывает слабое ин-

гибирующее воздействие и на ферментативный гидролиз, и на спиртовое брожение; 2) целлюлоза мискантуса более устойчива к действию ферментных препаратов; 3) совокупное воздействие этих двух факторов, объясняющее устойчивость мискантуса.

В табл. 4.2 приведены качественные показатели полученных образцов биоэтанола. Последовательность выхода обнаруженных в образцах биоэтанола веществ на хроматограммах (не приводятся) соответствует действующей нормативной документации: этиловый эфир, уксусный альдегид, ацетон, метилацетат, этилацетат, метанол, 2-пропанол, этанол, 2-бутанол, 1-пропанол, кротоальдегид, изобутиловый спирт, 1-бутанол, изоамиловый спирт, 1-пентанол, 1-гексанол. Присутствие в следовых количествах ацетона, 2-бутанола и кротоальдегида идентифицирует этанол как непищевой [ГОСТ Р 51786-2001].

Таблица 4.2 – Качественные показатели биоэтанола-сырца в зависимости от способа предварительной химической обработки двух видов сырья

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

Состав примесей этанола позволяет достоверно установить его происхождение и качество. В технологии спирта по составу летучих примесей можно идентифицировать сырьё, из которого он получен [Яровенко, 1981; Яровенко, 2002], а

также установить его качество [Абрамова, 2018; Медриш, 2015; Медриш, 2018; Шелехова, 2022].

Биоэтанол из шелухи овса имеет менее резкий запах, чем спирт из мискантуса, в нем ощущается запах зерна и хлеба, он мягкий, в небольших концентрациях приятный. Хотя в целом, в биоэтаноле-сырце из шелухи овса примесей больше, чем в биоэтаноле-сырце из мискантуса. Биоэтанол из мискантуса имеет резкий кислый запах.

Содержание примесей зависит не только от вида сырья, но от качества сырья и технологических режимов получения спирта [Стабников, 1969]. В нашем случае качество сырья не менялось, все отличия обусловлены разницей в технологических режимах.

Альдегиды – характерная для спирта примесь. Основным альдегидом является уксусный, он является промежуточным продуктом спиртового брожения [Стабников, 1969]. В биоэтаноле, полученном из шелухи овса предобработкой в одну стадию (субстраты 1 и 2) альдегидов больше в 2,8-4,7 раз, чем в биоэтаноле из мискантуса. При получении субстратов в 2 стадии (субстраты 3 и 4) примесей меньше в 1,5-7,6 раза, чем при получении субстратов в одну стадию, а разница между шелухой овса и мискантуса нивелируется. То есть, чем более чистый использовался субстрат, тем меньше примесей в образующемся биоэтаноле.

Эфиры являются продуктом взаимодействия спиртов и кислот [Стабников, 1969]. В опытных образцах они варьируют в широких пределах. Для обоих видов сырья самым химически «грязным» является субстрат 2 (щелочная предобработка), в образцах биоэтанола, полученных из субстрата 2, количество эфиров выше в 2-3 раза, чем в остальных образцах биоэтанола.

Сивушные масла являются основной примесью для любого спирта. Главный биохимический способ их появления в биоэтаноле – это трансформация аминокислот [Яровенко, 2002]. Корреляции от вида сырья и способа предобработки не прослеживаются.

Метиловый спирт образуется главным образом из пектиновых веществ [Яровенко, 1999]. Наличие значительных примесей метанола позволяет устано-

вить, что для его получения использовано непищевое сырьё. В сульфитном спирте-сырце содержание метанола может достигать 2-8 % [Шарков, 1973]. Наличие таких значительных количеств метанола обусловлено и происхождением сырья и жёсткими технологическими режимами его переработки.

В образцах биоэтанола из мискантуса метанола больше, чем в образцах биоэтанола из шелухи овса в 1,7-2,3 раза, но при этом доля метанола в образцах из обоих видов сырья крайне низкая. Это объясняется тем, что использовалось не содержащее пектин сырьё, мягкие технологические режимы предобработки сырья (атмосферное давление, температура 94-96 °С) и, главное, ферментативный гидролиз на стадии превращения целлюлозы и гемицеллюлоз в раствор сахаров.

Сравним качество биоэтанола-сырца опытных образцов с ГОСТИрованными показателями для пищевого и непищевого сырья (табл. 4.3).

Таблица 4.3 – Содержание примесей в этиловом спирте из пищевого и непищевого сырья

Показатель	Этиловый спирт-сырец из пищевого сырья		Этиловый спирт технический	
	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/дм ³	< 300	< 500	< 200	< 350
Массовая концентрация эфиров, в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³	< 500	< 700	< 80	< 180
Массовая концентрация сивушного масла, в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³	< 5000	< 5000	< 500	< 1000
Содержание метанола в пересчёте на безводный спирт, % об.	< 0,13	–	< 0,1	< 0,1
Объёмная доля этанола, % об.	88,0	88,0	95,0	94,0

Высокие значения альдегидо-эфирной фракции для опытных образцов (до 7100 мг/дм³ содержание альдегидов, что в 14,2 раза превышает норму для спирта-сырца из мелассы и до 3300 мг/дм³ содержание эфиров, что в 4,7 раз превышает норму для спирта-сырца из мелассы) можно объяснить наличием в гидролизатах

неблагоприятных примесей, отрицательно влияющих на жизнедеятельность дрожжей. Это совпадает с данными, полученными при переработке некондиционного пищевого сырья: количество примесей в таких образцах спирта резко возросло [Стабников, 1969]. Массовая концентрация сивушного масла в опытных образцах биоэтанола ниже, чем в спирте-сырце из пищевого сырья (от 1700 мг/дм³ до 4600 мг/дм³ против 5000 мг/дм³), это объясняется отсутствием белков и пептидов в осаждаемых субстратах. Во всех опытных образцах биоэтанола содержание метанола аномально низкое: не более 0,005 об. %, что значительно ниже аналогичного показателя для этилового спирта-сырца из пищевого сырья (менее 0,13 об. %) и спирта этилового технического (менее 0,1 об. %), то есть ниже в 26 раз и в 20 раз соответственно. Таким образом, из непищевого сырья получен высококачественный биоэтанол, в котором отсутствует основная маркерная примесь технического спирта – метанол. Это облегчит ректификацию биоэтанол-сырца, так как альдегидо-эфирная фракция и фракция сивушных масел удаляются легко, а метанол относится к самым сложноудаляемым конечным примесям [Яровенко, 1999].

4.2 Совмещение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения

В табл. 4.4 приведены результаты совмещения биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения. Для всех вариантов предобработки для обоих видов сырья совмещение биокаталитических стадий привело к повышению крепости бражки. Таким образом, гипотеза о целесообразности совмещения биокаталитических стадий подтверждена, несмотря на различие температурных оптимумов на стадиях ферментативного гидролиза (48 ± 1 °C) и спиртового брожения (28 ± 1 °C).

Рассмотрим результат совмещения биокаталитических стадий детальнее на примере субстрата, полученного одностадийной обработкой шелухи овса гидроксидом натрия (субстрат 2), так как его трансформация представляется самой

Таблица 4.4 – Спиртовое брожение при совмещении биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения

Показатели	Субстраты			
	1	2	3	4
Шелуха овса				
Крепость бражки, об. %	2,3±0,05	2,1±0,05	2,5±0,05	2,5±0,05
Концентрация остаточных РВ, г/л	6,5±0,1	5,8±0,1	2,2±0,1	4,8±0,1
Выход биоэтанола, % от массы субстрата	53,3±0,3	48,8±0,3	58,2±0,3	58,2±0,3
Выход биоэтанола из 1 т сырья, дал	19,3±0,1	18,7±0,1	12,8±0,1	17,8±0,1
Мискантус				
Крепость бражки, об. %	2,1±0,05	1,9±0,05	1,7±0,05	2,0±0,05
Концентрация остаточных РВ, г/л	6,5±0,1	5,3±0,1	1,8±0,1	4,1±0,1
Выход биоэтанола, % от массы субстрата	48,8±0,3	44,2±0,3	39,5±0,3	46,5±0,3
Выход биоэтанола из 1 т сырья, дал	18,4±0,1	17,5±0,1	9,7±0,1	16,0±0,1

сложной в силу сложности его химического состава и наличия примесей. При совмещенном проведении биокаталитических стадий выход РВ на стадии гидролиза посчитать нельзя, так как РВ, не достигнув максимального значения, начинают расходоваться на синтез биоэтанола. Остаточная концентрация РВ в бражке при совмещении биокаталитических стадий составила 8,6 г/л, при последовательном проведении – 12,1 г/л (рис. 4.1). Выход биоэтанола при совмещении биокаталитических стадий повышается на 0,3 об. % т.е. на 16,7 %. При совмещении биокаталитических стадий общая продолжительность процесса сокращается в 1,5 раза и исключается стадия фильтрации ферментативного гидролизата, кроме того, при проведении процесса в нестерильных условиях снижается риск контаминации питательной среды.

Большинство мировых данных совпадает с приведенными, однако приводятся и обратные результаты, что, с одной стороны, противоречит теории ферментативного гидролиза (при отводе продукта ферментативной реакции её равновесие должно смещаться в сторону продукта), но с другой стороны может быть объяснено. Во-первых, могут отличаться индивидуальные свойствами применяемых субстратов, что зависит от химического состава сырья и способа предобработки. Во-вторых, в случае неизотермического совмещения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения, некоторые ферменты или штаммы проду-

центров биоэтанола могут не справиться с неоптимальным температурным режимом, что приводит к ингибированию процесса в целом.

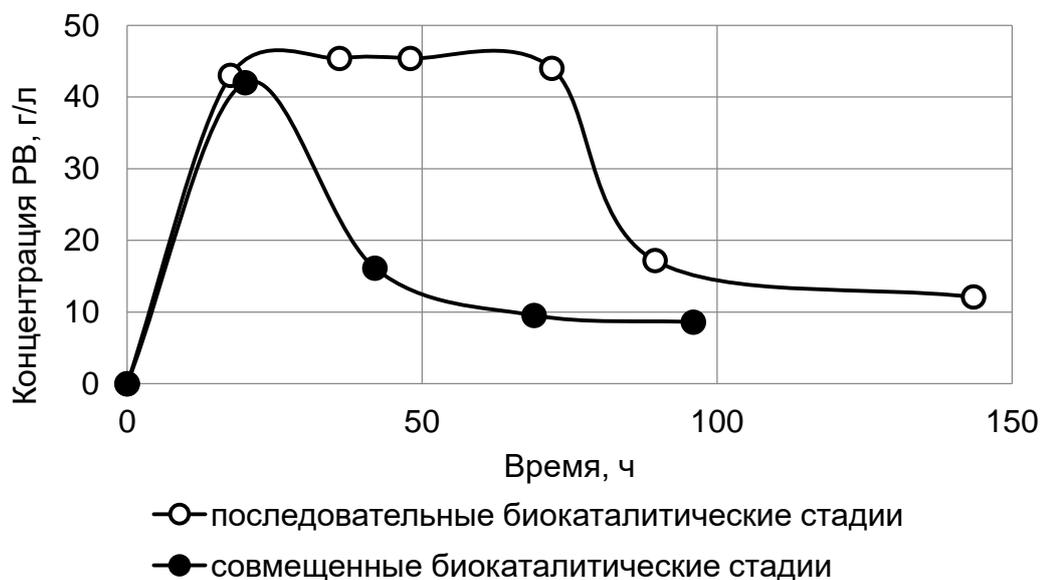


Рисунок 4.1 – Преимущества совмещения биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения на примере субстрата, полученного одностадийной обработкой шелухи овса гидроксидом натрия

В нашем случае интересно поведение субстратов 3 и 4 для обоих видов сырья: при их использовании зафиксировано минимальное повышение крепости бражек по сравнению с несомещенным процессом – всего на 0,1 об. % (т.е. на 4,2-6,2 %). В то время как для субстратов 1 и 2 повышение крепости бражек при совмещении стадий составило 0,3 % (16,7-18,8 %). Возможно, что для химически более чистых субстратов в водной среде в условиях нестабильности pH основной гидролиз проходит быстрее, чем для сложных, химически «грязных» субстратов 1 и 2, таким образом, к моменту совмещения стадий основной гидролиз уже прошел, поэтому отвод продуктов реакции ферментативного гидролиза не приводит к смещению её равновесия.

В итоге, после совмещения биокаталитических стадий по выходу биоэтанола субстраты в порядке убывания можно расположить в новый ряд: 1>2>4>3 для обоих видов сырья. Получен неочевидный вывод: для биотрансформации целлюлозосодержащего сырья в биоэтанол одностадийная обработка предпочтительнее многостадийной, несмотря на то, что при рассмотрении стадии брожения отдель-

но, больший выход биоэтанола был синтезирован на химически более чистых субстратах, полученных двухстадийно.

Одностадийная химическая предобработка сырья снижает трудо- и энергозатраты, экономит реагенты, приводит к повышению экономичности и технологичности процесса в целом.

В табл. 4.5 приведено содержание примесей в опытных образцах биоэтанола, полученных при последовательном и совмещенном проведении биокаталитических стадий для субстрата 1 из шелухи овса и мискантуса. Для обоих видов сырья наблюдается снижение уровня примесей в опытных образцах биоэтанола-сырца, полученных при совмещении биокаталитических стадий: альдегидов на 32-50 %, эфиров на 35-38 %, сивушных масел на 9-30 %, метанола на 50-60 %, то есть наблюдается повышение эффективности биосинтеза биоэтанола и снижение образования побочных примесей.

Таблица 4.5 – Содержание примесей в опытных образцах биоэтанола-сырца (субстрат 1)

Показатель, в пересчете на безводный спирт	Шелуха овса		Мискантус	
	ПБК	СБК	ПБК	СБК
Массовая концентрация альдегидов, мг/дм ³	3800±200	2600±200	1500±200	1000±200
Массовая концентрация эфиров, мг/дм ³	1000±100	650±100	800±100	500±100
Массовая концентрация сивушного масла, мг/дм ³	1700±200	1200±200	2600±200	2400±200
Содержание метанола, об. %	0,005±0,001	0,002±0,001	0,003±0,001	0,002±0,001
ПБК – последовательные биокаталитические стадии; СБК – совмещенные биокаталитические стадии				

Совмещение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения для одностадийно полученных субстратов 1 и 2 приводит к повышению выхода биоэтанола на 16,7-18,8 %, снижению примесей в бражке на 30-50 %, сокращению продолжительности процесса в целом в 1,5 раза, позволяет исключить стадии фильтрации или сепарирования гидролизата, в результате чего упрощается задача масштабирования.

4.3 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 субстрат 2 из шелухи овса. Для разработки математической модели проводился эксперимент следующим образом. Продолжительность стадии ферментативного гидролиза до совмещения со спиртовым брожением (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. Результаты эксперимента отражены в табл. 4.6.

Таблица 4.6 – 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

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.

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).

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 [Makarova, 2017].

Согласно классической теории ферментативного катализа Михаэлиса-Ментен, получение продукта (РВ) из субстрата (целлюлозы) происходит через стадию образования фермент-субстратного комплекса (ES). Уравнения (3.2-3.8), описывающие превращения субстрата в продукт, приведены в разделе 3.4.

Аппроксимация экспериментальных данных, показанная на рис. 4.2, выполнялась методом наименьших квадратов [Ioelovich, 2015].

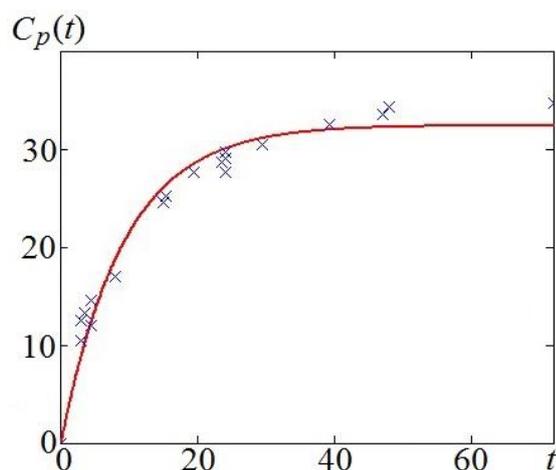


Рисунок 4.2 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментативного гидролиза: точки – экспериментальные данные; линия – теоретическая кривая, полученная в результате аппроксимации выражения (4.5)

Согласно результатам математического моделирования константы, входящие в систему уравнений (3.3) и выражение (3.6) 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 (4.1):

$$k_0(t_0) = C_n(t_0) / C_m \quad (4.1)$$

Изменение концентрации РВ, не утилизируемых в биоэтанол в таком случае можно найти как (4.2):

$$C_0(t, t_0) = k_0(t_0) \cdot C_p(t) \quad (4.2)$$

Отсюда концентрацию РВ, утилизируемых в биоэтанол, находим как (4.3):

$$C_{ps}(t, t_0) = C_p(t) - C_0(t, t_0) = (1 - k_0(t_0)) C_p(t) \quad (4.3)$$

Зависимость коэффициента $k_0(t_0)$ представлена на рис. 4.3.

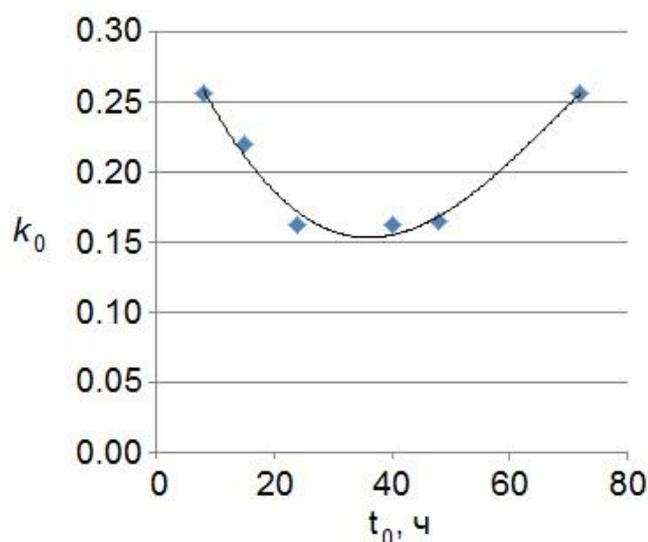


Рисунок 4.3 – Зависимость коэффициента k_0 от времени внесения дрожжей

Согласно результатам расчета, коэффициент k_0 определяется выражением (4.4):

$$k_0 = -0,000000007t_0^4 + 0,00000025t_0^3 + 0,000147t_0^2 - 0,01024t_0 + 0,3319 \quad (4.4)$$

Полагая, что скорость сбраживания линейно зависит от концентрации утилизируемых в биоэтанол РВ, можно записать уравнение (4.5):

$$\frac{dC_k}{dt} = -k_4 C_{ps}(t, t_0) \quad (4.5)$$

Решением уравнения (4.5) является выражение (4.6):

$$C_k(t, t_0) = \begin{cases} 0, & t \leq t_0; \\ (1 - k_0(t, t_0)) C_{ps}(t, t_0) [1 - \exp(-k_4(t - t_0))]; & t > t_0 \end{cases} \quad (4.6)$$

Сравнение результатов математической модели с экспериментальными данными представлено на рис. 4.4, на котором наблюдается хорошая сходимость результатов.

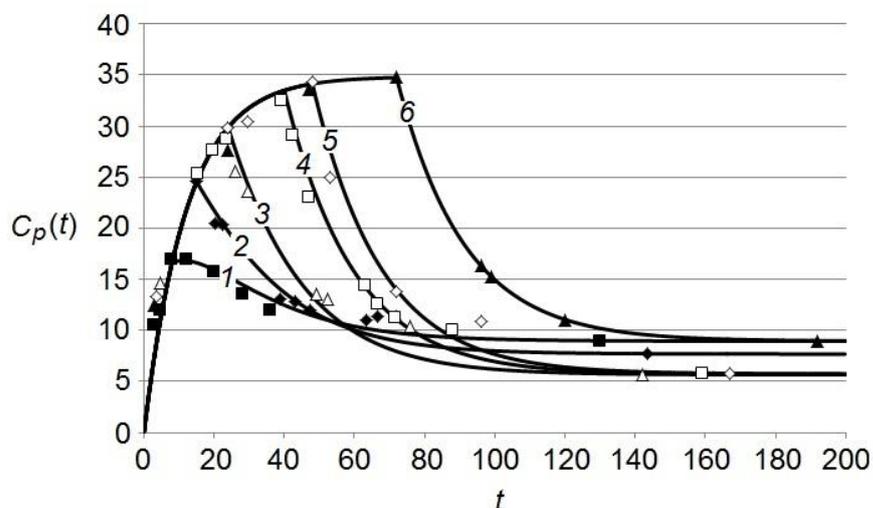


Рисунок 4.4 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности процесса; 1) $t_0 = 8$ ч; 2) $t_0 = 15$ ч; 3) $t_0 = 24$ ч; 4) $t_0 = 39$ ч; 5) $t_0 = 48$ ч; 6) $t_0 = 72$ ч; точки – экспериментальные данные; линии – теоретические

Интересно, что максимальная концентрация утилизированных 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 утилизированных РВ в этих опытах повышается. Однако в опытах 1 и 2 концентрация утилизированных 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 утилизированных РВ (4.7):

$$K = k_5 C_k(t, t_0) \cdot 100 \% \text{ об.}, \quad (4.7)$$

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

Выход биоэтанола (% от массы субстрата) определялся по выражению (4.8):

$$Y(t, t_0) = C_k(t, t_0) / C_s(0) \cdot 100 \%, \quad (4.8)$$

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 рис. 4.5 и 4.6 соответственно.

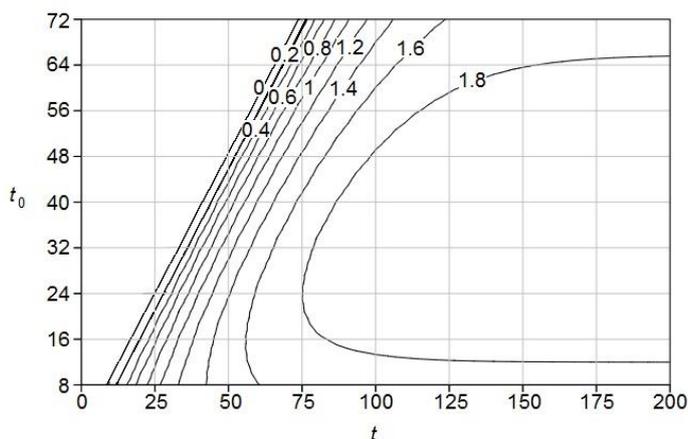


Рисунок 4.5 – Зависимость концентрации биоэтанола K (% об.) от общей продолжительности процесса (t , ч) и времени внесения дрожжей (t_0 , ч)

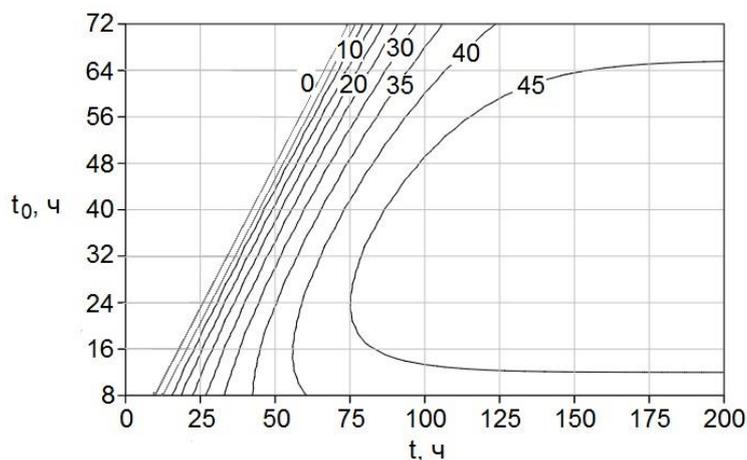


Рисунок 4.6 – Зависимость выхода биоэтанола Y (%) от общей продолжительности процесса (t , ч) и времени внесения дрожжей (t_0 , ч)

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 сбрасываемых 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.

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

На стадии спиртового брожения повысить выход биоэтанола позволяет оптимизация состава питательной среды. С одной стороны, хорошо изучена роль макроэлементов и микроэлементов в составе питательных сред, дифференцировано их влияние в технологиях получения продуктов брожения и дрожжевой биомассы [Агеев, 1953; Новаковская, 1972; Меледина, 2015], подобраны эффективные комплексные активаторы брожения [Гернет, 2019; Гернет, 2020; Дышекова, 2020; пат. РФ 2331666; Пермякова, 2016, Римарева, 2017; Karpenko, 2017], установлено влияние минорных компонентов [Шуваева, 2012]. С другой стороны, использование конкретной питательной среды и конкретного продуцента ставят задачу уточнения этих параметров для конкретных условий [Грачева, 2000; Huang, 2015].

Известно, что в целом, гидролизаты лигноцеллюлозного сырья являются средами, малопригодными для жизнедеятельности дрожжей, поскольку в них недостаточное содержание азотных и фосфорных соединений, отсутствуют витамины и стимуляторы роста [Холькин, 1989]. Гидролизаты шелухи овса и мискантуса, используемые в данной работе, не обеспечивают отраслевых требований по общему количеству клеток и доле почкующихся клеток [Римарева, 2005], что свидетельствует о недостатке азота и витаминов в их составах.

Задачей данного эксперимента являлось нахождение оптимального состава питательной среды, соответствующего максимальному выходу биоэтанола при спиртовом брожении ферментативного гидролизата субстрата 1 из шелухи овса.

Для получения достаточного объёма питательной среды ферментативного гидролизата ферментативный гидролиз ПАО шелухи овса 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 [Pavlov, 2014], рН электродом InPro 42XX (Mettler Toledo, США) и трансмиттером M200 (Mettler Toledo, Швейцария). Использовались ФП в следующей дозировке: «Целлолюкс-А» 40 мг/г субстрата, «Брюзайм ВGX» 200 мг/г субстрата. Процесс ферментативного гидролиза проводился при температуре (46 ± 2) °С в течение 42 ч, активная кислотность поддерживалась вручную на уровне $(4,8 \pm 0,2)$ ед. рН. Концентрация субстрата – 60 г/л, концентрация РВ в ферментативном гидролизате – 46,5 г/л, в том числе пентоз – 4,8 г/л, концентрация глюкозы – 41,7 г/л. С помощью центрифугирования 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 (табл. 4.7). План полного трёхфакторного эксперимента был составлен общепринятым способом [Зедгенидзе, 1976]. Реализация плана 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 вносились кальций хлористый (0,2 г/л) и сульфат магния (1 г/л) без варьирования концентраций.

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 4.7 приведены результаты экспериментов по

исследованию влияния состава питательной среды на характеристики спиртового брожения.

Таблица 4.7– План экспериментов и результаты исследования влияния состава питательной среды на характеристики спиртового брожения

№	(NH ₄) ₂ SO ₄ , г/л	KN ₂ PO ₄ , г/л	Дрожжевой экстракт, г/л	Концентрация биоэтанола, % об.	Выход биоэтанола, %	Константа скорости убыли СС·10 ³ , ч ⁻¹	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 % до 88,9 % (максимальный выход). Экспериментально-статистическая модель была построена с помощью метода наименьших квадратов. В результате реализации плана полного трехфакторного эксперимента 2³ (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 (4.9).

$$K = 2,39 - 0,03X_1 - 0,04X_2 - 0,16X_3 + 0,04X_1X_2 - 0,01X_1X_3 + 0,05X_2X_3 - 0,26X_1^2 - 0,06X_2^2 - 0,26X_3^2, \quad (4.9)$$

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,

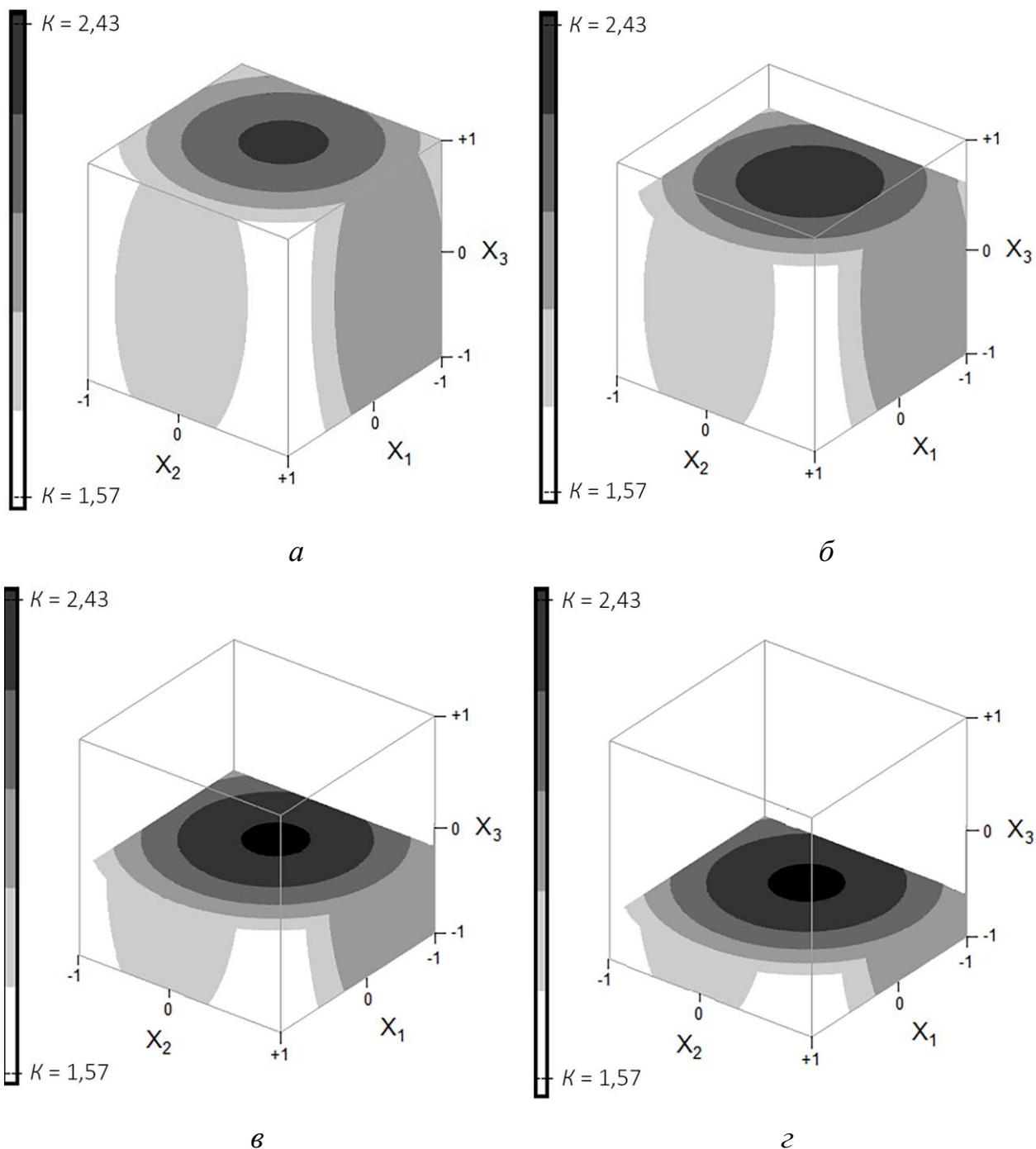
0 г/л для всех трёх факторов, соответствуют нижние границы безразмерных факторов (-1). Верхние границы безразмерных факторов (+1) соответствуют максимальным концентрациям компонентов питательной среды в исследуемом диапазоне: 4 г/л – для сульфата аммония, 4 г/л – для монофосфата калия, 20 г/л – для дрожжевого 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 рис. 4.7 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.

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 concentra-

ции 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.)



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

Рисунок 4.7 – Изменение концентрации биоэтанола (K , % об.) в зависимости от состава среды

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.

4.5 Выбор штамма *Saccharomyces cerevisiae*

Проведен скрининг штаммов спиртовых дрожжей для получения биоэтанола из шелухи овса. Характеристики выбранных штаммов (*S. cerevisiae* Y-3136, *S. cerevisiae* Y-3137 и контрольного *S. cerevisiae* Y-1693) приведены в табл. 2.2. Штаммы тестировались в совмещенных процессах ферментативного гидролиза и спиртового брожения субстрата 1 из шелухи овса. Результаты скрининга приведены в табл. 4.8.

Таблица 4.8 Скрининг штаммов *Saccharomyces cerevisiae*

Характеристика процесса	Штамм		
	Y-3136	Y-3137	Y-1693
Температура брожения, °С	32	35	28
Концентрация бражки, 3 сут., об. %	2,1	2,0	2,1
Концентрация бражки, 7 сут., об. %	2,4	2,1	2,2
Остаточная концентрация РВ, г/л	3,8	2,4	4,6
Численность клеток дрожжей, 2 сут., млн. КОЕ (в скобках – количество почкующихся клеток, %)	34 (25)	36 (28)	53 (25)
Численность клеток дрожжей, 7 сут., млн. КОЕ (в скобках – количество почкующихся клеток, %)	34 (24)	11 (13)	51 (21)

Наибольшую крепость бражки – 2,4 об. % – демонстрирует штамм Y-3136, при этом по сравнению с контролем наблюдается меньшая численность дрожжей в процессе брожения. Как и контрольный Y-1693, штамм Y-3136 демонстрирует сохранение численности популяции через 7 суток брожения, что свидетельствует о его устойчивости. Следует дополнительно изучить его устойчивость к гидролизным средам. Экспериментальные данные показывают, что *S. cerevisiae* Y-3136

перспективен не только для пищевого производства, но и для технического биоэтанола.

4.6 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 [Pavlov, 2014].

Для осуществления спиртового брожения использовалась культура *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693, культивируемая с целью адаптации на смешанной питательной среде: 50 % солодового сусла и 50 % супернатанта ферментативного гидролизата; продолжительность культивирования 24 ч, температура 28 °С. Объем засевных дрожжей во всех опытах составил 15 % от объема реакционной массы, при работе с ПАО шелухи овса 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. 4.4.)

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 ± 2 °С, спиртового брожения 30 °С.
- внесение антибиотика (бензилпенициллин) из расчета 3 тыс. ЕД/л реакционной массы каждые 24 ч.

Исследовано 3 варианта подпитки от 60 г/л до 150 г/л. Через 4 ч вносилось дополнительно 30 г/л субстрата и дополнительная порция мультиэнзимной ком-

позиции ферментных препаратов, которые вносили из расчёта: «Целлолюкс-А» – 54 мг/г субстрата, «Ультрафло Коре» – 165 мг/г субстрата. Результаты приведены в табл. 4.9.

Таблица 4.9 – 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.

Закономерно, 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 [Raj, 2019]. 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 за-

грузке 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 [Hu, 2012] и явлением непродуктивной адсорбции ферментов [Yu, 2011]. 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 %.

4.7 Переработка барды для получения кормового белка

Способ предобработки 2 (щелочная делигнификация) приводит к максимальному сохранению гемицеллюлоз в субстратах, при гидролизе которых образуются пентозы, преимущественно ксилоза. Поскольку сахаромикеты не сбраживают пентозы, то бражки после получения биоэтанола из субстратов 2 характеризуются повышенным содержанием пентоз, особенно в случае шелухи овса. Бражки, полученные при раздельном проведении ферментативного гидролиза и спиртового брожения, после фильтрации и стерилизации были испытаны как питательные среды для получения кормовых дрожжей, в качестве контроля использованы исходные гидролизаты из субстратов 2 (табл. 4.10).

Эффективность конверсии РВ рассчитана как отношение утилизированных РВ к общему содержанию РВ, выраженное в процентах. Аналогичным образом рассчитана эффективность конверсии ксилозы.

Таблица 4.10 – Показатели эффективности конверсии сахаров в процессе биосинтеза кормового белка

Продуцент	Ферментативный гидролизат			Послеспиртовая барда		
	<i>D.c.</i>	<i>P.s.</i>	<i>P.t.</i>	<i>D.c.</i>	<i>P.s.</i>	<i>P.t.</i>
Субстрат 2 из шелухи овса						
Начальная концентрация РВ, г/л	50,0			19,2		
Конечная концентрация РВ, г/л	24,6	8,6	11,4	3,9	1,8	3,6
Эффективность конверсии РВ, %	50,8	82,8	77,2	79,7	90,6	81,2
Начальная концентрация ксилозы, г/л	11,3			11,3		
Конечная концентрация ксилозы, г/л	7,5	5,9	7,6	6,6	6,4	9,8
Эффективность конверсии ксилозы, %	32,6	47,8	32,7	41,6	43,4	13,3
Общее количество клеток, млн.КОЕ/мл	61	425	197	340	365	804
Средний размер клеток, <i>d</i> , мкм x <i>l</i> , мкм	5,0x5,2	5,9x6,1	3,1x3,3	5,0x5,2	5,9x6,1	3,1x3,3
Субстрат 2 из мискантуса						
Начальная концентрация РВ, г/л	32,0			7,8		
Конечная концентрация РВ, г/л	8,8	7,8	6,6	2,3	5,3	1,7
Эффективность конверсии РВ, %	72,5	75,7	79,4	70,6	32,1	78,2
Начальная концентрация ксилозы, г/л	1,7			1,7		
Конечная концентрация ксилозы, г/л	0,7	0,3	0,4	0,6	0,3	0,6
Эффективность конверсии ксилозы, %	58,9	82,4	76,5	64,7	82,4	64,7
Общее количество клеток, млн.КОЕ/мл	73	155	48	38	20	455
Средний размер клеток, <i>d</i> , мкм x <i>l</i> , мкм	1,2x1,4	0,8x1,0	1,6x1,8	1,2x1,4	0,6x0,8	1,8x2,0
Примечание: <i>D.c.</i> – <i>Debariomyces castellii</i> Y-968; <i>P.s.</i> – <i>Pichia stipitis</i> Y-3263; <i>P.t.</i> – <i>Pachysolen tannophilus</i> Y-1532						

В случае использования шелухи овса, и ферментативный гидролизат, и барда из неё оказались биологически доброкачественными средами для получения кормового белка: размер клеток на обеих средах соответствовал их размеру на синтетической питательной среде, а по количеству клеток барда даже превзошла ферментативный гидролизат. Особенно эффективным по конверсии как РВ, так и ксилозы, показал себя *Pichia stipitis* Y-3263.

Мискантусные среды оказались биологически недоброкачественными: размер клеток уменьшился 2-7 раз по сравнению с их размерами на средах, полученных из шелухи овса, количество клеток снизилось в 2-18 раз, особенно существенно снижение – на среде барды. Штамм *Pachysolen tannophilus* Y-1532 пока-

зал самую высокую приспособляемость к мискантусным средам по количеству клеток и эффективности конверсии РВ.

Снижение численности микроорганизмов объясняется и снижением начальной концентрации РВ в мискантусной барде. Уменьшение размера клеток указывает на присутствие ингибиторов в мискантусных средах. В литературе мискантус рассматривается как источник фенольных веществ и стеролов [Villaverde, 2009], поэтому, скорее всего ингибиторы, содержащиеся в мискантусных средах, имеют фенольную природу.

4.8 Опытнo-промышленные испытания технологий биоэтанола

4.8.1 Разработка аппаратурно-технологической схемы получения биоэтанола

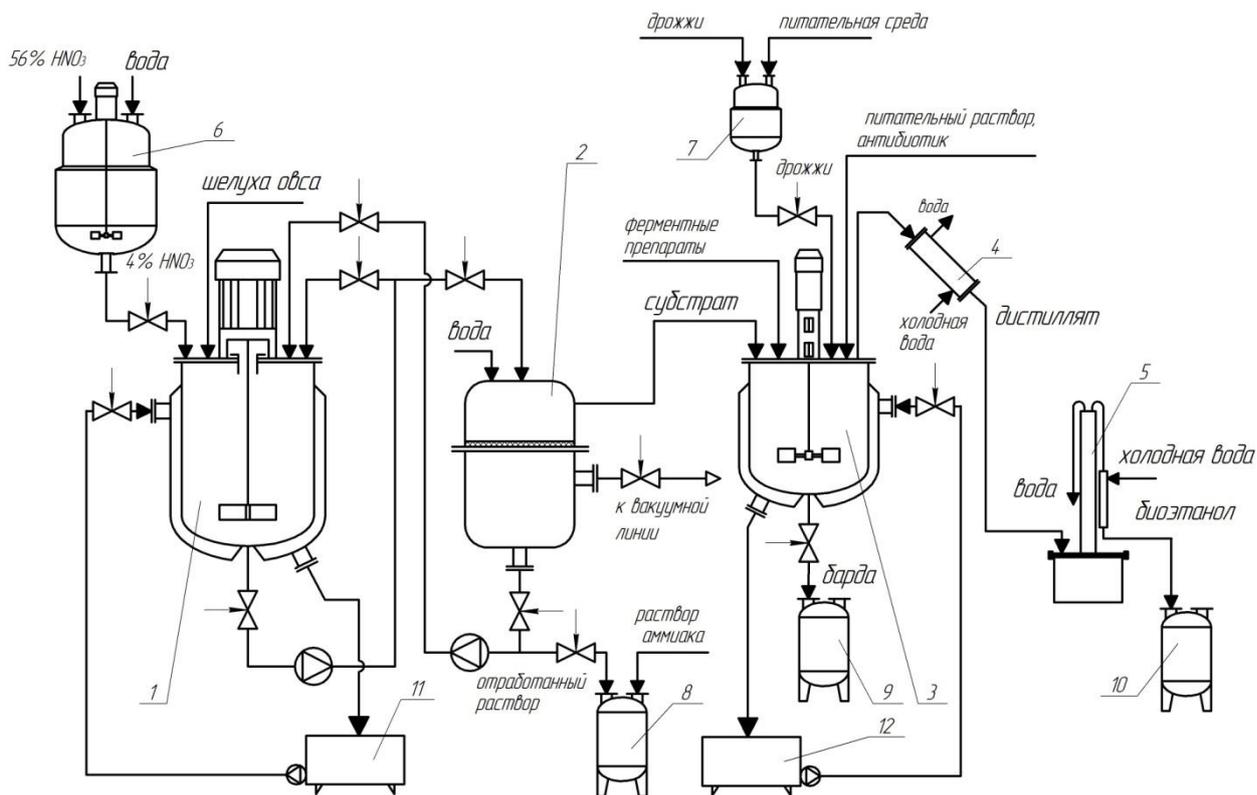
На основании лабораторных исследований разработана и предложена аппаратурно-технологическая схема получения биоэтанола из альтернативного целлюлозосодержащего сырья для масштабирования по объему процесса (рисунок 3.12). Разработанная технология получения биоэтанола из шелухи овса внедрена в условиях опытно-промышленного производства ИПХЭТ СО РАН в 2015-2016 гг., из мискантуса – в 2017 г. Масштабирование полного цикла технологии получения биоэтанола в производственных условиях проводилось согласно действующей нормативной документации ИПХЭТ СО РАН: ТП 10018691.01101.00070 «Получение технической целлюлозы из плодовых оболочек овса комбинированным способом»; ТП 10018691.02101.00074 «Получение биоэтанола на установке комплексной переработки растительного сырья в целлюлозосодержащие продукты и исходные компоненты для химического синтеза и биотопливо»; ТП 10018691.02101.00136 «Химическая обработка плодовых оболочек овса с целью получения субстратов для биотехнологической переработки»; ТП 10018691.02101.00137 «Энзимный способ получения растворов глюкозы из плодовых оболочек овса на установке комплексной переработки растительного сырья в целлюлозосодержащие продукты и исходные компоненты для химиче-

ского синтеза и биотопливо»; ТП 10018691.02101.00138 «Микробиологический синтез биоэтанола на средах энзимных гидролизатов и ректификации биоэтанола на установке комплексной переработки растительного сырья в целлюлозосодержащие продукты и исходные компоненты для химического синтеза и биотоплива» (Приложения 1-2).

Аппаратурная схема получения биоэтанола на опытном производстве приведена на рис. 4.8. В аппарат 1 объемом 250 л при выключенной мешалке через люк реактора приливалось расчетное количество технической воды, взвешенной на весах. После этого при перемешивании через люк аппарата 1 загружались предварительно взвешенные реактивы (азотная кислота или гидроксид натрия), затем загружалось сырье (шелуха овса или мискантус), взвешенное на весах и при перемешивании реакционная масса выдерживалась при температуре 90-96 °С в течение 3-8 ч. Требуемая температура реакционной массы поддерживалась изменением температуры теплоносителя, подаваемого в рубашку аппарата 1. По окончании предварительной химической обработки реакционная масса охлаждалась и частями подавалась на вакуумный фильтр 2 для фильтрации. Полученный субстрат (продукт азотнокислой обработки или продукт щелочной делигнификации) промывался на вакуумном фильтре 2 до нейтральной реакции промывной воды и взвешивался в мешках.

Фильтрат сливался в полипропиленовые канистры, предназначенные для хранения и транспортировки 60 % азотной кислоты. Нейтрализация отработанных растворов проводилась в аппарате 1, кислотность раствора определялась с помощью универсальной индикаторной бумаги. При наличии нейтральной реакции массы в аппарате, отработанные растворы собирались в канистры.

Для начала стадии ферментативного гидролиза в аппарат 3 объемом 100 л приливалось расчетное количество дистиллированной воды. Для поддержания необходимой температуры в рубашку аппарата 3 подавался нагретый теплоноситель. Далее при включенной мешалке через люк аппарата 3 загружалась приготовленная навеска влажного субстрата с вакуумного фильтра 2, взвешенная на технических весах. Допускается проводить осахаривание сухих субстратов.



1 – реактор объемом 250 л; 2 – фильтр вакуумный; 3 – реактор с перемешивающим устройством объемом 63 л; 4 – холодильник; 5 – бражная колонна; 6 – аппарат варочного раствора; 7 – дрожжегенератор; 8 – аппарат отработанного раствора; 9 – сборник барды; 10 – сборник биоэтанола-сырца; 11, 12 – термостат.

Рисунок 4.8 – Аппаратурная схема получения биоэтанола на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН

Регулировка активной кислотности в реакционной массе производилась посредством подачи расчетного количества реактива (16 % раствора ортофосфорной кислоты или 10 % раствора гидроксида аммония) в реакционную массу через люк аппарата 3.

При выходе на заданный уровень активной кислотности через люк аппарата 3 вносился комплекс ферментных препаратов. Осахаривание проводилось в течение 24-72 ч, при этом осуществлялся круглосуточный контроль активной кислотности и концентрации редуцирующих веществ.

После накопления редуцирующих веществ не менее 50 % от массы субстрата проводилось сбраживание осахаренного субстрата без фильтрации непосредственно в аппарате 3 без перемешивания. После регулировки уровня активной

кислотности в аппарат 3 через люк вносилось необходимое количество засевных дрожжей, подготовленных в микробиологической лаборатории согласно п. 2.3.2. Дрожжи вносились в количестве 12 % от объема осахаренного субстрата. Продолжительность процесса сбраживания составляла 48-72 ч.

Для выделения биоэтанола из бражки в холодильник 4 подавалась холодная вода, содержимое аппарата 3 нагревалось при перемешивании. Биоэтанол, конденсировался в холодильнике 4, поступал в бражную колонну 5 (GS-2, производство компании «Гоним Спирт», г. Щелково) для фракционного разделения.

4.8.2 Масштабирование получения биоэтанола из шелухи овса, предобработанной двумя одностадийными способами

На опытном производстве процесс был реализован в 63-л ферментёре. Масштабировано два вида одностайной предобработки шелухи овса: с помощью HNO_3 (субстрат 1) и с помощью NaOH (субстрат 2).

Предварительное осахаривание первые 24 ч проводилось при температуре $(46 \pm 2)^\circ\text{C}$, при этом концентрация редуцирующих сахаров увеличивалась экспоненциально и через 24 ч в составила $36,2 \pm 0,2$ г/л для субстрата 1 и $40,1 \pm 0,2$ г/л для субстрата 2. Через 24 ч реакционную массу охлаждали до 28°C и вносили инокулят дрожжей, далее проводили совмещенные биокаталитические стадии ферментативного гидролиза и спиртового брожения. Интересно, что несмотря на отставание ферментативного гидролиза для субстрата 1, спиртовое брожение прошло лучше именно для этого субстрата (рис. 4.9). Таким образом, высокая реакционная способность к ферментативному гидролизу не гарантировала высокого выхода биоэтанола.

При 100 %-ной конверсии 60 г/л целлюлозы в глюкозу теоретически возможно получение 66,67 г/л глюкозы, а из них, согласно стехиометрическому уравнению брожения, возможно получение этанола с концентрацией 34,1 г/л. В расчетах примем этот выход за 100 %, то есть вклад от гидролиза гемицеллюлоз и превращения образовавшихся моносахаров в этанол не будет учитываться.

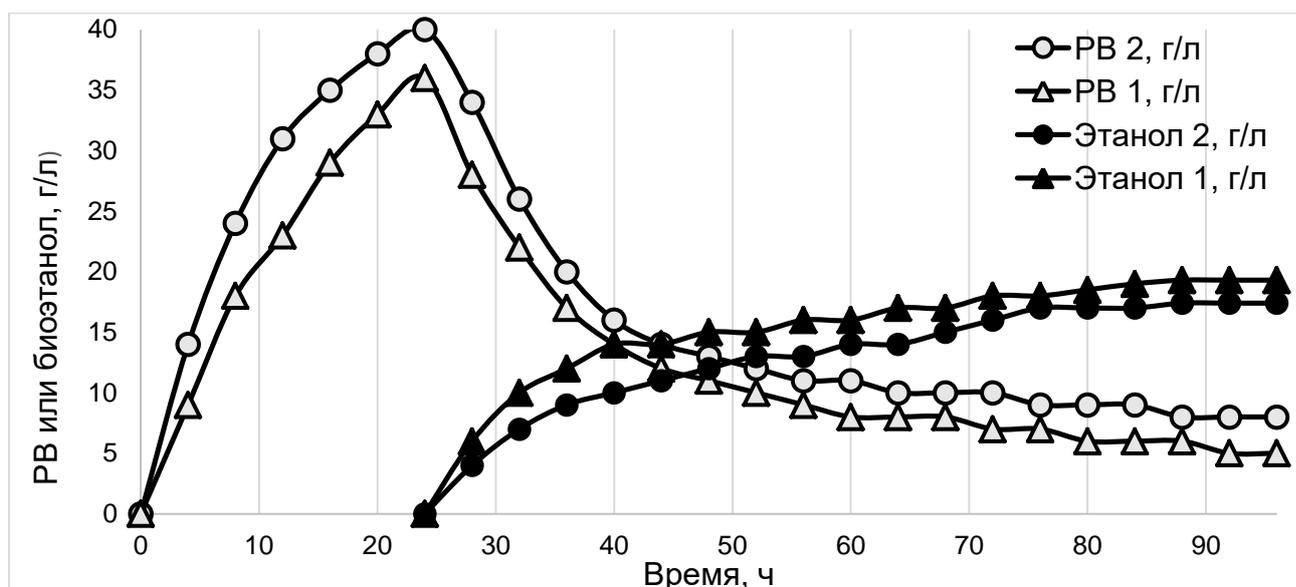


Рисунок 4.9 – Накопление и утилизация редуцирующих сахаров и образование этанола в 63-л реакторе в зависимости от способа предобработки шелухи овса: 1 – HNO_3 , 2 – NaOH

Совмещенная биокаталитическая стадия более эффективно реализована для субстрата 1 (полученного азотнокислой предобработкой): выход этанола на 5,5 % выше, чем для субстрата 2 (табл.4.11). Меньший выход биоэтанола мы связываем с ингибированием зимазного комплекса дрожжей ионами натрия в процессе ферментации. Известно, что ионы натрия очень плохо удаляются при промывке субстрата водой [Mosier, 2005; Hu, 2012; Agrawal, 2015]. Данный эффект не наблюдался на стадии ферментативного гидролиза, что объясняется устойчивостью ферментов, входящих в состав ферментной композиции к ионам натрия. В целом, оба способа равноценны, выход этанола на 1 т шелухи овса различается всего на 5 %: 20,5 дал и 19,5 дал для субстратов 1 и 2 соответственно.

К сожалению, нельзя полноценно сравнить свои результаты с описанными в мировой литературе. С 2000 г в Канаде функционирует опытный завод по производству этанола мощностью 50 т/сутки, одним из видов сырья является шелуха овса, однако, выход этанола с единицы сырья не приводится [Lawford, 2001]. Работа [Chaud, 2012] является поисковой, низкий выход этанола из шелухи овса (0,05 г/г) объясняется использованием предгидролизата в качестве питательной

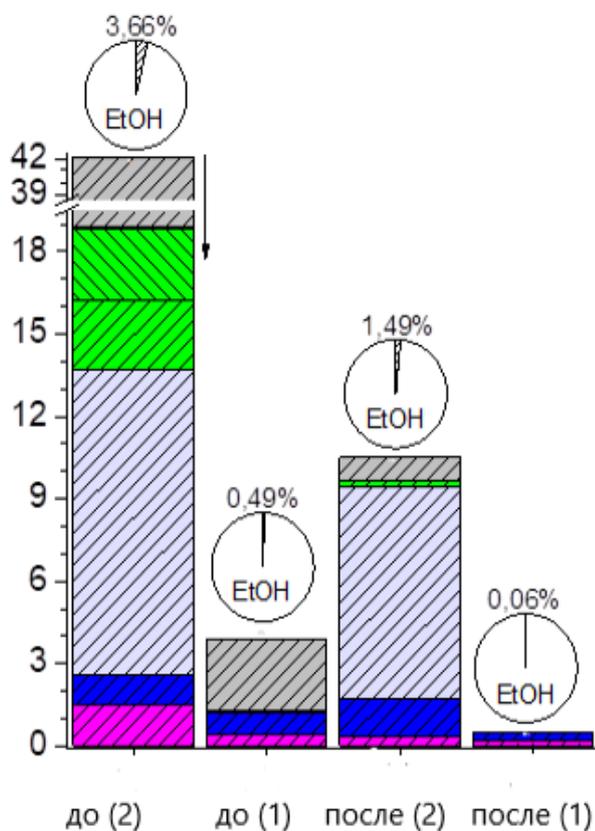
среды. В работе [Cortivo, 2018] в качестве питательных сред использованы и кислотные и ферментативные гидролизаты шелухи овса, однако, кроме этанола, одновременно получают ксилит, поэтому выходы не могут быть сопоставлены.

Таблица 4.11 – Концентрация и выход этанола при получении этанола из шелухи овса в 100-л ферментёре в зависимости от способа предобработки шелухи овса: 1 – HNO_3 , 2 – NaOH

Показатель	Способ предобработки шелухи овса	
	HNO_3 (1)	NaOH (2)
Концентрация этанола, г/л	19,3	17,4
Концентрация этанола, об. %	2,45	2,2
Остаточная концентрация РВ в бражке, г/л	5	9
Выход этанола от теоретического на биокаталитических стадиях, %	56,6	51,0
Выход дал/т шелухи овса	20,5	19,5

Предобработка с помощью HNO_3 способствовала получению значительно более чистого биоэтанола-сырца (1), содержание примесей в котором в ~10 раз меньше, чем в биоэтаноле (2), полученном после NaOH -делигнификации (рис. 4.10), в основном за счет меньшего содержания ацетальдегида и сивушных масел, меньшим было и содержание эфиров и метанола. Образцы биоэтанола-сырца содержали альдегиды и кетоны (ацетальдегид, ацетон, кротональдегид, метилэтилкетон, бензальдегид), эфиры (метилацетат и этилацетат, изобутилацетат), сивушные спирты (C_3 - C_6 спирты) и аромаспирты. В обоих образцах в альдегидной фракции преобладала примесь ацетальдегида, в эфиной фракции преобладали метилацетат и этилацетат; во фракции сивушных масел C_3 -спирты преобладали над изоамилолом и изобутанолом. Содержание метанола было незначительным, менее 0,06-0,02 мг/л (в пересчёте на безводный спирт). Примеси ацетона и метилэтилкетона, кротональдегида и бензальдегида, бутанола, 2-бутанола, гексанола, бензилового и фенилэтилового спиртов в сумме не превышали 0,2 мг/л для (2) и 0,04 мг/л для (1). В отличие от (2), биоэтанол (1) не содержал изопропанол, а содержание таких спиртов, как пропанол, изобутанол и изоамилол было в 1,4, в 6,0 и в 2,8 раз мень-

ше, соответственно. Меньший выход сивушных спиртов после HNO_3 -предобработки также был получен в работе [Sanchez, 2020b].



Примеси:

- ▨ ацетальдегид и др. альдегиды;
- метанол;
- метилацетат;
- этилацетат и другие эфиры.;
- пропанол;
- ▨ изопропанол;
- $\text{C}_4\text{-C}_6$ спирты.

Рисунок 4.10 – Влияние предобработки с помощью HNO_3 (1) и NaOH (2) на качество образцов биоэтанола до и после ректификации, по оси ординат – содержание примесей, мг/л. Круговая диаграмма показывает массовую долю всех примесей в безводном биоэтаноле (мас. %)

После ректификации количество примесей в образцах биоэтанола уменьшилось в ~4-8 раз в зависимости от исходного содержания сивушных масел. Содержание примесей в образцах очищенного биоэтанола составило 0,5 мг/л и 10,5 мг/л для субстратов 1 и 2 соответственно; при этом преобладали C_3 -спирты: 7,7 мг/л изопропанола и 1,4 мг/л пропанола в (2) и 0,3 мг/л пропанола в (1). Содержание

примесей в образце (1) в ~23 раза ниже, чем в (2), преимущественно за счет меньшего содержания изопропанола и ацетальдегида. Кроме того, в образце, полученном из субстрата 2 обнаружены микропримеси Na ~0,6 мкг/л. Остаточные ионы Na чрезвычайно трудно удалить из субстратов [Mosier, 2005; Agrawal 2015]. При биосинтезе биоэтанола ионы натрия, прикрепленные к поверхности субстрата быстро связываются с гидроксильной группой спирта и переходят в бражку. Даже тщательная отмывка субстрата 2 от ионов натрия не смогла предотвратить натриевое загрязнение очищенного образца биоэтанола.

Подводя итоги, сравним два метода (азотнокислую обработку и щелочную делигнификацию) на каждом технологическом этапе превращения шелухи овса в этилен. Будем использовать критерии, предложенные для оценки эффективности предобработки (Gaurav et al. 2017 и Zabed et al., 2019).

Стадия предобработки. Оба метода характеризуются:

– дешевизной и доступностью реагентов, низким потреблением химических веществ (в обоих случаях применяются разбавленные 4 % мас. растворы и растворы используются многократно),

– промышленной безопасностью и низкими капитальными затратами и энергетическими расходами, так как процессы проводятся при атмосферном давлении;

– соответствием принципам зеленой химии, так как из отработанного щелока можно выделить лигнин, а отработанный раствор азотной кислоты превратить в комбинированное лигногуминовое удобрение;

Технологически проще осуществить азотнокислую предобработку, так как щелочная делигнификация проводится в три этапа (предгидролиз, обработка, декатионирование), а азотнокислая предобработка в два этапа (предгидролиз, обработка), кроме того, субстрат 1, полученный методом азотнокислой обработки легче отмывается от остатков реагента, чем субстрата 2, полученный щелочной делигнификацией.

Однако, потери на стадии предобработки ниже при щелочной делигнификации. Сумма гидролизующих веществ в субстрате 2, полученном щелочной делигнификацией.

нификацией на 10,1 % выше, чем в субстрате 1, полученном азотнокислой обработкой (93,5 % против 83,4 %), а выход выше на 3,6 % (39,8 % против 36,2 % соответственно), то есть щелочная делигнификация обеспечивает более низкие потери целлюлозы и гемицеллюлоз.

Стадия ферментативного гидролиза. Оба метода отвечают критерию эффективности, так как приводят к повышению содержания целлюлозы и гемицеллюлоз в субстратах по сравнению с сырьём, обеспечивают существенное улучшение ферментативного гидролиза и не приводят к образованию ингибиторов ферментативного гидролиза. При расчёте эффективности предобработки по содержанию редуцирующих веществ в растворе через 72 ч ферментативного гидролиза щелочная делигнификация обеспечивает повышение эффективности в 7,2 раза, а азотнокислая предобработка – в 6,8 раз.

Совмещенная биокаталитическая стадия ферментативного гидролиза и спиртового брожения и качество этанола. При расчёте от концентрации субстрата выход этанола на 5,5 % ниже для щелочной делигнификации, чем для азотнокислой обработки, то есть стадия ферментации более эффективно реализуется после азотнокислой обработки шелухи овса. Однако, при расчёте на массу сырья, оба метода дали равноценный выход: 0,160 и 0,162 г/г шелухи овса соответственно. Содержание примесей в образце биоэтанола, полученного через стадию азотнокислой обработки в 10 раз ниже, чем в образце биоэтанола, полученном через стадию щелочной делигнификации. Снижение выхода этанола и ухудшение его качества при использовании в технологическом процессе щелочной делигнификации объясняется остаточной концентрацией щелочных металлов (0,6 мкг), обнаруженной в образце биоэтанола. Несмотря на значительные технологические усилия, избавиться от ионов натрия полностью не удалось.

Оба образца биоэтанола (основная фракция после очистки на бражной колонне) с концентрацией 92,6 % об. объемом по 1 л были переданы в Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН для его применения в процессе каталитической дегидратации в этилен (см. п. 4.9).

4.8.3 Масштабирование получения биоэтанола из мискантуса, предобработанного азотнокислым способом

Совмещенная стадия ферментативного гидролиза и спиртового брожения была реализована в 63-л реакторе в двух вариантах: в первом варианте в нативный гидролизат не вносилось никаких добавок, во втором варианте был внесен питательный раствор. На рис. 4.11 представлены усредненные значения концентрации редуцирующих сахаров и этанола в процессе совмещенных стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения в 100-л ферментёре для двух вариантов биосинтеза.

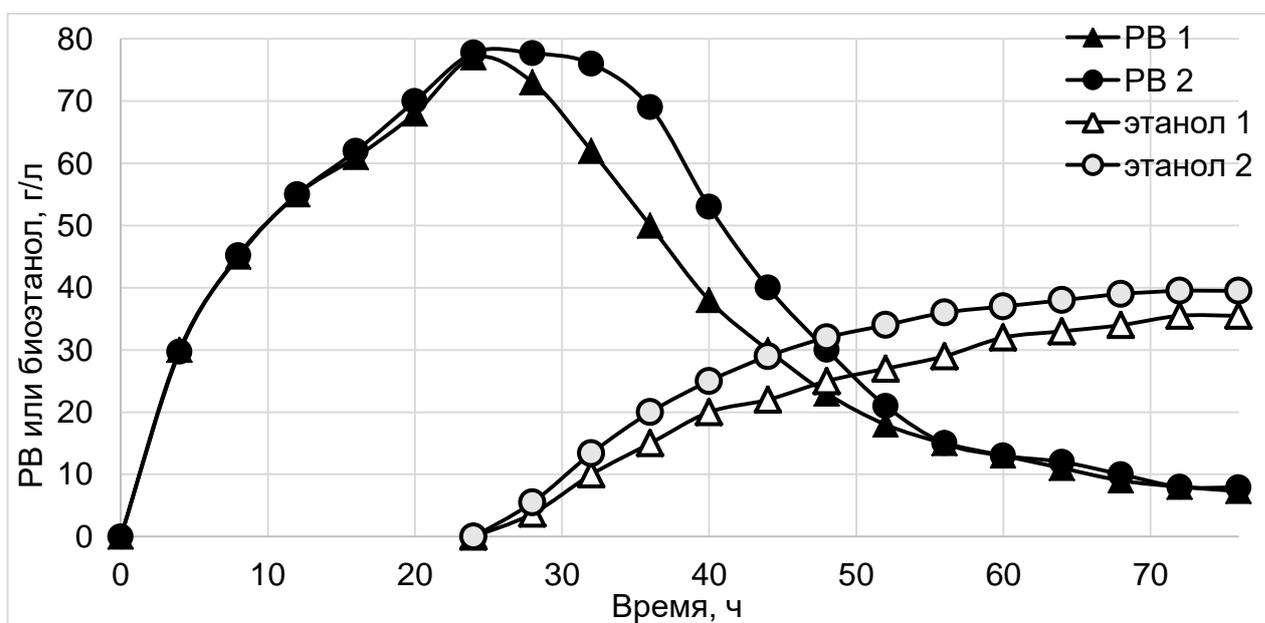


Рисунок 4.11 – Накопление и утилизация редуцирующих сахаров и образование этанола в 100-л ферментёре. Субстрат получен азотнокислой обработкой мискантуса, подпитка субстрата до 100 г/л, 1 – биосинтез без добавок, 2 – с внесением питательного раствора

Предварительное осахаривание для двух вариантов осуществлялось идентично, а именно: начальная концентрация субстрата составила 80 г/л, через 4 ч была осуществлена подпитка до 100 г/л. Продолжительность предварительного осахаривания при $(47 \pm 2)^\circ\text{C}$ составила 24 ч, этому периоду соответствует экспоненциальное увеличение концентрации редуцирующих сахаров, идентичное для обо-

их вариантов, через 24 ч концентрация редуцирующих сахаров составила 77,8 г/л. Затем осуществлялось охлаждение до (28 ± 2) °С и через 28 ч от начала процесса пресахарификации осуществлялась отсроченная инокуляция, кроме того, в вариант 2 дополнительно вносился питательный раствор.

Основное потребление субстрата для обоих вариантов произошло в первые 24 после внесения инокулята, однако в варианте (1) после инокуляции редуцирующие сахара стали снижаться немедленно, а в варианте (2) с задержкой в 8 ч, что мы связываем с действием питательного бульона: дополнительные питательные вещества клетки использовали для размножения, а не для брожения. Впоследствии это благоприятно сказалось на процессе брожения: в варианте (2) редуцирующие сахара использовались быстрее и получена повышенная концентрация этанола: 39,5 г/л против 37,9 г/л для варианта (1). Последние 24 ч происходило дображивание: редуцирующие сахара медленно расходовались на синтез этанола.

При 100 %-ной конверсии 100 г/л целлюлозы в редуцирующие сахара теоретически возможно получение 111,1 г/л глюкозы, а из неё, согласно стехиометрическому уравнению брожения, возможно получение этанола с концентрацией 56,7 г/л. В расчетах примем этот выход за 100 %, то есть вклад от гидролиза гемицеллюлоз и превращения образовавшихся моносахаров в этанол не будет учитываться.

В данной работе получены хорошие концентрации этанола. Согласно [Fan, 2003; Larsen, 2008] концентрация этанола 40 г/л позволяет говорить о промышленной конкурентоспособной технологии. Выход этанола от теоретического составил 66,8 % для варианта без добавок и 69,7 % для варианта с внесением питательного бульона (табл. 4.12). Это совокупный выход на стадиях ферментативного гидролиза и спиртового брожения и можно констатировать, что в обоих случаях процесс масштабирования прошёл успешно. Внесение питательного раствора способствует повышению выхода этанола. При внесении питательного раствора при получении биоэтанола из шелухи овса, предобработанной азотнокислым способом, получили увеличение выхода биоэтанола из шелухи овса на 8,4 %. При

использовании мискантуса, предобработанного азотнокислым способом, внесение раствора позволило повысить выход биоэтанола на 4,3 %.

Таблица 4.12 – Показатели брожения в 63-л ферментёре: без добавок (1) и с внесением питательного раствора (2)

Показатель	Вариант брожения	
	1	2
Концентрация этанола, г/л	37,9	39,5
Крепость бражки, об. %	4,8	5,0
Остаточная концентрация РВ в бражке, г/л	7,3	7,9
Выход этанола от теоретического на биокаталитических стадиях, %	66,8	69,7
Выход этанола на 1 га мискантуса, л (при продуктивности мискантуса 12 т/га)	3024	3156
Выход этанола из 1 т мискантуса, дал	25,2	26,3

Получены результаты сравнимы с имеющимся мировым опытом. По подходу к предобработке близкой к нашим исследованиям работой является [Yang, 2015]. В ней мискантус был обработан двухстадийно разбавленными растворами азотной кислоты (0,5 мас. %, 140-210 °С) в реакторе высокого давления объёмом 18,1 мл, соотношение мискантуса и воды составило 1:8. Однако, азотная кислота была использована не для предобработки мискантуса, а для его химического гидролиза. На первой стадии обработки получен раствор, содержащий 20,9 мг/мл ксилозы, на второй – раствор, содержащий 31,5 мг/мл глюкозы, выход этанола в пересчёте на массу мискантуса в данной работе не приводится, таким образом, сопоставление результатов ферментации в работах не представляется возможным.

В работе [Zhang, 2018] мискантус предобработан аммиаком, после чего при высокой концентрации сухих веществ (~17%–20%) превращен в биоэтанол. Использовано 2 вида генномодифицированных микроорганизмов: дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae* Y128) или бактерии (*Zymomonas mobilis* 8b). Выход этанола в пересчёт на сырьё для этих двух продуцентов составил 252 л/т и 284 л/т соответственно. Это практически совпадает с результатами нашей работы, в пересчёте

наших результатов: 252 л/т и 263 л/т для вариантов (1) и (2) соответственно. Выход этанола с гектара мискантуса в работе [Zhang, 2018] составил 3618 л/га и 4073 л/га для указанных продуцентов. В нашем случае выход биоэтанола для вариантов (1) и (2) составил соответственно 3024 л/га и 3156 л/га. Это связано с относительно низкой урожайностью мискантуса в условиях Западной Сибири: при эксплуатации плантации в течение 15 лет средняя урожайность составила 12 т/га [Капустянчик, 2021]. Тем не менее, это выше, чем выход этанола из кукурузной соломы, проса, сорго и смешанной травы прерий, описанных в этой же работе, который составил от 740 л/га до 2800 л/га. Полученные результаты подчеркивают высокий потенциал мискантуса для получения этанола, независимо от природно-климатической зоны его выращивания.

Отличной работой по масштабированию получения биоэтанола из *Miscanthus sacchariflorus* является [Kang, 2019], в ней также оценены затраты на производство. Мощность опытного завода составила 100 кг биомассы в день. Предобработка проводилась 0,4 М раствором NaOH при 95 °С, далее проводился совмещенный процесс ферментативного гидролиза и спиртового брожения с использованием *Saccharomyces cerevisiae* SHY1011. Выход этанола составил 165 л из 1 т мискантуса, что на 37 % ниже, чем в данной диссертации. Это свидетельствует об эффективности найденных нами технологических решений.

Очень интересным исследованием является [Dubis, 2017], в котором исследуется возможность повышения выхода этанола из мискантуса с помощью агротехнических приёмов выращивания. Показано, что продуктивность этанола увеличилась на 30-40% при внесении азотных удобрений в виде осадков сточных вод (эквивалентное содержание азота 160 кг N/га) по сравнению с мискантусом, выращенным без удобрений. Использована предобработка мискантуса гидроксидом натрия, при этом выход составил 105-134 л этанола из 1 т мискантуса, что в 1,9-2,5 раз ниже, чем в данной работе. Несмотря на высокие значения продуктивности мискантуса: 17,34-19,02 т/га (Польша), выход этанола составил 1864-2633 л/га, что в 1,2-1,6 раз ниже, чем в данной работе. Это также свидетельствует об эффективности найденных в данной работе технологических решений.

Анализ качества биоэтанола из мискантуса

Состав образцов биоэтанола до и после очистки в бражной колонне приведен в табл. 4.13

Таблица 4.13 – Состав примесей образцов биоэтанола, полученных из мискантуса, предобработанного азотнокислым способом на опытно-промышленном производстве

Состав		Образцы биоэтанола					
		Биоэтанол-сырец		Биоэтанол после ректификации на бражной колонне			
				однократной		двукратной	
		1а	2а	1б	2б	1в	2в
Этанол, мас. %	C2	30,8	31,2	89,9	89,5	92,5	91,5
Примеси в безводном биоэтаноле, мг/л							
Метанол	C1	32	18	55	79	36	56
Альдегиды и кетоны, мг/л							
Ацетальдегид	C2	1468	2940	91	36	60	11
Ацетон	C3	9	1	18	18	94	2
Кротоальдегид	C4	10	1	1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
2-бутанон	C4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	21	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Бензальдегид	C7	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>следы</i>	3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Эфиры, мг/л							
Этилацетат	C2	772	180	4	9	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Метилацетат	C2	174	1129	20	21	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Диэтиловый эфир	C4	2	22	11	1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Этилбутират	C6	5	5	<i>следы</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Изобутиловый эфир	C6	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	14	16	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Сивушные масла, мг/л							
Изопропанол	C3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>следы</i>	<i>следы</i>	152	67
1-пропанол	C3	719	615	465	589	195	447
Изобутанол	C4	449	423	306	255	71	155
1-бутанол	C4	71	47	11	50	146	107
2-бутанол	C4	3	5	<i>n.d.</i>	15		
Изоамилол	C5	1352	1030	371	806	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
2-пентанол	C5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
1-гексанол	C6	<i>n.d.</i>	78	21	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Фенилэтанол	C8	12	12	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

Примечание: *n.d.* – не обнаружен; *следы* – менее 0,5 мг/л

Отличия образцов 1 и 2 обусловлены только влиянием добавки питательного раствора на этапе брожения, поскольку все технологические стадии получения биоэтанола из мискантуса были идентичны. Обнаруженные в опытных образцах биоэтанола примеси объединены в три группы: альдегиды и кетоны (ацетальде-

гид, ацетон, кротональдегид, 2-бутанон, бензальдегид), эфиры (метилацетат, этилацетат, диэтиловый эфир, этилбутират, изобутилацетат) и сивушные масла (изопропанол, 1-пропанол, 2-бутанол, изобутанол, 1-бутанол, изоамилол, 1-гексанол, фенилэтанол). Присутствие в следовых количествах ацетона, 2-бутанола и кротональдегида идентифицируют этанол как непищевой.

Независимо от условий сбраживания, преобладающими примесями в биоэтаноле (31 %) были ацетальдегид и изоамиловый спирт; в заметных количествах наблюдались эфиры метилацетат и этилацетат, а также сивушные спирты 1-пропанол и изобутанол, содержание метанола было менее 0,03 г/л в пересчёте на безводный спирт. Содержание ацетона, кротональдегида, этоксиэтана, изопропанола, 2-бутанола и фенилэтанола было мало и в сумме не превышало 0,04 г/л. 2-бутанон, бензальдегид, этилбутират, изобутиацетат, а также изопропанол присутствовали в следовых количествах, их содержание в сумме не превышало 0,005 г/л.

В биоэтаноле-сырце, полученном с добавлением питательного раствора **2а** общее содержание альдегидов и эфиров составило всего 2,4 г/л, т. е. в ~ 1,8 раза меньше, чем в образце **1а**; общее содержание сивушных масел и содержание метанола достигало 2,6 г/л и 0,03 г/л соответственно, т.е. в ~1,2 и 1,8 раза выше, чем в образце, полученном без добавления питательного раствора **1а**. Добавление питательного раствора привело к снижению общего содержания примесей в биоэтаноле-сырце на 20 % за счет снижения доли ацетальдегида и эфиров (в сумме в ~1,8 раза), при этом содержание сивушных спиртов увеличивается в 1,2 раза, что объясняется внесением азотистых веществ, которые стимулируют образование сивушных масел [Yarovenko, 1999; Sanchez, 2020; Sanchez, 2019]; содержание метанола увеличилось в 1,8 раз, но, из-за крайне малой его концентрации, это не повлияло на изменение общей суммы примесей.

Двукратная дистилляция биоэтанола-сырца в бражной колонне и укрепление до 92 об.% позволила в ~6-9 раз снизить общее содержание в них примесей, практически полностью удалить альдегиды и эфиры – до концентрации менее 0,15 г/л, и снизить концентрацию сивушных масел до 0,85 г/л, с преимущественным содержанием 1-пропанола, изопропанола и изобутанола (**2в**). Из-за исходно-

го преобладания сивушных спиртов в биоэтаноле-сырце, их остаточное содержание в дистилляте **2в** было в 1,4-1,5 раз больше чем в образце **1в**. Проведенная в настоящей работе двукратная дистилляция позволила ~30 раз эффективнее удалить альдегиды и эфиры, чем сивушные масла. Средняя эффективность очистки биоэтанола-сырца от альдегидов и эфиров составила ~98%, от сивушных спиртов ~72%. В результате дистилляции исходного ~5%-го биоэтанола произошло своего рода концентрированию сивушных масел и метанола (рис.3б).

После ректификации эффект добавления питательного раствора выражался в повышении общего содержания сивушных масел на 12 %, главным образом за счет 1-пропанола и изобутанола (**2в**). При использовании в процессе очистки биоэтанола не бражной колонны, а полноценной брагоректификационной установки, возможно получение очень чистого биоэтанола с отсутствием маркера технического происхождения спирта – метанола.

Высокая степень очистки биоэтанола нужна не всегда. Описано применение слабо дистиллированного этанол-сырца (50...75 об. %) в последующих процессах его каталитической конверсии в этилен или водород [[Bilal 2017](#); [Sanchez, 2019](#)]. Оптимизация питательной среды может стать актуальной стратегией производства образцов биоэтанола с заданными профилями примесей [[Sanchez, 2020](#)]. Образцы биоэтанола после двукратной очистки в бражной колонне **1в** и **2в** были использованы при получении этилена (п. 3.9).

Корректное сравнение качества биоэтанола, полученного в разных работах, затруднено: в большинстве работ качество биоэтанола не обсуждается [[Zhang, 2018](#); [Kang, 2019](#); [Dubis, 2017](#)], либо не сообщаются методы получения биоэтанола [[Habe, 2013](#); [Styarini 2013](#)]; крепость биоэтанола в разных работах сильно варьирует [[Habe, 2013](#); [Styarini, 2013](#); [Mahsenzadeh, 2017](#); [Le Valant, 2008](#); [Lazar 2019](#)]. Топливный биоэтанол из волокна масличной пальмы имел крепость ~99,5мас. % [[Styarini, 2013](#)] и содержал ~1,5 г/л органических примесей в пересчёте на безводный этанол. Топливный биоэтанол из соломы крепостью ~99,5 об.%, [[Habe, 2013](#)], содержал ~12,3 г/л примесей. В другой работе биоэтанол из соломы пшеницы, укрепленный до 42 об. % [[Lazar, 2013](#)], содержал ~100.2 г/л примесей, а укреп-

ленный до 72 об. % – 24,6 г/л примесей. Преобладающими примесями биоэтанола являются 1-пропанол, изобутанол и изоамилол, а содержание метанола в них варьировала от 0,9 до 3,0 г/л. В образцах биоэтанола из мискантуса обнаружено в 2-16 раз меньше примесей и значительно меньше метанола и сивушных масел, чем описано в литературе [[Styarini, 2013](#); [Habe, 2013](#); [Lazar, 2013](#)]. Это объясняется в первую очередь использованием азотнокислой предобработки мискантуса и мягкими условиями ферментативного гидролиза. В работе [[Yang, 2015](#)] азотная кислота использована как реагент для химического гидролиза мискантуса, что привело к образованию фурфурола и органических кислот в гидролизной среде.

4.9 Применение биоэтанола для получения этилена методом каталитической дегидратации

Работа выполнялась в соответствии с Соглашением о сотрудничестве между ИПХЭТ СО РАН и Институтом катализа им. Г.К. Борескова СО РАН. Образцы биоэтанола получены в ИПХЭТ СО РАН на опытно-промышленном производстве, этилен получен из биоэтанола в ИК СО РАН в группе комплексных технологических проектов.

Каталитическую дегидратацию ~92 об. % биоэтанола в этилен проводили в изотермическом проточном реакторе, при атмосферном давлении и температуре 400 °С, использовался модифицированный кислотой алюмооксидный катализатор разработки ИК им. Г.К. Борескова. Методика эксперимента приведена в работе [[Banzaraktsaeva, 2019](#)].

Активность алюмооксидного катализатора зависит как от концентрации примеси, так и от природы этой примеси [[Banzaraktsaeva, 2020](#); [Valant 2008](#)].

Выход этилена из субстрата 1, полученного предобработкой шелухи овса азотной кислотой, составил 55 кг/т шелухи овса в лабораторной установке или 67 кг/т шелухи овса в пересчете на оптимальные условия в пилотной установке. Выход этилена из субстрата 2, полученного предобработкой шелухи овса гидрок-

сидом натрия, составил 39 кг/т шелухи овса в лабораторной установке или 55 кг/т шелухи овса в пересчете на оптимальные условия в пилотной установке.

Потеря выхода этилена ~20 % в случае предобработки сырья гидроксидом натрия связана с наличием остаточных ионов натрия: в образце биоэтанола концентрация ионов натрия составила ~0,6 мкг/л. При обработке шелухи овса гидроксидом натрия содержание сивушных масел и альдегидной фракции было ~10 раз выше, чем при обработке сырья азотной кислотой. Однако эти примеси не определяют выход этилена при дегидратации.

Установлено, что если общее содержание органических примесей в биоэтаноле менее 1 г/л, то образуется меньшее количество побочных продуктов, обеспечивая лучшее качество этилена, за пределами этого уровня примесей наблюдался либо более высокий выход побочных продуктов, либо более низкое качество этилена. Зависимость верна как на модельном образце этилового спирта [[Banzaraktsaeva, 2020](#)], так и на опытных образцах биоэтанола из мискантуса.

Выход сухого этилена составляет соответственно 110,4 кг/т и 115,1 кг/т мискантуса в условиях дегидратации образцов биоэтанола, полученных без добавки питательных солей и с добавкой питательных солей, соответственно. В пересчете на пилотные условия в трубчатом реакторе [[Banzaraktsaeva, 2019](#)], где выход этилена был на 8 % выше, чем в настоящей работе, выход абсолютизированного этилена в расчете на 1 т мискантуса составит 122,1 кг.

Выход этилена из мискантуса ~40 % превосходит выход этилена из шелухи овса, что объясняется большим выходом биоэтанола из мискантуса, чем из шелухи овса.

В Приложении 3 приведены Акты внедрения образцов биоэтанола, предоставленных ИПХЭТ СО РАН, в качестве сырья для процесса каталитической дегидратации в этилен.

4.10 Технико-экономическая оценка разработанной технологии биоэтанола из шелухи овса и мискантуса

Проектная производственная калькуляция себестоимости биоэтанола выполнена согласно [Ильин, 2004; Волков, 2013; Бухалков, 1995; Миляева, 2007]. Валовый выпуск биоэтанола составит 3 028 160 дал /год или 10 000 дал/сутки.

По данным Алтайкрайстата в Алтайском крае ежегодно собирается ~ 1,1 млн. т овса (в России 5 млн.т. [Бюллетени...2020], в мире 22 млн.т. [United...2021]), что в пересчете на шелуху овса составляет 0,31 млн. т. Это может обеспечить получение 5 580 000 дал биоэтанола, но перевозить шелуху овса на такие большие расстояния нецелесообразно (площадь Алтайского края составляет 160 000 км²), так как масса перевозимых грузов будет низкой, а объём – очень большим, так как насыпная плотность шелухи очень низкая 100-150 кг/м³. Поэтому более целесообразно применить комбинированный подход и 3-5 месяца в качестве сырья использовать шелуху овса, а 7-9 месяцев – мискантус. Использование нескольких видов целлюлозосодержащего сырья практикуется на действующих заводах в США и Европе, смешивать разные виды сырья в одном производственном цикле не рекомендуется [Giuliano, 2016; Baldini, 2017; Zhang, 2018].

В табл. 4.12 приведена смета затрат на сырьё и материалы. Закупочная цена мискантуса в 10 раз выше, чем стоимость шелухи овса, что вносит существенный вклад в общую смету. Однако, так как выход биоэтанола из мискантуса выше, чем из шелухи овса, наблюдается снижения вклада самых дорогостоящих реагентов – ферментных препаратов.

В табл. 4.15 приведена проектная производственная калькуляция себестоимости биоэтанола из шелухи овса и мискантуса на единицу продукции и годовой выпуск. Повышение выхода биоэтанола из мискантуса по сравнению с выходом из шелухи овса привела к сокращению расходов на содержание и эксплуатации оборудования ~29 %, электроэнергии ~20 %, водоснабжения и водоотведения ~16 %, в результате чего снизилась себестоимость производства ~ на 7 руб/л или на 6 %.

Таблица 4.14 – Смета затрат на сырьё и материалы (биоэтанол)

1 Сырьё и материалы на технологические нужды					
Статьи затрат	Единиц а измере ния	Норма расхода на 1 л биоэтано ла	Цена реагента, руб	Затраты	
				на 1 л биоэтано ла руб.	на валовый выпуск, руб.
Шелуха овса (18 дал/т)					
Шелуха овса	кг	5,56	0,5	2,78	84 182 848
Вода техническая	м ³	0,026	9,8	0,25	757 040
Кислота азотная 60 %	кг	0,370	16,7	6,18	187 140 288
Целлолюкс-А	кг	0,007	1100	7,70	233 168 320
Ультрафло-Коре	кг	0,007	1300	9,10	275 562 560
Активатор брожения	кг	0,004	900	3,60	109 013 760
Итого				29,61	896 638 176
Мискантус (26 дал/т)					
Мискантус	кг	3,85	5,0	19,25	582 920 800
Вода техническая	м ³	0,018	9,8	0,18	534 167
Кислота азотная 60 %	кг	0,26	16,7	4,34	131 422 144
Целлолюкс-А	кг	0,005	1100	5,50	166 548 800
Ультрафло-Коре	кг	0,005	1300	6,50	196 830 400
Активатор брожения	кг	0,004	900	3,6	109 013 760
Итого				39,37	1 192 186 590

Самый значимый вклад в снижение производственной себестоимости биоэтанола вносит выпуск попутной продукции: углекислого газа (~ 6% от себестоимости производства) и комбинированного лигногуминового удобрения (52-56 % от себестоимости производства). На 1 т перепарабываемого сырья приходится 2,2 т комбинированного лигногуминового удобрения. Применение комплексной переработки целлюлозосодержащего сырья позволило получить приемлемые цены на товарный биоэтанол, расчётная рентабельность составила 20 %.

Цена биоэтанола из шелухи овса составит 622 руб./дал, или 3,14 \$/галлон (на сентябрь 2020 г), биоэтанола из мискантуса – 538,4 руб./дал, или 2,72 \$/галлон

(курс доллара на апрель 2022 г ~75 руб/\$). Сопоставим цены с литературными данными (табл. 4.16).

Таблица 4.15 – Проектная производственная калькуляция себестоимости биоэтанола из шелухи овса и мискантуса на единицу продукции и годовой выпуск

Статьи затрат	выпуск биоэтанола из шелухи овса (18 дал/т)		выпуск биоэтанола из мискантуса (26 дал/т)	
	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	29,61	896 638 176	39,37	1 192 186 590
Электроэнергия на технологические нужды	21,52	651 660 032	15,86	480 266 176
Водоснабжение и водоотведение на технологические нужды	9,18	277 985 088	7,81	236 499 296
Заработная плата сотрудников	8,75	265 000 000	8,75	265 000 000
Отчисления на социальное страхование ОПР	2,36	71 550 000	2,36	71 550 000
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	32,18	974 461 888	22,53	682 244 448
Цеховые и общезаводские расходы	9,04	273 745 664	9,04	273 745 664
Себестоимость производства	112,64	3 410 919 424	105,72	3 201 370 752
Попутная продукция (углекислый газ) (вычит.)	6,75	204 400 800	6,75	204 400 800
Попутная продукция (удобрение) (вычит.)	58,80	1 780 558 080	58,80	1 780 558 080
Производственная себестоимость	47,09	1 425 960 544	40,17	1 216 411 872
Коммерческие расходы	4,7	141 323 520	4,7	141 323 520
Коммерческая себестоимость	51,79	1 568 284 064	44,87	1 358 735 392
Цена (без НДС и акциза)	62,15	1 851 719 840	53,84	1 630 361 344

При использовании шелухи овса цена биоэтанола выше только по сравнению с биоэтанолом из багассы и соломы пшеницы; при использовании мискантуса – только багассы. Это очень хороший результат, учитывая высокие энергозатраты в РФ. Разработанная технология соответствует ведущему мировому уровню.

Таблица 4.16 – Цена целлюлозного биоэтанола в некоторых странах

Поз.	Сырьевой источник, компания, страна, год	Цена, \$/галлон биоэтанола
1	Багасса (жом сахарного тростника), «Raizen», Бразилия, 2016 [Lux...2020]	2,17 2,35*
2	Кукурузная солома, «Abengoa», США, 2016 [Lux...2020]	4,55 4,92*
3	Кукурузная солома, «DuPont», США, 2016 [Lux...2020]	3,31 3,58*
4	Солома пшеницы, Мексика, 2013 (проект) [Sanchez, 2013]	3,75 4,14*
5	Солома пшеницы и других зерновых, «Clariant», Румыния, 2018 [Scott...2020]	2,65 2,74*
Примечание: * – цена на апрель 2022 г., расчет проведен с помощью калькулятора инфляции: https://fxtop.com/		

ГЛАВА 5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА СРЕДАХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ

5.1 Исследование влияния условий культивирования *Medusomyces gisevii* Sa-12 на выход бактериальной наноцеллюлозы

Целесообразность применения симбиотических культур для биосинтеза БНЦ обоснована в п. 1.7.1.4. В работах [Юркевич, 2002; Кутышенко, 2002] хорошо исследована физиология и метаболизм культуры *Medusomyces gisevii*, показано, что она обладает высоким адаптивным потенциалом (выдерживает действие тяжелой воды и холодового стресса). Однако, биосинтез БНЦ не был исследован. Исследования влияния условий культивирования на выход БНЦ для конкретного продуцента являются базовым этапом в создании технологии производства [Campano, 2016].

Зависимость выхода БНЦ от активной кислотности среды

Биосинтез БНЦ исследовали при начальных значениях рН среды 3,0, 4,0, 5,0 и 6,0. Значения рН поддерживали с помощью раствора молочной кислоты и раствора аммиака, измеряя их величину один раз в сут. В качестве контроля использовалась та же среда с нативным рН, значения которого фиксировались в ходе эксперимента, но не корректировались. Культивирование проводилось в течение 11 сут.

Изменения уровня рН и концентрации глюкозы при культивировании *Medusomyces gisevii* Sa-12 на средах с различными начальными значениями рН приведены на рис.5.1. Во всех вариантах (кроме рН 3,0) в процессе культивирования значение рН снижалось, особенно значительно при начальном рН 5,0 и 6,0. При начальном рН 3,0 происходило повышение значения, то есть симбиотическая культура способна регулировать рН. В контрольном опыте за 5 сут рН снижалось с 4,1 до 3,0. Потребление глюкозы в опытах с поддерживаемым уровнем активной кислотности отличалось от контрольного опыта. При рН 4,0, 5,0 и 6,0 утили-

зация глюкозы полностью заканчивалась на 4 сут, при рН 3,0 – на 8 сут. При рН 5.0 и 6.0 отмечалось газообразование, гель-плёнка отсутствовала, при рН 4 образовались рваные нити БНЦ, покрытые слизью, при рН 3 гель-пленка не образовывалась. Биосинтез БНЦ наблюдали только в контрольном опыте. Можно предположить, что при любых вмешательствах в систему и отклонениях рН от рН в контрольном опыте, глюкоза тратилась не на биосинтез БНЦ, а на поддержание жизнеспособности микроорганизмов. При этом происходил разрыв симбиотических отношений между микроорганизмами и создавались условия, неблагоприятные для биосинтеза БНЦ [Юркевич, 2002].

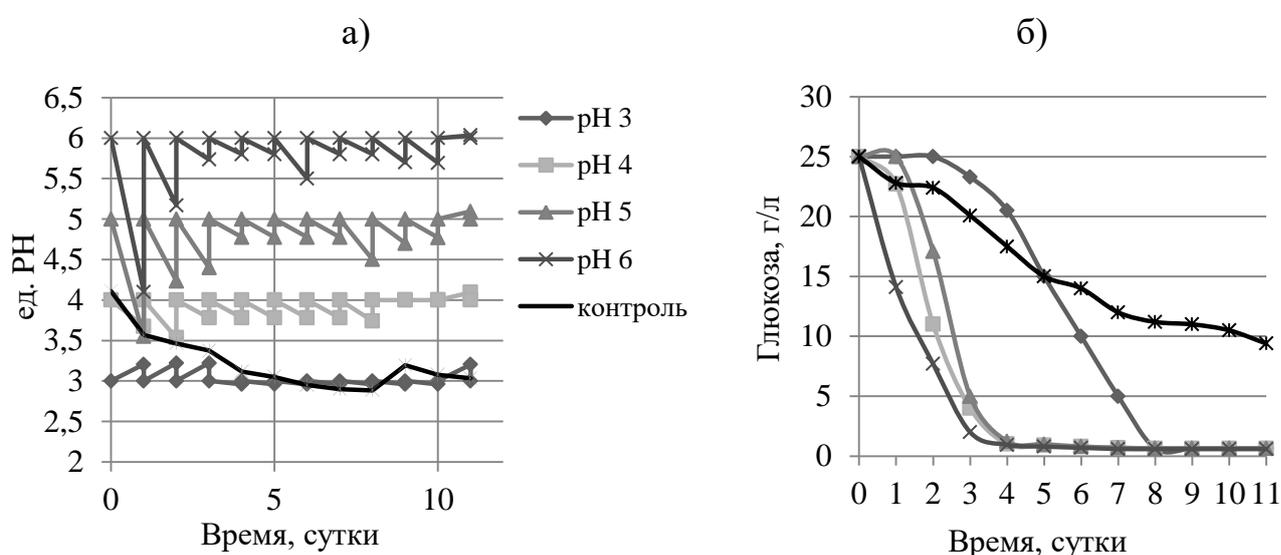


Рисунок 5.1– Изменения уровня активной кислотности (а) и концентрации глюкозы (б) при культивировании *Medusomyces gisevii* Sa-12 на средах с различным уровнем рН

Можно сделать вывод, что культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 в коррективке рН не нуждалась, а вмешательство в процесс культивирования неблагоприятно влияло на биосинтез БНЦ.

Зависимость выхода БЦ от начальной концентрации глюкозы в среде

Выход БНЦ исследовали при начальных концентрациях глюкозы в питательной среде: 5, 10, 15, 20, 25, 35, 45, 55 г/л. Культивирование проводилось в течение 21 сут.

Зависимость численности микроорганизмов от начальной концентрации глюкозы в среде представлена на рис. 5.2. Численность дрожжевых клеток в течение всего процесса культивирования изменялась прямо пропорционально концентрации глюкозы в среде. Увеличение количества дрожжевых клеток происходило до 8 сут при концентрации глюкозы в питательной среде в пределах 5-45 г/л, при концентрации 55 г/л – до 10 сут, затем наступала стадия отмирания.

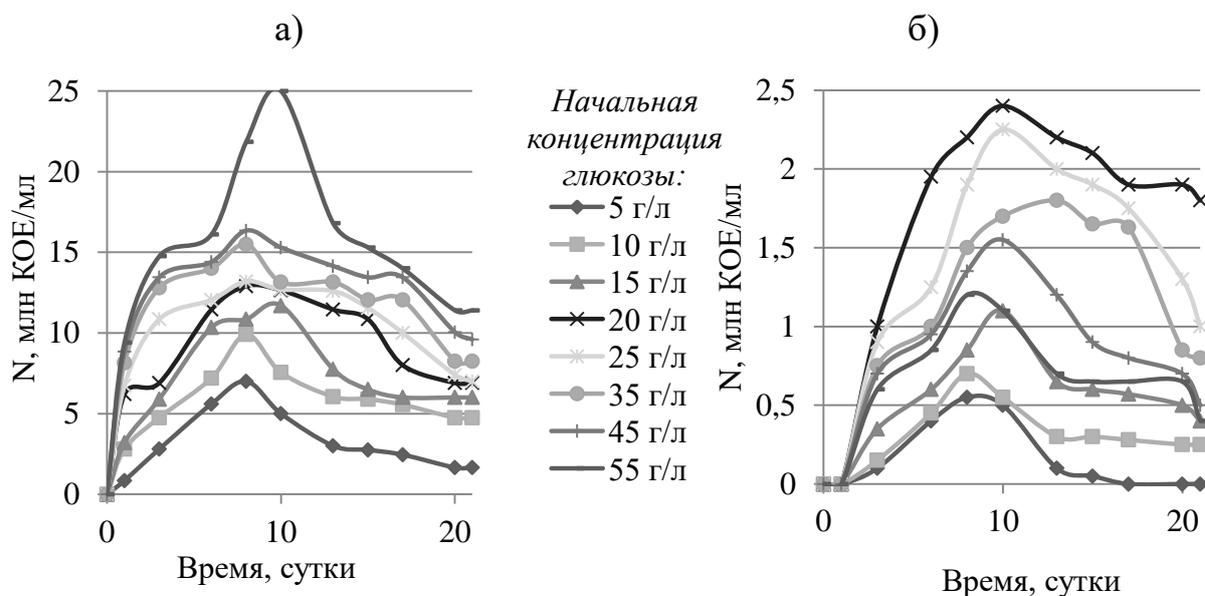


Рисунок 5.2 – Зависимость численности микроорганизмов от начальной концентрации глюкозы в среде: а – дрожжей, б – уксуснокислых бактерий

Зависимость численности уксуснокислых бактерий от концентрации глюкозы в питательной среде не однозначна. Максимальная численность наблюдалась при концентрациях глюкозы в питательной среде 20 и 25 г/л, при концентрациях ниже и выше этих значений количество уксуснокислых бактерий снижалось, причем тем существеннее, чем больше было отклонение от этих значений. Вероятно, концентрация глюкозы ниже 20 г/л была недостаточной для роста микроорганизмов, вследствие чего их численность уменьшалась. При концентрации глюкозы в питательной среде выше 25 г/л субстрат расходовался на образование побочных продуктов – органических кислот и др., которые могли оказывать негативное влияние на общий рост сообщества из-за чего выход БНЦ падал. Чем выше начальная концентрация глюкозы в питательной среде (рис. 5.3 а), тем сильнее снижался рН в процессе культивирования, так при начальной концентрации глюкозы 5 и 10 г/л

pH к концу культивирования составил 3,2, при 45 и 55 г/л – 2,3. Из литературы известно, что избыточная концентрация глюкозы в питательной среде приводит к активации синтеза побочного продукта – глюконовой кислоты (через 2, 5 - кетоглюконат) для продуцента *Gluonoacetobacter xylinum* [Ross, 1991]. Для симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* побочными продуктами кроме глюконовой кислоты, могут быть этанол, уксусная кислота, глицерин и ряд других соединений янтарная, молочная, яблочная кислоты [Юркевич, 2002].

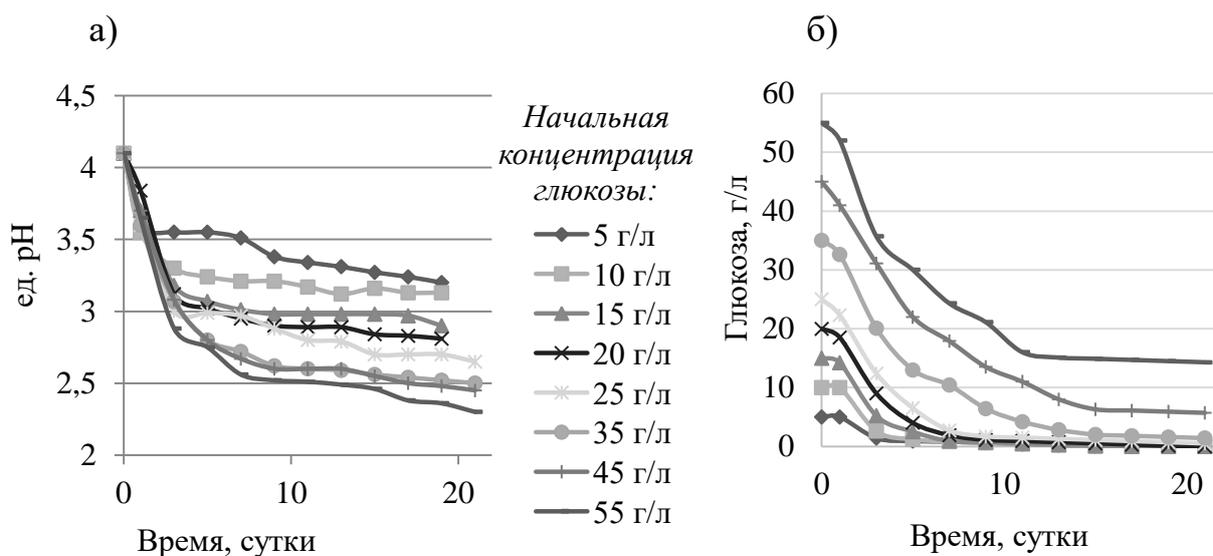


Рисунок 5.3. Зависимость активной кислотности (а) и концентрации глюкозы (б) от начальной концентрации глюкозы в среде

Чем ниже начальная концентрация глюкозы в среде, тем быстрее происходило её потребление: при начальных концентрациях 5 , 10 и 15 г/л полное потребление глюкозы происходило на 6 сут культивирования, при концентрациях 20 и 25 г/л – на 10 сут, при 35 г/л – на 17 сут. При концентрациях 45 и 55 г/л полной утилизации не наблюдалось, в питательной среде и через 21 сут культивирования: в среде оставалось 6 и 14 г/л глюкозы соответственно (рис. 5.3 б). Остаточное количество глюкозы в питательной среде может указывать на снижение процессов жизнедеятельности микроорганизмов, связанное с субстратным ингибированием.

На рис. 5.4 представлена зависимость выхода БЦ от начальной концентрации глюкозы в питательной среде на 7 и 21 сут культивирования. Зависимость выхода БНЦ от начальной концентрации глюкозы в питательных средах можно

расположить в ряд по мере убывания: 20>25>35>45>55>15>10>5. Необходимо отметить, что биосинтез БНЦ сопряжен с численностью уксуснокислых бактерий, а условия культивирования, отвечающие их максимуму, соответствуют максимуму выхода БНЦ. Эта простая зависимость может служить маркером эффективности процесса и использоваться в качестве контроля производства БНЦ.

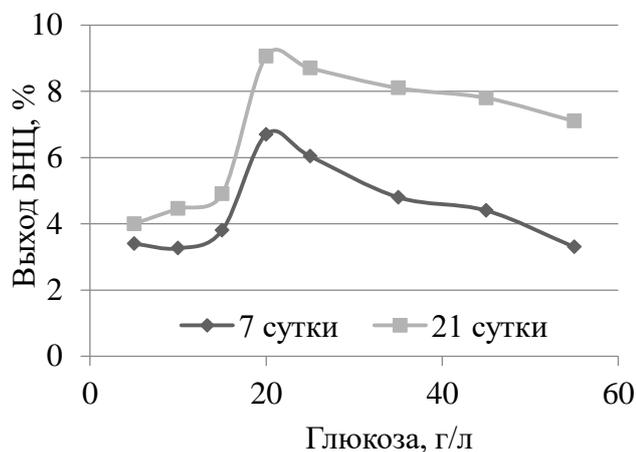


Рисунок 5.4 – Зависимость выхода БНЦ от начальной концентрации глюкозы в среде

Наибольший выход БНЦ получен при начальной концентрации глюкозы в питательной среде 20 и 25 г/л и составил на 7 сут культивирования 6,8 и 6,1 %, на 21 сут – 9,0 и 8,7 % от концентрации глюкозы соответственно. Следует отметить, что основной синтез БНЦ происходил в первые 7-10 сут культивирования, с 10 по 21 сут выход БНЦ увеличивался всего на 3,2–2,6%, следовательно, длительное культивирование было нецелесообразным. Кроме того, при длительном культивировании наблюдалось ухудшение состояния пленок: потеря эластичности, неравномерность роста, водянистость, расслаиваемость. Ухудшение качества пленок БНЦ увеличивало продолжительность их очистки. Таким образом, оптимальная концентрация глюкозы, обеспечивающая максимальный выход БНЦ, – 20-25 г/л.

Зависимость выхода БНЦ от температуры

Температуру культивирования меняли в пределах от 21 до 36 °С с шагом 3 °С. Продолжительность культивирования составляла 24 сут.

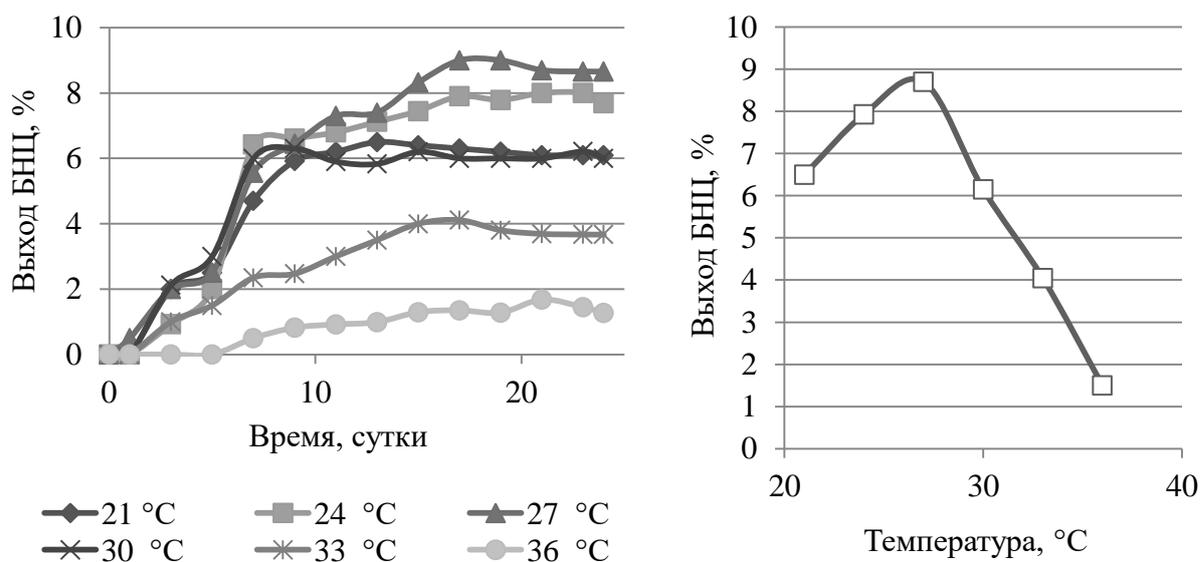


Рисунок 5.5 – Зависимости выхода БНЦ от температуры: а – с 0 по 24 сутки; б – на 16 сутки культивирования

Наиболее благоприятной для биосинтеза была температура от 24 до 27 °С, так как именно в этом диапазоне получен наибольший выход БНЦ – 9%. При температуре 30 °С и выше отмечалось значительное снижение выхода БНЦ, например, при 36 °С выход составил 1,5%, в 6 раз ниже, чем при 27 °С. Вероятно, при температуре выше 30 °С могут происходить конформационные изменения ферментов, входящих в целлюлозосинтезирующий комплекс [Синицын, 1995]. При 21 °С выход БНЦ также снижался и составлял 6,5% (рис. 5.5). Необходимо отметить, что температурные оптимумы для утилизации субстрата и биосинтеза БНЦ не совпадали: скорость утилизации субстрата была прямо пропорциональна увеличению температуры в исследованном диапазоне.

Зависимость выхода БНЦ от соотношения объёма питательной среды к объёму воздуха

Различное соотношение объема питательной среды к объёму воздуха (1:10, 1:5, 1:1, 7:3 и 10:1) в ёмкости объемом 500 мл создавали, используя различные объёмы среды: 50, 100, 250, 350 и 500 мл соответственно. Продолжительность культивирования составляла в этой серии экспериментов – 7 суток.

Максимальный выход БНЦ (10,4%) был получен при соотношении объёма питательной среды к объёму воздуха 1:10, при этом в среде оставалось максимальное количество неутилизированной глюкозы – 4,7 г/л. Содержание непотребленной глюкозы уменьшалось в 2 раза, составляя 2,1–2,4 г/л, при испытании других вариантов соотношений. Минимальный выход БНЦ (1,2%) наблюдали при соотношении объёмов питательной среды и воздуха 10:1 (рис. 5.6). Таким образом, аэрация является лимитирующим фактором при биосинтезе БНЦ, недостаток воздуха приводил к кислородному голоданию уксуснокислых бактерий и критическому снижению выхода БНЦ.

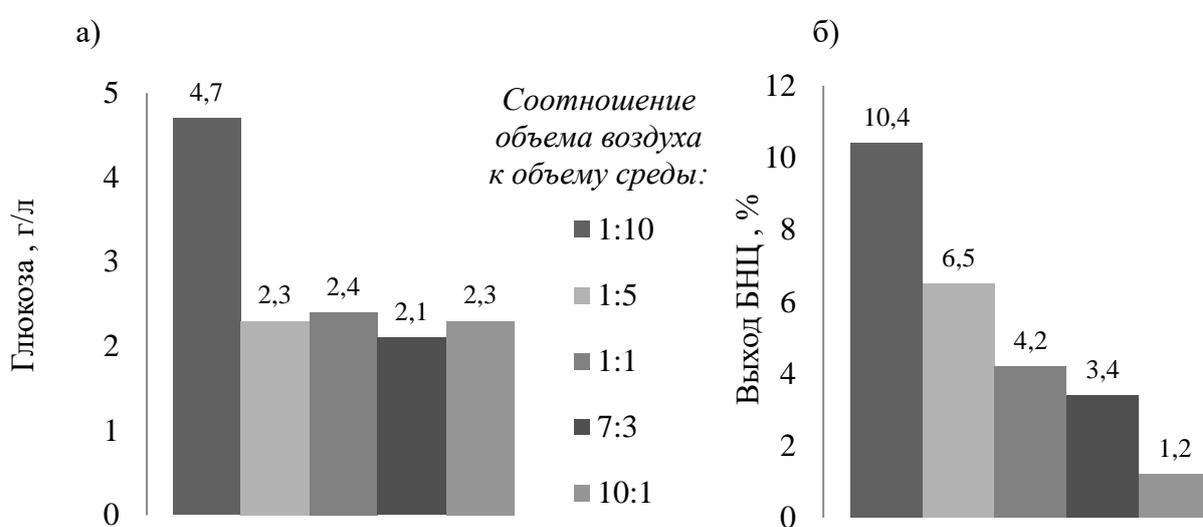


Рисунок 5.6 – Зависимости остаточной концентрации глюкозы в среде (а) и выхода БНЦ (б) от соотношения объёма питательной среды к объёму воздуха

Зависимость выхода БНЦ от содержания экстрактивных веществ черного чая

При изучении влияния экстрактивных веществ черного чая на биосинтез БНЦ, готовились различные варианты питательных сред, в которых в 1 л дистиллированной воды добавляли от 1 г до 30 г сухого черного байхового чая с шагом 5 г. Поскольку массовое содержание водорастворимых экстрактивных веществ в черном байховом чае составляло 32 % (мас.), то в исследуемых вариантах содержалось экстрактивных веществ: от 1.6 до 9.6 г с шагом 1.6 г. Продолжительность культивирования составила 21 сут.

При содержании экстрактивных веществ черного чая в питательной среде 3,2–9,6 г/л на 7 сут остаточная концентрация глюкозы составляла менее 2 г/л. При содержании в среде 0,32 г/л экстрактивных веществ потребление субстрата протекало гораздо медленнее и даже через 21 сут глюкоза не была полностью утилизирована (рис.5.7, а), что свидетельствовало о замедлении процессов жизнедеятельности микроорганизмов, которое возможно зависело от содержания таких компонентов чая, как кофеин, теофиллин и теобромин и др., стимулирующих биосинтез БНЦ [Юркевич, 2002].

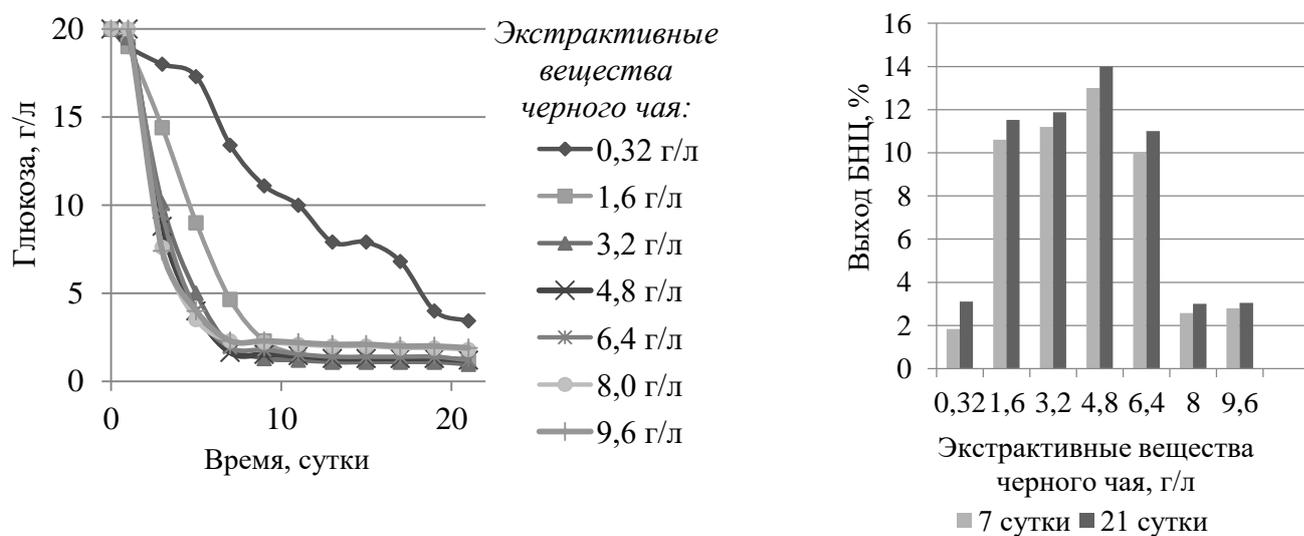


Рисунок 5.7 – Зависимости концентрации глюкозы (а) и выхода БНЦ (б) от концентрации экстрактивных веществ черного чая в среде

Зависимость выхода БНЦ от концентрации экстрактивных веществ черного чая в среде (рис. 5.7, б) имела явно выраженный максимум при содержании экстрактивных веществ черного чая в пределах 1,6–6,4 г/л, максимальный выход на 21 сут культивирования составил от 10% до 13% от концентрации субстрата – глюкозы. При концентрациях экстрактивных веществ ниже указанного диапазона выход БНЦ снижался до 1,8%, а при концентрациях выше 6,4 г/л – до 2,8%.

Зависимость выхода БНЦ от дозировки инокулята

На рис. 5.8 представлены утилизация глюкозы и выход БНЦ в процессе культивирования *Medusomyces gisevii* Sa-12 в зависимости от дозировки инокулята. Из представленных данных видно, что с увеличением дозировки инокулята

интенсифицируется процесс утилизации субстрата: если для дозировки инокулята 5 % (об.) константа утилизации субстрата равна $0,193 \text{ сут}^{-1}$, то для дозировки инокулята 20 % (об.) – $0,229 \text{ сут}^{-1}$. Во всех вариантах дозировки инокулята основное потребление глюкозы происходило с 0 по 10 сутки, это связано с её потреблением клетками микроорганизмов и их размножением, этот период соответствует логарифмической фазе роста дрожжей и уксуснокислых бактерий (рис. не приводится). После 10 суток происходила медленная утилизация субстрата, очевидно, глюкоза использовалась для метаболизма поддержания микроорганизмов.

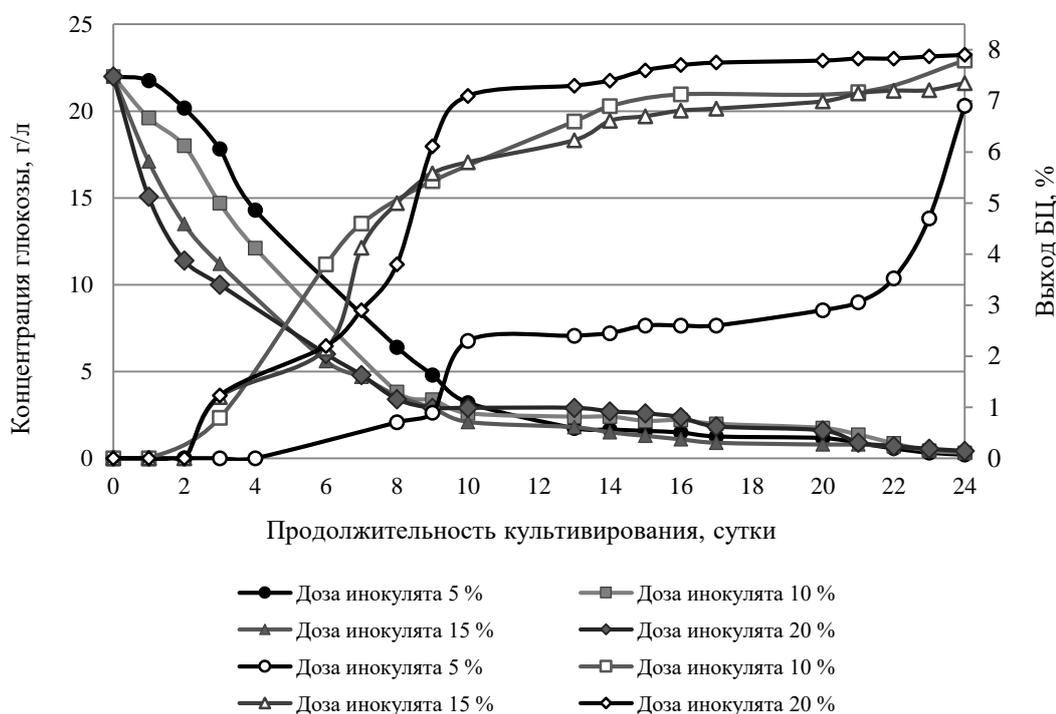


Рис. 5.8 – Изменение концентрации глюкозы и выхода БЦ в зависимости от дозировки инокулята

При внесении инокулята в количестве 5 % (об.) от объема питательной среды тонкая гель-пленка БЦ образовалась только на 8 сутки культивирования. В данном варианте процесс прироста БЦ происходил в три этапа: с 8 по 10 сутки выход увеличился до 2,3 %, с 10 по 21 сутки на графике наблюдается плато и с 21 по 24 сутки происходило дальнейшее увеличение прироста БЦ до 6,9 %. Это можно объяснить образованием новых тонких слоёв БЦ на поверхности культуральной среды новыми генерациями уксуснокислых бактерий. Для дозировок

инокулята 10 % (об.) и 15 % (об.) кривые имеют экспоненциальный характер и выходят на плато примерно на 16 сутки, далее наблюдается очень медленный прирост БНЦ. При дозировке инокулята 20 % (об.) основной прирост БНЦ происходил с 3 по 10 сутки культивирования – до 7,1 %. В период с 10 по 24 сутки происходило медленное увеличение выхода БНЦ, видимых процессов деструкции не наблюдалось. Через 24 суток культивирования при использовании дозировки инокулята 10 % (об.) выход БНЦ составил 7,8 %, для дозировки 15 % (об.) – 7,4 %, для дозировки 20 % (об.) – 7,9 %. На основании рис. 2 можно сделать вывод, что дозировка инокулята 5 % (об.) является недостаточной для *Medusomyces gisevii* Sa-12: при такой дозировке глюкоза тратится на синтез биомассы как дрожжей, так и уксуснокислых бактерий, а их высокие удельные скорости роста приводят к торможению биосинтеза БНЦ.

Представленные в литературе данные свидетельствуют, что для различных продуцентов количество инокулята, обеспечивающее наибольший выход БНЦ может варьировать в диапазоне от 5 % до 20 % (об.). Например, в работе [Brandes, 2018] описано влияние дозировок инокулята 10 % (об.), 20 % (об.) и 30 % (об.) на выход БНЦ при использовании продуцента *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 и показано, что максимальный выход БНЦ получен при дозировке инокулята 20 % (об.). Исследование влияния дозировки инокулята от 4 (об.) до 12 % (об.) при использовании продуцента *Gluconacetobacter xylinum* ATCC 10245 показало, что максимальный выход БНЦ получен при дозировке инокулята 8 % (об.) [Abdelraofa, 2019]. Для продуцента *Gluconacetobacter sp.* RV28 в диапазоне от 1 % (об.) до 10 % (об.) наиболее предпочтительной дозировкой инокулята, обеспечивающей максимальный выход БНЦ, оказалась дозировка 5 % (об.). Снижение или повышение указанной дозировки инокулята приводило к снижению выхода БНЦ [Rangaswamy, 2015]. Для продуцента *Gluconacetobacter xylinus* CH001 в диапазоне от 4 % (об.) до 12 % (об.) наиболее предпочтительной является доза инокулята 10 % (об.) [Huang, 2015].

В нашем случае для симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 использование дозировок инокулята от 10 % до 20 % (об.) дает сопоставимые ре-

зультаты. С целью экономии инокулята рекомендуется использовать дозировку 10 %. Если стоит задача ускоренного биосинтеза БНЦ, то рекомендуется использовать дозировку инокулята 20 %, так как это позволит сократить длительность культивирования в 2 раза.

Влияние дозировки инокулята и продолжительности культивирования на степень полимеризации (СП) целлюлозы в образцах БНЦ приведено на рис. 5.9

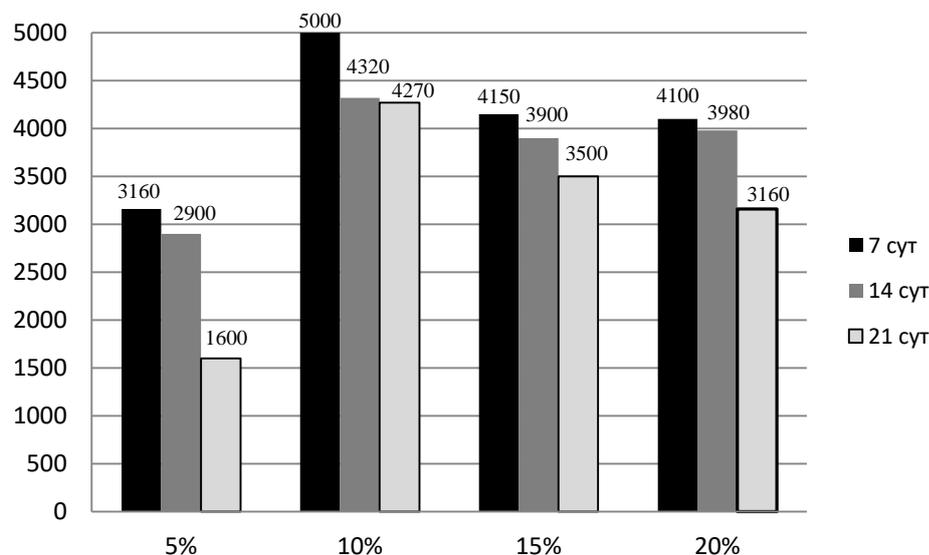


Рис. 5.9 – Влияние дозировки инокулята и продолжительности культивирования на степень полимеризации целлюлозы в образцах БНЦ

Для всех вариантов опытов на 7 сутки биосинтеза получены высокие СП БНЦ: от 3160 до 5000, что характерно для БНЦ. Полученные в нашей работе СП хорошо согласуются с литературными данными: для разных продуцентов БНЦ она варьирует от 1600 до 6000 [Zugenmaier, 2008; Shi, 2013; 30 Hassan, 2015; Tsouko, 2015].

Из анализа данных (рис. 5.9) следует, что максимальное значение СП целлюлозы достигнуто на седьмые сутки при биосинтезе БНЦ при дозировке инокулята 10 % (об.) – 5000. Дозировки 15 % (об.) и 20 % (об.) показали очень близкие результаты по СП: 4150 и 4100 соответственно. Для дозировки инокулята 5 % (об.) наблюдалось наименьшее значение СП – 3160, что в 1,6 раза ниже, чем для дозировки инокулята 10 % (об.). Полученные результаты можно объяснить особенностями метаболизма симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12:

низкая дозировка инокулята приводит не только к нецелевому расходованию субстрата на синтез биомассы, вместо синтеза БНЦ, но и к снижению качества синтезируемой БНЦ.

Для всех вариантов с увеличением продолжительности биосинтеза от 7 до 21 суток происходит снижение СП целлюлозы. При этом для дозировки инокулята 5 % (об.) снижение составляет 49,4 % (от максимальной для этого варианта СП на 7 суток биосинтеза), для дозировки 10 % (об.) – 14,6 %, для дозировки 15 % (об.) – 15,7 %, для дозировки 20 % (об.) – 22,9 %. Итак, по снижению СП в процессе биосинтеза БНЦ, можно сделать вывод, что дозировка инокулята 5 % (об.) является недостаточной, а дозировка 20 % (об.) – избыточной.

Снижение СП в процессе биосинтеза может быть связано с тем, что в первые 7 суток культивирования происходит биосинтез высокополимеризованной БНЦ, при культивировании с 7 суток и далее синтезируется низкополимеризованные слои БНЦ, что снижает усредненную СП целлюлозы в образцах БНЦ. Физиологически такая версия объясняется известным фактом: поскольку уксуснокислые бактерии являются строгими аэробами, то биосинтез новых слоёв БНЦ осуществляется на поверхности уже образованных [Campano, 2016; Gama, 2016]. Но с течением времени ухудшается состояние популяции: исчерпываются питательные вещества, накапливаются продукты метаболизма, поэтому снижается и СП синтезируемой БНЦ. Тенденция снижения степени полимеризации целлюлозы при увеличении времени культивирования описана в работе [Shi, 2013], однако авторы просто констатируют факт и затрудняются с объяснением. Отметим, в мировой практике мало изучены вопросы длительного культивирования при получении БНЦ, так как продолжительность этого процесса стараются сократить. На наш взгляд, высказанная версия снижения СП более жизнеспособна, чем версия снижения СП, объясняемая деструкцией БНЦ в процессе длительного культивирования, высказанная в 70-е годы XX в. [Bikales, 1971], поскольку общая масса БНЦ при длительном культивировании продолжает увеличиваться.

В процессе исследования дозировки инокулята нам удалось найти интересную закономерность зависимости СП образцов БНЦ от дозировки инокулята и

продолжительности биосинтеза БНЦ и обнаружить оптимальную дозировку инокулята – 10 % (об), при которой можно получить БНЦ с максимальной СП, мало снижающейся в процессе длительного культивирования. Это открывает возможность регулировать процесс биосинтеза БНЦ и направленно получать БНЦ с заданными свойствами.

Таким образом, при биосинтезе БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 высокий выход БНЦ (7,5-8,0 %) обеспечивается при дозировке инокулята 10-20 % (об.). При использовании дозировки инокулята 20 % (об.) продолжительность культивирования сокращается в два раза.

Впервые доказана зависимость степени полимеризации БНЦ от дозировки инокулята и продолжительности биосинтеза БНЦ, установлена дозировка инокулята, позволяющая получить максимальную степень полимеризации 5000 – 10 % (об.).

5.2 Особенности биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы в зависимости от способа предварительной химической обработки сырья

5.2.1 Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы на средах, полученных из шелухи овса

Изменение количества клеток микроорганизмов

Рис. 5.10 показывает изменение количества дрожжей (а) и уксуснокислых бактерий (б) в процессе культивирования *Medusomyces gisevii* Sa-12 на питательных средах, приготовленных из ферментативных гидролизатов из шелухи овса. В процессе биосинтеза БНЦ культура микроорганизмов претерпевает все этапы, характерные для микробиологических процессов и проходит фазы экспоненциального и линейного роста, стационарную фазу и фазу отмирания. Однако при этом, симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* имеет ряд особенностей. Для

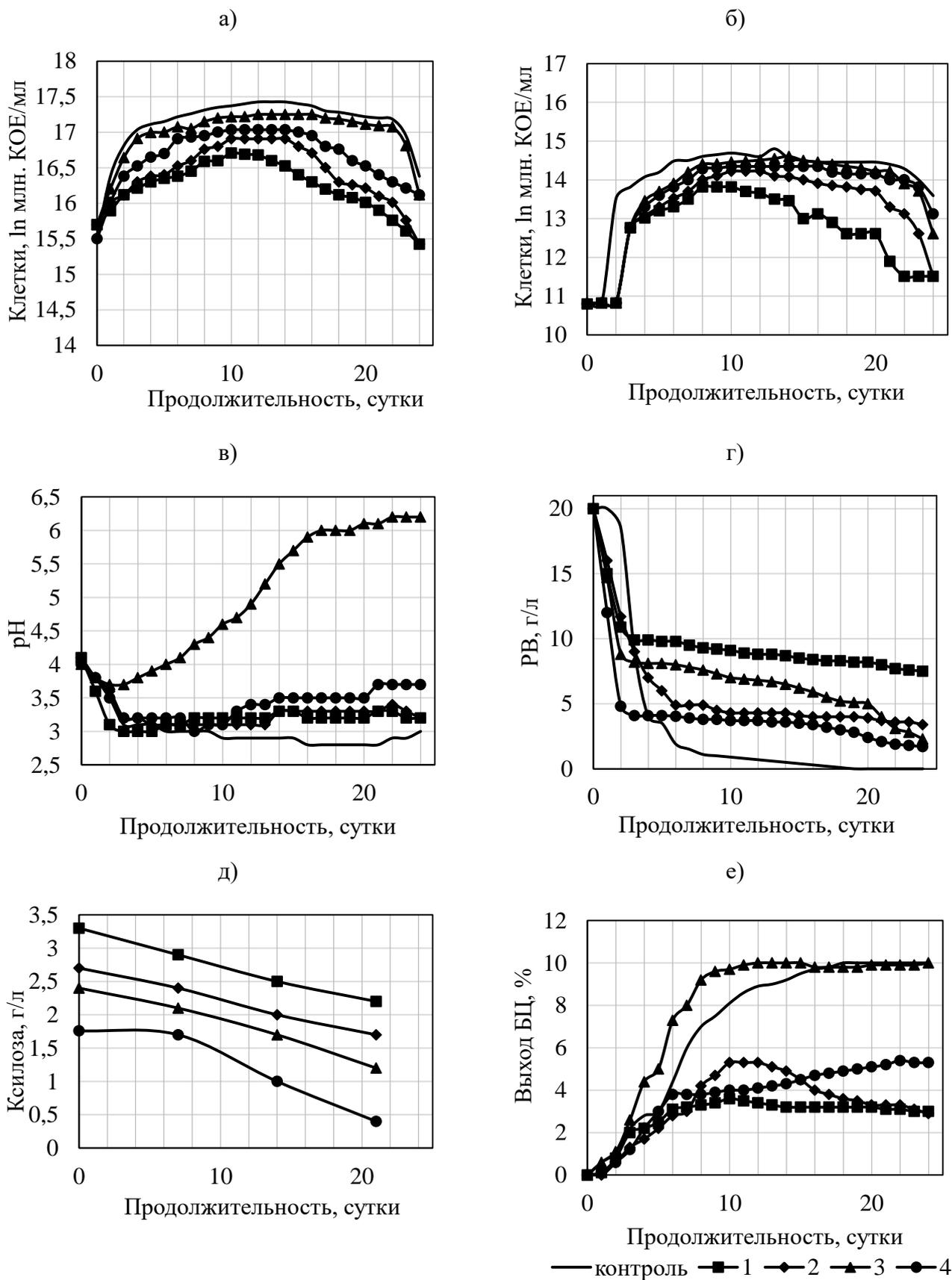


Рисунок 5.10 – Биосинтез БНЦ на средах ферментативных гидролизатов шелухи овса: а) количество:дрожжей; б) количество уксуснокислых бактерий; в) активная кислотность; г) концентрация РВ; д) концентрация ксилозы; е) выход БНЦ

уксуснокислых бактерий первые трое суток выражена лаг-фаза, в то время, как дрожжи сразу выходят на экспоненциальную фазу развития. Численность дрожжей на порядок выше, чем численность уксуснокислых бактерий на всех видах питательных сред, включая контрольную синтетическую среду. Эти данные подтверждают высказанное в литературе предположение, что у симбиотического организма сформировался особый вариант обмена веществ, элементы которого локализованы у разных партнеров. Дрожжи перерабатывают редуцирующие вещества в этанол, потребляемый уксуснокислыми бактериями, те, в свою очередь, синтезируют гель-пленку БНЦ для защиты дрожжей от окружающей среды [Yurkevich, 2002].

По общей численности микроорганизмов в питательных средах в порядке убывания можно построить ряд: контроль = 3 > 4 > 2 > 1. Высокая численность микроорганизмов на питательной среде 3 шелухи овса свидетельствует о биологической доброкачественности данной среды и отсутствию в ней ингибиторов.

Известно, что синтез БНЦ стимулируется, когда концентрация клеток увеличивается и клетки переходят в состояние кворума [Borzani, 1995; Römling, 2015]. Можно предположить, что на данной среде будет наблюдаться эффективный биосинтез БНЦ. Снижение численности микроорганизмов на остальных гидролизных средах свидетельствует о наличии в них ингибиторов биосинтеза БНЦ, появление которых можно связать именно со способом предобработки сырья.

Негативное влияние различных ингибиторов на продуценты БНЦ изучено в работах [Zhang, 2014a; Zhang, 2014b], при этом авторы отмечают, что важными переменными являются индивидуальные особенности штаммов и их способность метаболизировать часть ингибиторов. Кроме того, возможны синергические воздействия различных ингибиторов, что важно для реальных гидролизатов, однако эти эффекты пока что недостаточно изучены [Zou, 2017].

Изменение уровня активной кислотности

На рис. 5.10, в представлено изменение уровня активной кислотности при культивировании *Medusomyces gisevii* Sa-12 на питательных средах, приготовленных из ферментативных гидролизатов из шелухи овса.

Исходное значение рН на питательных средах находилось в диапазоне 4,0-4,1. Как правило при культивировании *Medusomyces gisevii* Sa-12 значение рН снижалось от 3,0 до 3,7. Однако, на ферментативном гидролизате 3, в ходе первых трех суток культивирования значение рН понизилось до 3,6, затем рН повышалось до 6,1, что нехарактерно для процесса биосинтеза БНЦ. Авторы [Yang X., 2013] отмечают аналогичную зависимость при культивировании *Gluconacetobacter xylinus* CH001 на кислотном гидролизате слоновьей травы, однако, как и мы, затрудняются объяснить полученные результаты. Изменение рН в ходе культивирования симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 связано с образованием побочных продуктов, таких как глюконовая кислота, этанол, уксусная кислота, глицерин и кислот (уксусная, янтарная, молочная, яблочная). Предположительно, *Medusomyces gisevii* Sa-12 использует побочные продукты для поддержания нормального метаболизма и жизнедеятельности [Yurkevich, 2002]. Регулирование рН – сложный биохимический процесс и симбиотическая культура самостоятельно с ним справляется. Попытки вмешаться и регулировать рН *Medusomyces gisevii* Sa-12 извне привели к отрицательным результатам, что хорошо согласуется с результатами, полученными при биосинтезе БНЦ индивидуальными штаммами [Li, 2011; Campano, 2016].

Изменение концентрации редуцирующих веществ

На питательных средах ферментативных гидролизатах шелухи овса утилизация РВ происходила в два периода. В первый период быстрая утилизация связана с потреблением РВ дрожжами и их размножением. Высказанное предположение о том, что дрожжи перерабатывают РВ в этанол, который в свою очередь потребляют уксуснокислые клетки [Kurosumi, 2009], представляется справедливым, так как увеличение численности уксуснокислых бактерий наблюдается именно после завершения первого периода потребления РВ. Во второй период РВ медленно расходовались скорее всего для обеспечения метаболизма поддержания симбиотической культуры (рис. 5.10, г).

Анализ изменения концентрации РВ и ксилозы позволяет сделать вывод, что предпочтительным источником углерода для продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12 является глюкоза. В процессе культивирования концентрация ксилозы изменяется незначительно (рис. 5.10, д), однако сам факт снижения концентрации ксилозы указывает, что продуцент *Medusomyces gisevii* Sa-12 способен её утилизировать.

Интересно, что гидролизные среды сильно отличаются по количеству остаточных РВ: для гидролизата 1 остается неиспользованным 7,5 г/л РВ, а для гидролизатов остальных субстратов – 2,5-4 %. Можно предположить наличие ингибиторов в среде 1.

Выход бактериальной целлюлозы

На рисунке 5.10, е показан выход БНЦ в процессе культивирования *Medusomyces gisevii* Sa-12 на питательных средах, приготовленных из ферментативных гидролизатов из шелухи овса. В первые сутки культивирования на поверхности питательных сред не наблюдалось четко выраженной гель-пленки БНЦ.

На питательной среде, полученной из ферментативного гидролизата субстрата 1 (одностадийная обработка азотной кислотой) основной прирост БНЦ происходил с 2 по 6 сутки культивирования – выход БНЦ вырос с 0,8 % до 3,1 %. На 10 сутки культивирования выход БНЦ увеличился до 3,6 %, далее выход БНЦ не увеличивался. Таким образом, выход БНЦ ниже, чем на контрольной среде, в 2,8 раза. Поскольку БНЦ синтезируют уксуснокислые бактерии, следует отметить, что их содержание в данной питательной среде было самым низким (рис. 5.1 б), а остаточное количество редуцирующих веществ высоким – 7,5 г/л через 24 суток культивирования (рис. 5.3 а).

При культивировании *Medusomyces gisevii* Sa-12 на питательной среде, приготовленной из ферментативного гидролизата субстрата 2 (одностадийная обработка гидроксидом натрия) основной прирост БНЦ происходил с 3 по 9 сутки культивирования – выход БНЦ увеличился с 1,3 % до 5,3 %. С 9 по 13 сутки вы-

ход БНЦ не увеличивался. С 13 по 24 сутки масса БНЦ снизилась на 45 %, что указывало на идущие процессы деструкции. Выход БНЦ по сравнению с выходом БНЦ на синтетической среде снизился в 1,9 раза.

При использовании питательной среды, приготовленной из ферментативного гидролизата субстрата 3, полученного двухстадийной обработкой шелухи овса (кислота, щелочь) основной прирост биомассы происходил с 3 по 8 сутки культивирования – выход БНЦ увеличился с 2,6 % до 9,2 %. Выход с 8 по 24 сутки увеличился до 10,0 %. Таким образом, получен выход, тождественный выходу БНЦ на синтетической питательной среде. Высокий выход БНЦ подтвердил предположение о биологической доброкачественности данной питательной среды, сделанное на основании высокой численности микроорганизмов в ней в процессе культивирования. Более того, в соответствии с рис. 5.4, на данной гидролизной среде максимальный выход БНЦ достигнут ранее, чем на синтетической питательной среде (7 сутки против 17 суток).

Биосинтез БНЦ на питательной среде, приготовленной из ферментативного гидролизата субстрата 4, полученного двухстадийной обработкой шелухи овса (щелочь, кислота) прошел следующим образом: основной прирост БНЦ происходил с 3 по 6 сутки культивирования – выход БНЦ увеличился с 1,2 % до 3,8 %; с 6 по 24 сутки выход БНЦ увеличился до 5,3 %; процессов деструкции БНЦ не наблюдалось. Выход БНЦ по сравнению с выходом БНЦ на синтетической питательной средой снижен в 1,8 раза.

Таким образом, по выходу БНЦ питательные среды можно в порядке возрастания расположить в такой же ряд, в каком среды были расположены по численности микроорганизмов: контроль = 3 > 4 > 2 > 1. Сравнивая графики роста микроорганизмов с графиком прироста биомассы, можно отметить, что рост БНЦ сопряжен с ростом уксуснокислых бактерий, что совпадает с литературными данными, описанными для индивидуальных штаммов [Borzani, 1995; Römling, 2015].

В представленных опытах использовано 4 вида предобработки сырья разбавленными растворами азотной кислоты и /или гидроксида натрия при атмосферном давлении. Самый низкий выход БНЦ получен на среде из пальпа 1, по-

лученного одностадийной обработкой азотной кислотой. Таким образом, именно способ получения пальпа является причиной снижения выхода БНЦ. Как было показано ранее при данной обработке происходит нитрование и окисление лигнина, в результате чего образуется водорастворимый нитрованный лигнин и водонерастворимый нитрованный лигнин. Водорастворимый лигнин в количестве 0,01 % может ингибировать ферментативный гидролиз, а водонерастворимый лигнин в количестве 12,5 % не оказывает негативного влияния на этот процесс. Зная этот факт, мы особое внимание уделили отмывке субстрата 1 от водорастворимого лигнина. Можно предположить, что небольшие количества водорастворимого лигнина не оказали негативного воздействия на целлюлазный комплекс ферментативного препарата (выход редуцирующих веществ для данного субстрата очень высок), однако ингибировали более чувствительные целлюлозосинтезирующие ферменты уксуснокислых бактерий. Кроме того, отрицательное воздействие на целлюлозосинтезирующие ферменты могут оказывать и нитрат-ионы. Об этом свидетельствует снижение выхода БНЦ на питательной среде, полученной из пальпа 4, полученного двухстадийной обработкой (щелочь, кислота): именно обработка пальпа азотной кислотой на второй стадии приводит к снижению выхода БНЦ, здесь не могут участвовать продукты нитрования лигнина, так как на первой стадии предобработки была проведена делигнификация сырья. Пониженный выход БНЦ и ее последующая деструкция на ферментативном гидролизате продукта щелочной делигнификации, предположительно, можно объяснить недостаточной промывкой от ионов натрия, которые очень сложно удаляются и, как видим, их наличие также оказывает ингибирующее действие на уксуснокислые бактерии и синтез гель-пленки БНЦ.

Таким образом, для прогноза выхода БНЦ недостаточно определения реакционной способности к ферментативному гидролизу, т.к. целлюлазы менее чувствительны к действию ингибиторов, чем целлюлозосинтезирующие ферменты, продуцируемые уксуснокислыми бактериями. Критерием адекватности может служить только практика: только субстрат 3, полученный двухстадийной обработкой шелухи овса (кислота, щелочь) позволяет получить доброкачественную

питательную среду на основе ферментативного гидролизата и добиться высокого выхода БНЦ. При использовании данного гидролизата не требуется проведения детоксификации, не нужно вносить в среду дополнительно питательные соли и витамины. Использование экстракта чёрного чая достаточно для обеспечения синтеза БНЦ в нестерильных условиях с помощью продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12. Это очень интересный факт, доказывающий адаптивность и неприхотливость используемой симбиотической культуры и позволяющий сделать оптимистический прогноз для использования данного продуцента в условиях реального производства в нестерильных условиях. Необходимость такого подхода при работе с альтернативными субстратами уже обсуждалась [Marsh, 2014].

5.2.2 Биосинтез бактериальной целлюлозы на средах, полученных из мискантуса

Изменение концентрации редуцирующих веществ

Кривые утилизации РВ, представленные на рис.5.11,а имеют типичный характер. В первый период быстрая утилизация РВ связана с увеличением количества клеток в питательной среде. Во второй период РВ медленно расходовались на метаболические процессы.

Изменение уровня активной кислотности

Исходное значение рН на питательных средах ферментативных гидролизатов мискантуса находилось в диапазоне 4,0-4,6. В процессе культивирования *Medusomyces gisevii* Sa-12 значение рН снижалось до 3,1-3,6 (рис. 5.11, б), при этом минимальные значения рН наблюдались в контрольной среде.

Изменение количества клеток микроорганизмов

Численность дрожжей на 1-2 порядка выше, чем численность уксуснокислых бактерий на всех видах питательных сред (рис 5.11, в, г). Это можно объяснить особенностями взаимоотношений микроорганизмов в симбиотической куль-

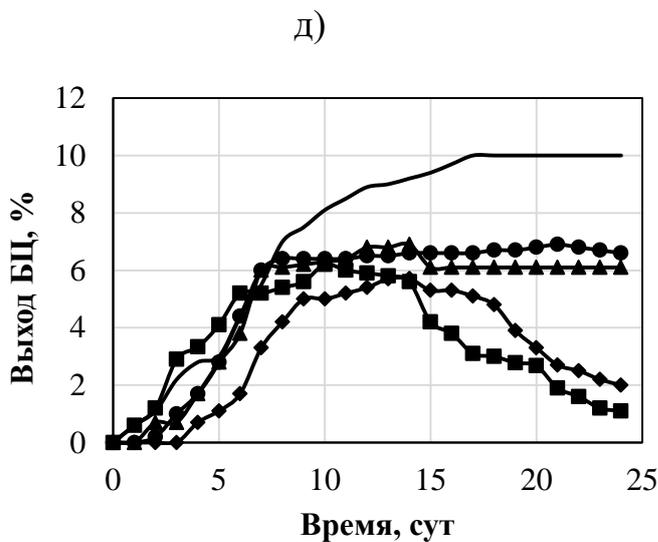
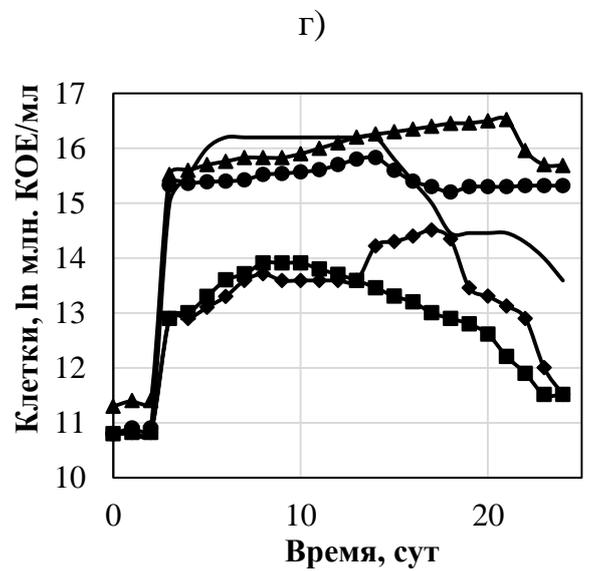
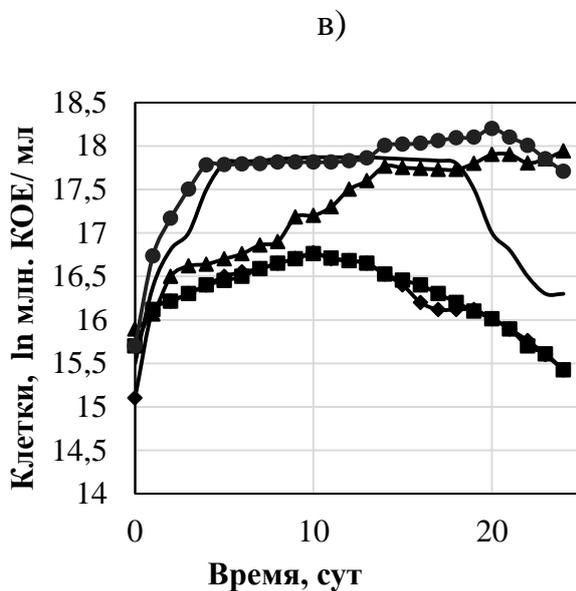
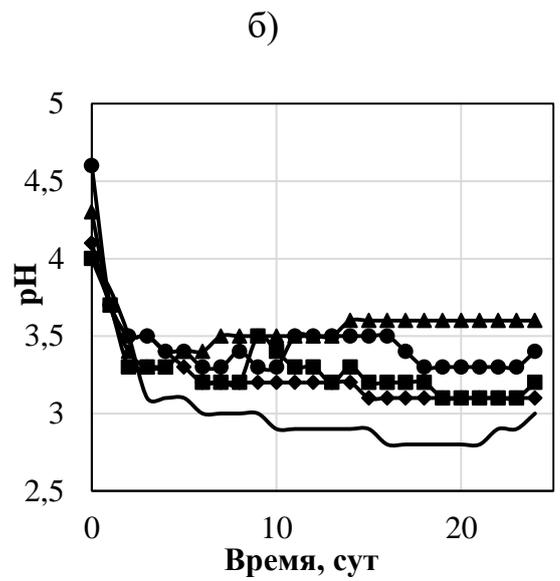
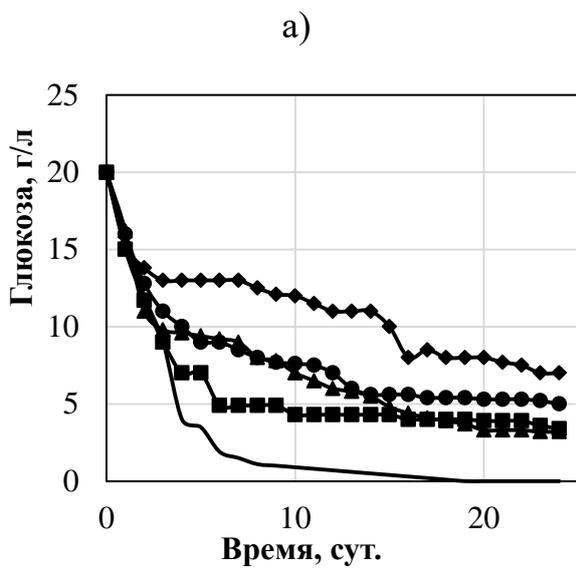


Рисунок 5.11 – Биосинтез БНЦ на средах ферментативных гидролизатов мискантуса

- а) концентрация глюкозы;
 б) активная кислотность;
 в) количество дрожжей;
 г) количество уксуснокислых бактерий;
 д) выход БНЦ

— контроль —■— 1 —◆— 2 —▲— 3 —●— 4

туре: дрожжи перерабатывают глюкозу в этанол, далее этанол потребляют уксуснокислые бактерии, при этом бактерии синтезируют гель-пленку БНЦ для защиты от окружающей среды [Yurkevich, 2002a]. Для уксуснокислых бактерий первые двое суток выражена лаг-фаза, в то время, как дрожжи сразу выходят на экспоненциальную фазу развития.

Известно, что численность уксуснокислых бактерий является маркером синтеза БНЦ и синтез БНЦ стимулируется, когда концентрация клеток увеличивается и клетки переходят в состояние кворума [Borzani, 1995]. По численности уксуснокислых бактерий в питательных средах в порядке убывания можно построить ряд (в соответствии с субстратами): контроль=3=4>2=1. Высокая численность уксуснокислых бактерий на питательных средах, полученных двухстадийной обработкой мискантуса свидетельствует о биологической доброкачественности данных сред и отсутствии в них ингибиторов. Можно предположить, что на данных средах будет наблюдаться эффективный биосинтез БНЦ. Снижение численности микроорганизмов на гидролизных средах, полученных одностадийной химической обработкой свидетельствует о наличии в них ингибиторов биосинтеза БНЦ, появление которых можно связать именно со способом предобработки сырья.

Выход бактериальной наноцеллюлозы

По выходу БНЦ питательные среды можно расположить в порядке убывания в ряд (рис.5.11, д): контроль>3=4>2=1. Через 14 сут крайние значения выхода БНЦ в представленном ряду составили 5,6 % и 6,9 % соответственно. При дальнейшем продолжении культивирования с 14 до 24 сут. на средах, полученных двустадийной предобработкой мискантуса (субстраты 3 и 4) продуктивность сохраняется, а на средах, полученных одностадийной предобработкой (субстраты 1 и 2) снижается. Снижение составляет до 78 % по сравнению с максимальным значением, что указывает на процессы деструкции, которые, вероятно, обусловлены ингибиторами, оставшимися в питательной среде после ферментативного гидролиза субстратов, полученных одностадийно. На среде из субстрата 1 ингибитора-

ми биосинтеза БНЦ могут быть продукты нитрования лигнина, хотя и не наблюдается ингибирования ферментативного гидролиза. На среде из субстрата 2, в роли ингибитора могут выступать ионы натрия, от которых сложно отмыть пальп [Kim L., 2016].

Выход БНЦ на питательных средах, полученных двустадийной предобработкой мискантуса (субстраты 3 и 4) составили 1,1 % и 2, 0%, что на 30 % ниже, чем на контрольной среде. Это свидетельствует о том, что ни одна из представленных ферментативных сред не является биологически доброкачественной – это минус. Мы надеемся, что решением существующей проблемы может стать адаптация продуцента к ферментативным средам, как описано в [Vasconcellos, 2019]. Описана успешная адаптация *Medusomyces gisevii* Sa-12 к холодному стрессу [Yurkevich, 2002 a] и тяжелой воде [Yurkevich, 2002 b], поэтому потенциал адаптации к ферментативным средам выглядит оптимистично. Плюсом исследований является успешность биосинтеза БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 в нестерильных условиях.

5.2.3 Сравнение процесса биосинтеза БНЦ на ферментативных гидролизатах шелухи овса и мискантуса

В результате исследования процесса биосинтеза БНЦ на ферментативных гидролизатах шелухи овса и мискантуса с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 установлено следующее:

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

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

ферментативном гидролизате субстрата 3 из шелухи овса в ходе первых трех суток культивирования значение рН понизилось до 3,6, затем рН повышалось до 6,1, что нехарактерно для процесса биосинтеза БНЦ;

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

4) По выходу БНЦ питательные среды можно расположить в порядке убывания в ряды: $3 > 4 > 2 > 1$ для обоих видов сырья. Через 14 сут. для шелухи овса крайние значения выхода БНЦ в представленном ряду составили 9,0 % и 3,2 %; для мискантуса – 6,1 % и 5,0 % соответственно. При дальнейшем продолжении культивирования с 14 до 24 сут. на средах, полученных двустадийной обработкой (3 и 4) выход сохраняется, а на средах, полученных одностадийной обработкой (1 и 2) снижается для обоих видов сырья. Снижение составляет от 45 % (для шелухи овса), до 78 % (для мискантуса) что указывает на процессы деструкции, которое обусловлено ингибиторами, оставшимися в питательной среде после ферментативного гидролиза субстратов, полученных одностадийно.

Мискантусные среды обеспечили меньший выход БНЦ на 32-36 %, чем на средах шелухи овса (на питательных средах, приготовленных из субстратов, полученных из сырья аналогичным образом). Так как различалось только сырьё, различия связаны с химическим составом сырья. В литературе мискантус рассматривается как источник фенольных веществ и стеролов [Villaverde, 2009], скорее всего ингибиторы, содержащиеся в мискантусных средах имеют фенольную природу. Максимальный выход БНЦ достигнут на среде из субстрата 3 шелухи овса и соответствует выходу БНЦ на синтетической питательной среде – 9 % от концентрации РВ в среде.

5.2.4 Сравнение полученных результатов с мировым опытом

Мировые примеры получения БНЦ из целлюлозосодержащего сырья приведены в таблице 5.1. Полученные выходы БНЦ относительно невысоки: лучший результат 10 % на субстрате 3 из шелухи овса, что значительно меньше, чем полученные [Hong, 2012; Yang, 2013; Chen, 2013; Cavka, 2013; Tsouko, 2015; Guo, 2016; Jahan, 2017; Dubey, 2018; Hussain, 2019]. В значительной степени это связано с используемым продуцентом – симбиотической культурой *Medusomyces gisevii Sa-12*, очевидно, что часть субстрата расходуется нецелевым образом, на метаболизм не синтезирующих БНЦ микроорганизмов, входящих в состав консорциума. Однако, это оправданные расходы, так как достигается эксклюзивное качество БНЦ, о чем пойдет речь далее. В тоже время, полученные нами результаты находятся примерно на одном уровне с результатами, приведёнными в таких работах, как [Gomes, 2013; Cheng, 2017; Kuo, 2017]. Наконец, наши результаты превышают результаты, представленные в работах [Goelzer, 2009; Carreira, 2011, Fan, 2016] несмотря на использование в приведенных работах индивидуальных штаммов.

5.3 Физико-химический анализ бактериальной наноцеллюлозы

5.3.1 Характеристики образцов БНЦ, полученных на питательных средах из шелухи овса

Вопрос исследования характеристик БНЦ, полученных на гидролизных средах имеет первостепенное значение, поскольку, в случае снижения качества БНЦ, полученных на гидролизных средах, их область применения будет весьма ограниченной, поэтому сама целесообразность замены одной среды на другую может быть поставлена под сомнение.

Таблица 5.1 – Выход и продуктивность БНЦ на гидролизных средах целлюлозосодержащего сырья

Сырьё	Предобработка	Продуцент и продолжительность культивирования	Концентрация РВ, г/л	Максимальная концентрация БНЦ, г/л	Выход БНЦ, % на начальную конц. РВ	Выход БНЦ, % на утилизованные РВ	Выход БНЦ, % с учётом 0,9	Ссылка
Стандартная среда Хестрин-Шремма	–	<i>Acetobacter xylinum</i> , 2 сут.	20,0	–	26,0	–	28,89	Hestrin, 1954
Меласса	гидролиз 4 н H ₂ SO ₄ , 120 °С, 20 мин	<i>Acetobacter xylinum</i> subsp. <i>sucrofermentans</i> BPR2001, 80 ч	37,0	5,30	14,4	–	15,90	Bae, 2005
Порошок клубня аморфофаллуса	гидролиз H ₂ SO ₄ , 100°С	<i>Gluconacetobacter xylinum</i> ATCC 23770, 8 сут.	15,0	2,10	–	–	15,56	Hong, 2008
Шелуха риса	ферментативный гидролиз	<i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 23769, 10 сут.	40,0 (без аэрации)	2,42	–	–	6,72	Goelzer 2009
			40,0 (с аэрацией)	1,57	–	–	4,36	
Сульфитный щелок эвкалипта	щелочная	<i>Gluconacetobacter sacchari</i> , 4 сут.	8,33	0,29	–	18,0	3,87	Carreira, 2011
Жом белого винограда	экстракция водой		11,50	0,63	–	24,0	6,09	
Подсырная сыворотка	растворение сухого порошка в воде		5,98	0,10	–	10,0	1,86	
Сырой глицерин	без предобработки		47,00	0,10	–	35,0	0,21	
Старые неокрашенные футболки	ионная жидкость, ферментативный гидролиз	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23770, 14 сут.	17,0	10,80	–	–	70,59	Hong, 2012

Сырьё	Предобработка	Продуцент и продолжительность культивирования	Концентрация РВ, г/л	Максимальная концентрация БНЦ, г/л	Выход БНЦ, % на начальную конц. РВ	Выход БНЦ, % на утилизированные РВ	Выход БНЦ, % с учётом 0,9	Ссылка
Слоновья трава	гидролиз 2,5 % H ₂ SO ₄ , 135°C, 1 ч, детоксификация	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> CN001, 14 сут.	11,8	6,40	54,2	–	60,26	Yang, 2013
Шрот оливок	водная экстракция, 40°C, 2 ч	<i>Gluconacetobacter sacchari</i> , 100 ч	10,01 (нативный)	0,81	9,9	–	7,56	Gomes, 2013
			10,01 (with nitrogen and phosphorus)	1,63	–	–	18,09	
	гидролиз 1 н H ₂ SO ₄ 100°C, 2 ч		11,23 (нативный)	0	–	0		
Солома пшеницы	ионная жидкость, ферментативный гидролиз	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23770, 7 сут.	12,0	8,30	–	–	76,85	Chen, 2013
Отходы волокон сульфатной целлюлозы	ферментативный гидролиз	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23770, 14 сут.	17,4	6,23	22,0	50,0	39,78	Cavka, 2013
Отходы волокон сульфитной целлюлозы			17,8	4,65	17,0	31,0	29,03	
Шрот подсолнечника	ферментация <i>A. oryzae</i>	<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> DSM 15973, 15 сут.	16,6 (глицерин)	13,30	80	–	80	Tsouko, 2015
Отруби	ферментация <i>A. awamori</i>		26,9	13,00	–	53,0	53,70	
Кожура и жом цитрусовых	ферментативный гидролиз	<i>Komagataeibacter xylinus</i> CICC No.10529, 8 сут.	86,7	5,70	–	–	7,30	Fan, 2016

Сырьё	Предобработка	Продуцент и продолжительность культивирования	Концентрация РВ, г/л	Максимальная концентрация БНЦ, г/л	Выход БНЦ, % на начальную конц. РВ	Выход БНЦ, % на утилизированные РВ	Выход БНЦ, % с учётом 0,9	Ссылка
Окрашенные отходы хлопчатобумажного производства	ионная жидкость, ферментативный гидролиз	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23770, 10 сут.	35 (без детоксификации)	13,70	–	81,9	43,49	Guo, 2016
			30 (после детоксификации)	14,20		81,2	52,59	
Стоки ликероводочного завода	без обработки	<i>Gluconacetobacter oboediens</i> , МТСС 5610, 8 сут.	40	8,11	–	–	22,53	Jahan, 2017
Жом дуриана	гидролиз 2 % H ₂ SO ₄ , 1:10; детоксификация	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> CH001, 8 сут.	11,6	2,67	22,98	–	25,57	Luo, 2017
Стебель кукурузы	гидролиз уксусной кислотой, детоксификация	<i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 23767, 7сут.	35,32	2,93	–	–	9,22	Cheng, 2017
Корка апельсина	ферментативный гидролиз в воде	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> , 8 сут.	40,19 (нативный)	0,97	–	3,0	2,68	Kuo, 2017
			39,05 (с азотом)	3,16	–	9,0	8,99	
	37,88 (нативный)		2,32	–	12,0	6,81		
	39,27 (с азотом)		6,13	–	25,0	17,34		
Жом мякоти лайма	водный экстракт	<i>Komagataeibacter europaeus</i> SGP37; периодическая добавка субстрата, 16 сут.	80,04	38,0	–	60,5	52,75	Dubey, 2018
	гидролиз 1% H ₂ SO ₄		82,54	28,9	–	78,0	38,90	
Солома кукурузы	гидротермальная, 195°C, 10 мин	<i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23769, 7 сут., адаптивная эволюция	1,54	0,71	46,0	–	51,11	Vasconcellos, 2019

Сырьё	Предобработка	Продуцент и продолжительность культивирования	Концентрация РВ, г/л	Максимальная концентрация БНЦ, г/л	Выход БНЦ, % на начальную конц. РВ	Выход БНЦ, % на утилизированные РВ	Выход БНЦ, % с учётом 0,9	Ссылка			
Шелуха овса	1	<i>Medusomyces gisevii</i> Sa-12, 10 суток	20,0	0,60	3,0	5,5	3,6	Данная работа			
	2			1,00	5,0	6,5	5,3				
	3			1,80	9,0	13,8	10,00				
	4			0,72	3,6	4,4	4,00				
Мискантус	1					0,90	4,5		5,4	5,0	
	2					1,20	5,4		8,3	5,1	
	3					1,22	5,7		6,8	6,4	
	4					1,24	5,8		7,7	6,3	

Инфракрасная спектроскопия

Таблица 5.2 показывает основные характеристические частоты инфракрасных спектров образцов БНЦ, синтезированных на питательных средах, приготовленных из ферментативных гидролизатов субстратов из шелухи овса.

Таблица 5.2 – Отнесение полос поглощения функциональных групп в образцах БНЦ, полученных на питательных средах из шелухи овса

Отнесение полос поглощения *	Максимум полосы поглощения, см ⁻¹				
	конт- роль	1	2	3	4
ν OH-групп, участвующих в межмолекулярных и внутримолекулярных Н-связях	3429	3384	3438	3432	3419
ν связей в группах СН и СН ₂	2920	2896	2897	2921	2896
δ связей НОН обусловлено присутствием прочно связанной воды	1654 1638	1649 1536	1652 1533	1643 1532	1651 1539
δ групп СН ₂	1430 1375	1428 1362	1428 1362	1431 1375	1428 1361
δ групп ОН в СН ₂ ОН	-	1336 1317	1336 1317	-	1337 1318
δ групп СН ₂ в СН ₂ ОН	1282 1235	1281 1249 1235	1281 1235	1281 1249	1281 1248 1235
δ групп ОН	-	1204	1205	1204	1204
ν связей С-О (характерные для полисахаридов полосы, обусловленные наличием ацетильных связей С-О-С и связей С-О в спиртах)	1165 1060	1165 1072	1164 1107 1017	1102	1164 1073
β -1,4 связи	899	898	898	899	898

* ν – валентные колебания, δ – деформационные колебания

ИК-спектры образцов БНЦ показали, что независимо от используемой питательной среды все образцы имели одинаковую химическую структуру, которая соответствует химической структуре БНЦ, полученной на синтетической питательной среде. Спектральные характеристики для полученных образцов БНЦ соответствуют спектральным характеристикам, обсуждаемым в литературе [Brown, 2000; Coban, 2011; Jonas, 1998] и являются подтверждением, что полученные образцы являются целлюлозами.

ферментативных гидролизатов. Этот фундаментальный результат имеет крайне важное значение для её практических приложений.

Рентгеноструктурный анализ

Дифракционные картины образцов БЦ, полученных разными способами предобработки шелухи овса, снятые на отражение и на просвет, приведены на рис. 5.13. Во всех случаях получены дифракционные картины, характерные для БЦ [French, 2014; Goelzer, 2009; Pacheco, 2017; Vazquez, 2013; Urbina, 2021]. На представленных дифрактограммах указаны индексы основных отражений целлюлозы Ia. Снятые на отражение и прохождение дифрактограммы резко различаются. Например, на дифрактограммах, зарегистрированных в геометрии на прохождение, ослаблено или даже отсутствует отражение (100). БНЦ также характеризуется предпочтительной ориентацией вокруг оси волокна таким образом, что плоскости (100) находятся в плоскости держателя образца, однако плоскости (010) более или менее перпендикулярны плоскостям (100) и обычно выполняют условие Брэгга при прохождении пучка через образец. Таким образом, в образцах имеется сильная предпочтительная ориентация кристаллитов (называемая материаловедами текстурой), что характерно именно для БНЦ [French, 2014].

В таблице 5.3 представлены результаты расчета концентрации фаз Ia и Ib и степени кристалличности образцов БНЦ, полученных на синтетической питательной среде и на средах из ферментативных гидролизатов плодовых оболочек овса. Степень кристалличности образцов БНЦ, синтезированных продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12, на синтетической питательной среде и на ферментативных гидролизатах шелухи овса, составила от 86 % до 93 %.

Преобладание низкосимметричной фазы Ia свидетельствуют о бактериальном происхождении целлюлозы. Триклинная модификация целлюлозы Ia менее стабильна, чем моноклинная фаза целлюлозы Ib, поэтому её реакционная способность выше и, как следствие, фаза Ia будет участком первичной реакции [Ahvenainen, 2016].

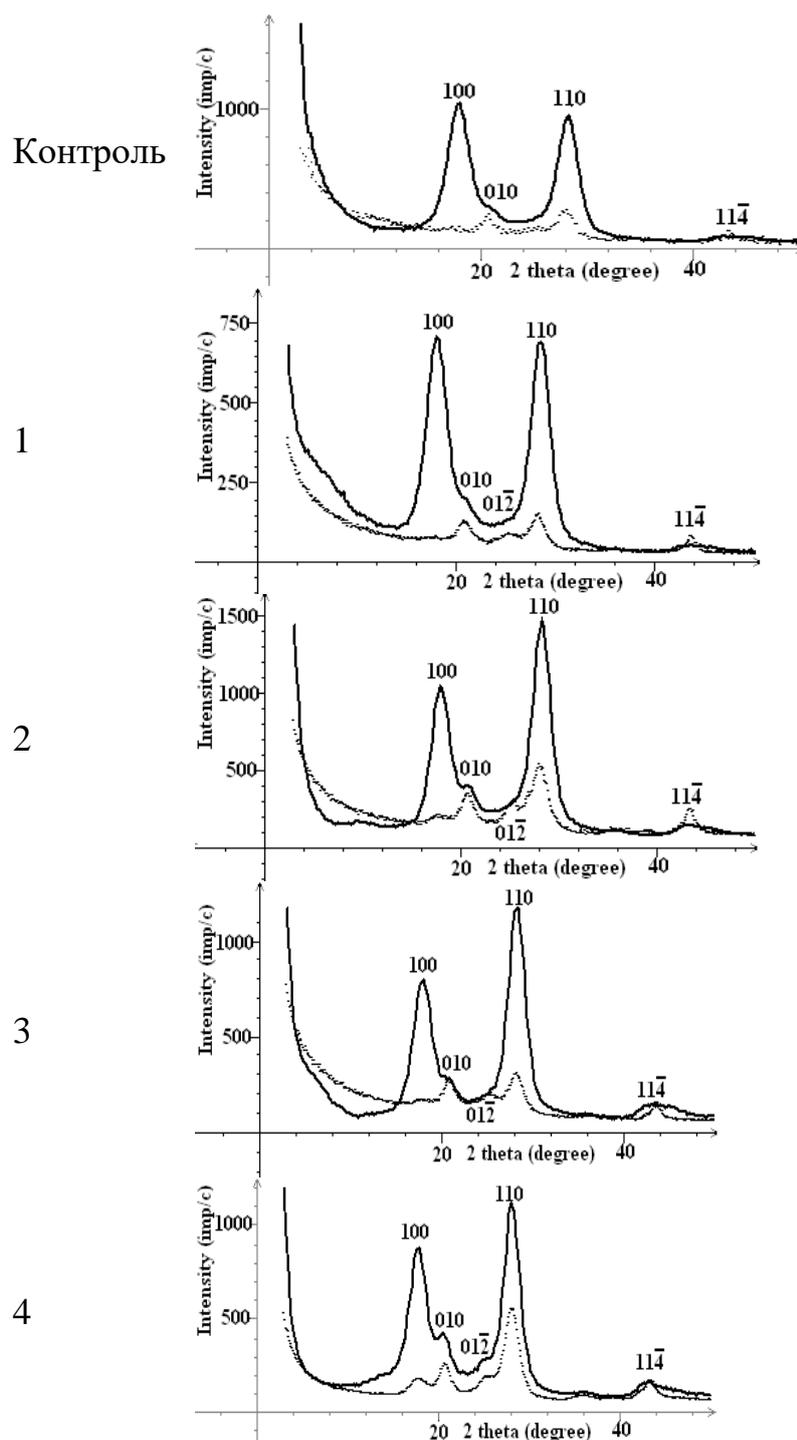


Рисунок 5.13 – Дифрактограммы образцов БНЦ, на средах, полученных из шелухи овса, и на контрольной среде, отснятые на отражение и прохождение

Одной из проблем замены синтетической питательной среды на нетрадиционные среды из растительного сырья является снижение степени кристалличности и снижение содержания полиморфа Ia в образцах БНЦ. Например, при замене синтетической среды на ферментативный гидролизат плодовых оболочек риса для

биосинтеза БНЦ степень кристалличности снизилась до 28 % [Goelzer, 2009], а использование виноградного жмыха снижает содержание полиморфа I α в образцах БНЦ от 72 % до 56 % [Vazquez, 2013]. В нашем случае установлено, что продуцент *Medusomyces gisevii* Sa-12 независимо от состава питательной среды синтезирует высококристаллическую БНЦ с преобладанием низкосимметричной фазы I α . На всех питательных средах, приготовленных из ферментативных гидролизатов наблюдается некоторое увеличение степени кристалличности по сравнению с контрольной синтетической средой, однако это увеличение близко к погрешности измерения и его можно считать несущественным [Алешина, 2001].

Таблица 5.3 – Основные физико-химические характеристики образцов БНЦ, полученных на средах из шелухи овса

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

Впервые получен результат независимости свойств БНЦ от состава ферментативной среды. Исследователи отмечают как факт снижения степени кристалличности БНЦ при переходе на альтернативные среды [Campano, 2016; Goelzer, 2009], так и факт повышения степени кристалличности [Algar, 2015; Kiziltas, 2015; Urbina, 2017; Wu, 2013]. Данный результат мы связываем исключительно со свойствами продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12: именно устойчивость симбиоза обеспечивает самостандартизацию качества БНЦ независимо от состава питательной среды.

Степень полимеризации

Степени полимеризации образцов БНЦ, полученных на питательных средах из шелухи овса по сравнению с синтетической питательной среде представлены в таблице 5.3. В порядке убывания степени полимеризации образцов БНЦ, полученных на питательных средах из пальпов, можно построить ряд: контроль > 4 > 3 > 2 > 1. Следует отметить, что степень полимеризации образцов БНЦ, полученных из субстратов, предобработанных одностадийно, ниже, чем из субстратов, предобработанных двустадийно.

Для всех образцов после 7 суток культивирования наблюдается снижение степени полимеризации. Подобная зависимость описана в работе [Shi, 2013], однако авторы затрудняются с объяснением данного факта и в работе [Bikales, 1971], где авторы объясняют её работой целлюлаз, продуцируемых используемой культурой *A. xylinum*. Более логично предположить, что данная зависимость объясняется физиологически. Известно, что уксуснокислые бактерии – строгие аэробы, поэтому биосинтез новых слоев БНЦ осуществляется на поверхности уже образованных [Campano, 2016; Gama, 2016]. Но с течением времени ухудшается состояние популяции из истощения питательных веществ и накопления продуктов метаболизма. Кроме того, толщина гель-плёнки БНЦ увеличивается, при этом её проницаемость для кислорода воздуха снижается, поэтому длина новых молекул БНЦ, синтезированных позднее, сокращается, вот почему снижается и усредненная для образца степень полимеризации, определяемая при анализе.

Прочностные характеристики

По уменьшению модуля Юнга (табл. 5.3) образцы БНЦ можно расположить в ряд: контроль>1>4>2>3, при этом значения первого и последнего образцов в ряду различаются в 13 раз (от 933,3 МПа до 70,0 МПа), что для данного показателя довольно существенно. В мировой литературе приведены как более высокие 15-138 GPa [Campano, 2016; Gama, 2016; Hussain, 2019], так и более низкие значения данного показателя: 10-17 МПа [Abol-Fotouh, 2020].

Термогравиметрический анализ

На рис. 5.14 приведена термогравиметрическая кривая контрольного образца БНЦ, полученного на синтетической питательной среде.

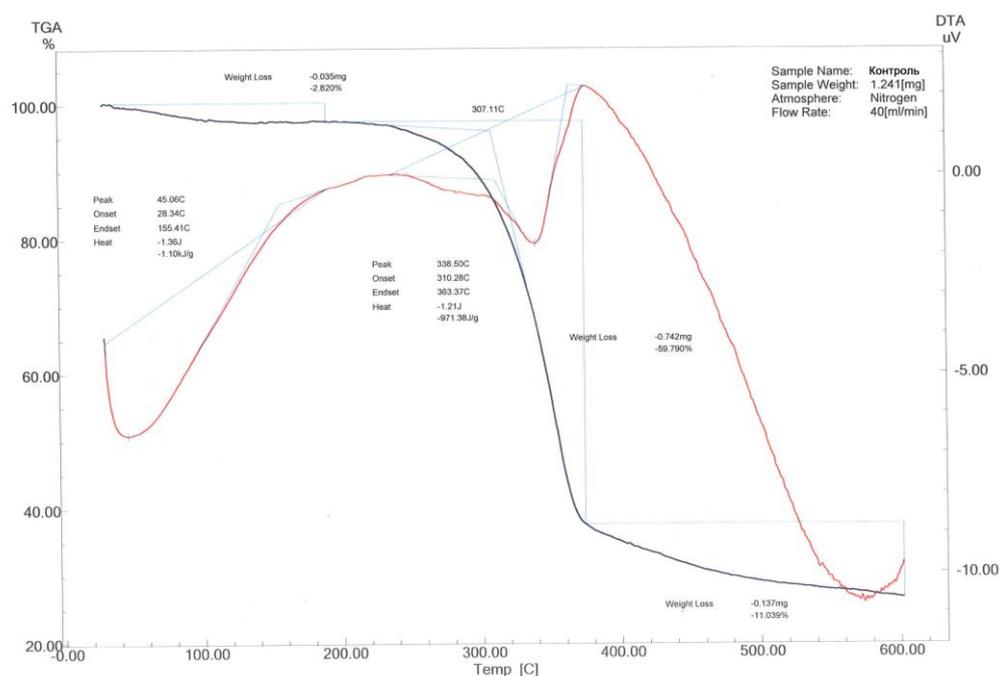


Рисунок 5.14 – Термогравиметрическая кривая БНЦ на примере контрольного образца БНЦ

Характер кривой изменения массы и сопровождающих изменение массы тепловых эффектов можно разделить на три характерных участка, что полностью соответствует мировым представлениям [Cheng, 2009; Mohammadkazemi, 2015; Vazquez, 2013; Pacheco, 2017]. Первый участок кривой связан с испарением легколетучих компонентов образца (воды) в диапазоне температур от 25 °С до 150 °С. Второй участок характеризуется максимальным изменением массы образца, что

связано с разложением БНЦ в результате пиролиза в диапазоне температур от 150 °С до 400 °С, при котором удаляются небольшие молекулярные фрагменты, такие как гидроксильные и метилгидроксильные группы. На третьем участке наблюдается доразложение материала, которое связывают с деградацией полимерных цепей и шестичленной циклической структуры пирана это участок наблюдается в диапазоне температур от 400 °С до 600 °С. Каждое из трёх изменений массы сопровождается эндотермическим эффектом.

Для опытных образцов получены аналогичные кривые (рис.5.15), для более детального сводные данные термогравиметрического изменения массы образцов БНЦ приведены в таблице 5.3.

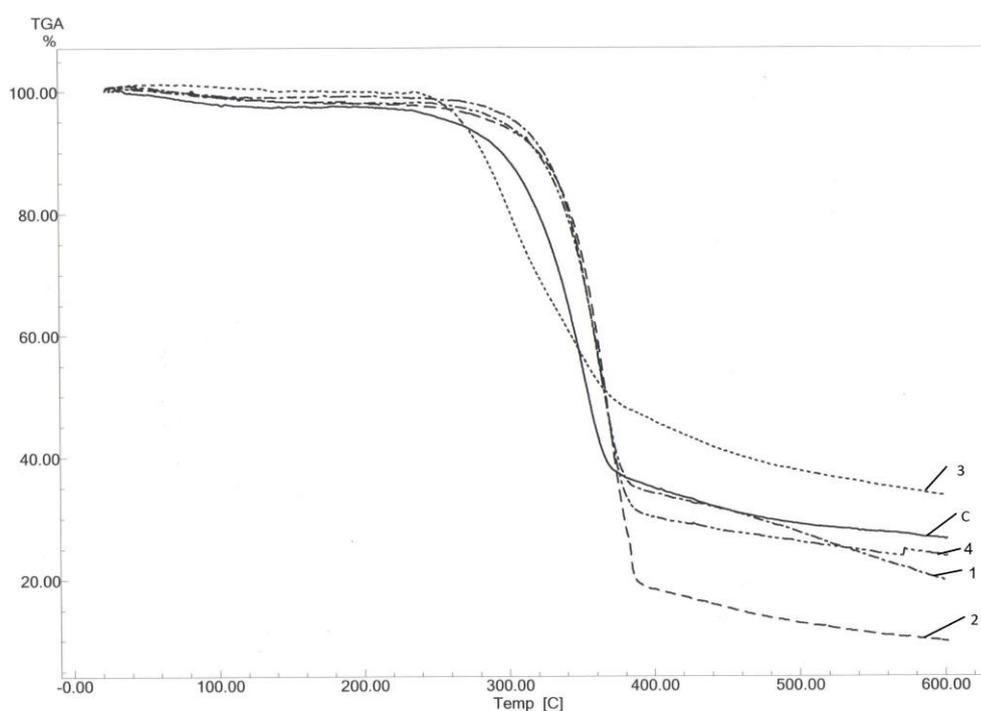


Рисунок 5.15 – Термогравиметрические кривые опытных и контрольного образцов БНЦ

Критической является температура начала разложения или пиролиза (T_2): чем она выше, тем выше термостабильность образца, и тем образец чище [Um,2004; Pacheco, 2015]. По повышению термостабильности и чистоты образцы можно расположить в ряд: 3) < контроль < 4 < 1 < 2. Кроме того, на повышение чистоты образцов в приведенном ряду указывает второй характерный показатель — изменение массы образца в диапазоне его разложения (ΔP_2). В представленном

ряду при пиролизе теряется от 52 % до 78 %, чем изменение массы больше, тем образец чище. Соответственно, на рис. 5.15, чем меньше остаток неразложившейся БНЦ, тем чище представленный образец и тем выше его термостабильность. Эта интерпретация совпадает с мнением, высказанным [Pacheco, 2015].

Есть мнение, что на поведение образца БНЦ при термическом разложении влияют такие факторы, как молекулярная масса, кристалличность, ориентированность нановолокон, поэтому более резкое снижение массы образцов может быть обусловлено их более высокой кристалличностью, степенью полимеризации и компактностью переплетения структуры [Vazquez, 2013]. Не отрицая влияния перечисленных факторов, мы считаем, что при термическом разложении на поведение образца БНЦ, как и на поведение любого органического вещества, в первую очередь влияет степень чистоты.

5.3.2. Характеристики образцов БНЦ, полученных на ферментативных средах из мискантуса

Инфракрасная спектроскопия

Таблица 5.4 – Отнесение полос поглощения функциональных групп в образцах БНЦ, полученных на ферментативных гидролизатах мискантуса

Отнесение полос поглощения *	Максимум полосы поглощения, см ⁻¹				
	кон- троль	1	2	3	4
ν ОН-групп, участвующих в межмолекулярных и внутримолекулярных Н-связях	3339	3381	3337	3335	3338
ν связей в группах СН и СН ₂	2895	2917	2903	2919	2893
δ связей НОН обусловлено присутствием прочно связанной воды	1629	1657	1622	1644	1642
δ групп СН ₂	1427	1428	1424 1366	1429	1427
δ групп ОН в СН ₂ ОН	1320	1317	-	1316	1316
δ групп ОН	-	1204	-	1203	1204
ν связей С-О (характерные для полисахаридов полосы, обусловленные наличием ацетильных связей С-О-С и связей С-О в спиртах)	1025	1164 1112 1033	1022	1102 992	1156 1103 1020
β -1,4 связи	899	898	902	899	898
* ν – валентные колебания, δ – деформационные колебания, контроль – синтетическая среда					

На всех фотографиях (рис. 5.16) сетчатая структура представляет собой характерное именно для БНЦ неупорядоченное переплетение микрофибрилл толщиной от 25 до 200 нм [Gama, 2016]. Структура БНЦ принципиально отличает её от любых других видов целлюлоз. Таким образом, изменение состава питательной среды при биосинтезе БНЦ продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12 не вызывает изменений структуры БНЦ: структура одинакова и на синтетической среде и на всех видах сред, приготовленных из ферментативных гидролизатов.

Рентгеноструктурный анализ

На рис.5.17 представлены дифракционные картины образцов БНЦ, зарегистрированные на отражение и на просвет. Зарегистрированные в геометрии на отражение дифрактограммы иллюстрируют дифракционную картину, характерную для БНЦ [Keshk, 2014; Hussain, 2019; Khandelwal, 2016]. В геометрии на просвет наиболее типичными являются дифрактограммы образцов 1 и 4 [Faria-Tischer, 2015]. Различие дифрактограмм, снятых на отражение и просвет, объясняется анизотропией структуры БНЦ.

Результаты расчета дифрактограмм, полученных в геометрии на отражение методом полнопрофильного анализа показали, что структура всех исследованных образцов соответствует алломорфу I α (табл. 5.5). Впервые получено столь высокое содержание алломорфа I α : для всех вариантов от 96 до 98 %. Индекс Степень кристалличности образцов БНЦ, синтезированных продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12 составил от 86 % до 94 %. Детали опубликованы в работе [Aleshina, 2019]. Ч

Часто исследователи отмечают снижение индекса степени кристалличности БНЦ или содержания алломорфа I α при замене синтетических сред на альтернативные [Luo, 2017; Campano, 2015; Hussain, 2019]. Однако при использовании продуцента *Medusomyces gisevi* Sa-12 этого не произошло, то есть продуцент способен к самостандартизации качества БНЦ.

При сравнении полученных результатов с мировыми результаты с мировыми [Hussain, 2019; Abol-Fotouh, 2020] можно констатировать, что *Medusomyces*

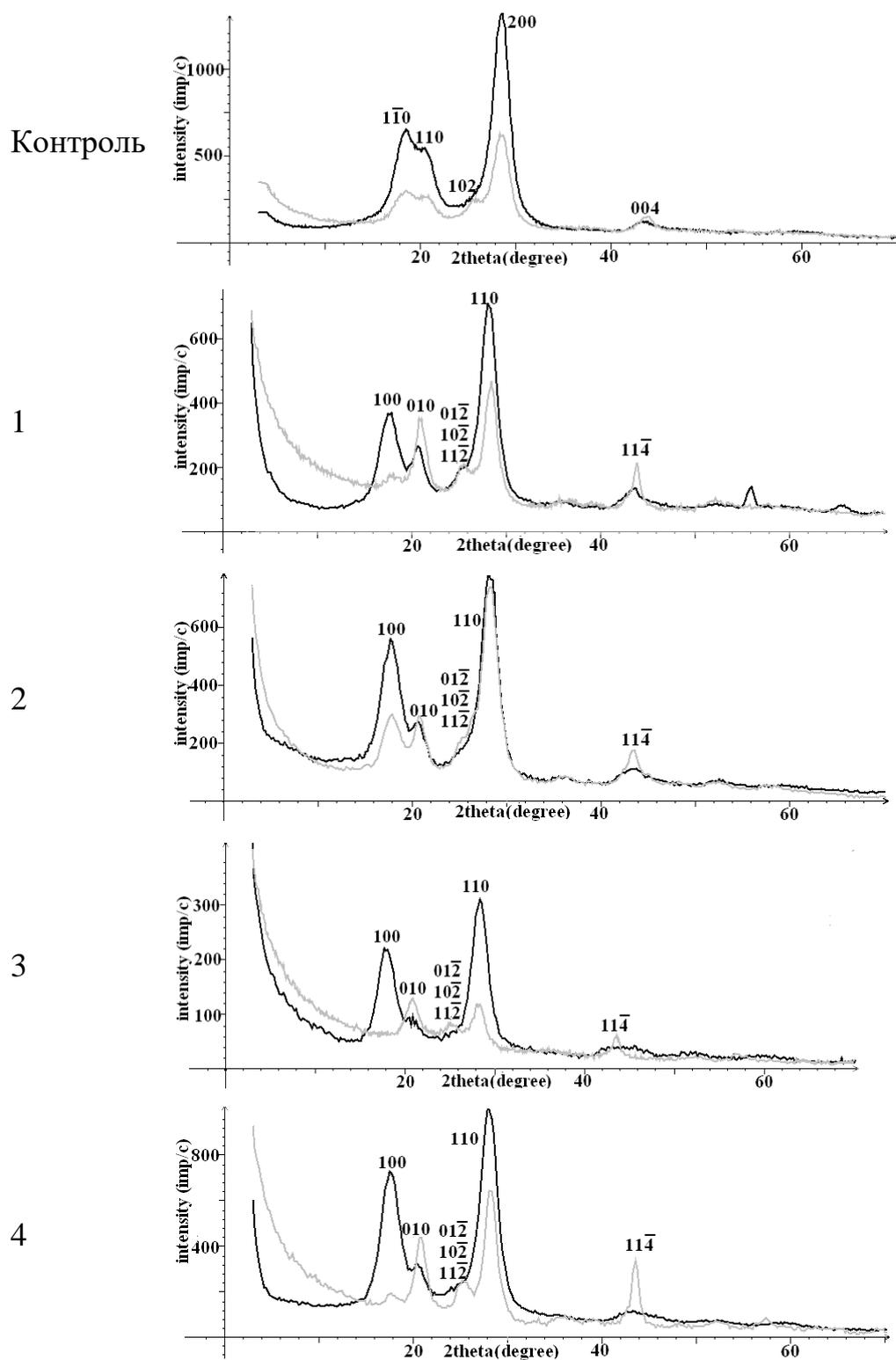


Рисунок 5.17 – Дифрактограммы образцов БНЦ, на средах, полученных из мис-кантуса, и на контрольной среде, снятые на отражение и прохождение *gisevii Sa-12* синтезирует БНЦ с экстраординарно высокими содержанием алломорфа Ia и степенью кристалличности, превосходящими все мировые аналоги. В мировой литературе содержание алломорфа Ia варьирует от 64 % [Gama, 2016; Keshk, 2014] до 90 % [Campano, 2016], а степень кристалличности от 46,0 % до

95,6 % [Velásquez-Riaño, 2017]. Мы считаем, что именно эти характеристики: высокое содержание алломорфа Iα при высокой степени кристалличности обусловили такое эксклюзивное свойство нашей БНЦ, как её самостоятельная гемостатическая активность [Zharikov, 2018].

Таблица 5.5 – Основные физико-химические характеристики образцов БНЦ, полученных на средах из мискантуса

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

Степень полимеризации

В порядке убывания степени полимеризации образцов БНЦ, полученных на питательных средах из пальпов (7 суток), можно построить ряд: контроль>4>3>1>2 (табл. 5.4). Крайние значения в этом ряду различаются в два раза (2600 для контроля и 1200 для пальп 2). Для всех образцов наблюдается снижение

степени полимеризации на 17-26 % через 21 сутки. Подобная тенденция снижения степени полимеризации БНЦ при длительном культивировании приведена в работе [Shi, 2013].

Прочностные характеристики

По уменьшению модуля Юнга (табл. 5.5) образцы БНЦ можно расположить в ряд: контроль>2>4>3>1, при этом значения первого и последнего образцов в ряду различаются в 1,9 раза (от 933,3 МПа до 490,0 МПа), что для данного показателя не очень существенно.

Термогравиметрический анализ

Сводные данные термогравиметрического изменения массы образцов БНЦ приведены в табл.5.5. По снижению термостабильности и чистоты образцы можно расположить в ряд: 4>1>2>3> контроль, в этом ряду температура начала разложения снижается от 347 до 307 °С. Все опытные образцы БНЦ имеют близкие показатели, свидетельствующие скорее об их идентичности, чем об их различиях.

5.3.3 Сравнение характеристик БНЦ из шелухи овса и мискантуса

Исследования образцов БНЦ, полученных из шелухи овса и мискантуса, методом инфракрасной спектроскопии, показали, что все полученные образцы БНЦ являются химически чистой целлюлозой. Исследование методом растровой электронной микроскопии показало, что сетчатая структура образцов БНЦ во всех случаях представляет собой характерное именно для БНЦ, и отличающее её от любых других видов целлюлозы, неупорядоченное переплетение микрофибрилл толщиной от 25 до 200 нм. Таким образом, установлено, что изменения сырья и способа его химической предобработки не вызывает изменений структуры БНЦ.

Исследования БНЦ методом рентгеноструктурного анализа показало, что образцы БНЦ, полученные как на синтетической питательной среде, так и на различных ферментативных гидролизатах шелухи овса и мискантуса, имеют высо-

кую степень кристалличности – от 86 % до 93 %, что является подтверждением целесообразности использования именно ферментативной технологии гидролиза целлюлозосодержащего сырья. В опытных образцах БНЦ преобладает низкосимметричный метастабильный алломорф целлюлозы I-альфа, ее содержание составляет от 93,6 % до 100 %. Впервые установлен факт биосинтеза высококристаллической БНЦ с преобладанием алломорфа целлюлозы I-альфа независимо от состава питательной среды. Это указывает на перспективность использования симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 в реальном производстве.

Методом термогравиметрического анализа установлено, что все образцы БНЦ, независимо от состава среды, имеют схожий характер термической потери массы, соответствующий описанному в литературе [Cheng, 2009; Vazquez, 2013]. Критической является температура начала разложения или пиролиза: чем она выше, тем выше термостабильность образца, и тем образец чище. По повышению термостабильности и чистоты образцы БНЦ из шелухи овса можно расположить в ряд: 3 < контроль 4 < 1 < 2. В представленном ряду температура начала разложения повышается от 268 до 334 °С, а при пиролизе теряется от 67,2 % до 90,8 % образца. Образцы БНЦ из мискантуса можно расположить в ряд: контроль < 3 < 2 < 1 < 4. В представленном ряду температура начала разложения повышается от 307 до 347 °С, а при пиролизе теряется от 73,7 % до 83,6 % образца.

Методом испытания образцов на растяжение установлено, что по уменьшению модуля Юнга образцы БНЦ из шелухи овса можно расположить в ряд: контроль > 1 > 4 > 2 > 3, при этом значения первого и последнего образцов в ряду снижаются в 13,3 раза (от 933 МПа до 70 МПа). Для образцов БНЦ из мискантуса можно составить ряд: контроль > 2 > 4 > 3 > 1, при этом значения первого и последнего образцов в ряду различаются в 1,9 раза (от 933 МПа до 490 МПа).

Таким образом, исследование зависимости физико-химических свойств БНЦ от способа предварительной химической обработки шелухи овса и мискантуса показало, что способ предварительной химической обработки и вид сырья оказывают влияние на выход БНЦ, но не оказывают влияния на физико-химические свойства и качество БНЦ. Установленную способность симбиотиче-

ской культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 синтезировать БНЦ стандартного качества независимо от состава среды можно назвать «самостандартизацией». Это эксклюзивная способность симбиотической культуры, которая объясняется не только высокой адаптивностью продуцента, но является примером «кворумного ответа», достижимого при высоких концентрациях клеточных популяций и характерного для консорциумов. Однако, в отношении качества синтезируемой БНЦ данная закономерность выявлена впервые, практическое применение её очевидна: открывается реальная возможность стабильной, устойчивой работы симбиотической культуры в условиях реального производства.

5.4 Скрининг продуцентов бактериальной наноцеллюлозы

5.4.1 Скрининг продуцентов бактериальной наноцеллюлозы на синтетических средах

Были протестированы штаммы *Komagataeibacter xylinus* В-11240, *Komagataeibacter xylinus sucrofermentans* В-12428, *Komagataeibacter xylinus* В-12429, *Komagataeibacter xylinus* В-12431.

На первом этапе проводилась реактивация штаммов. Для этого использовалась среда Хестрина-Шремма [Hestrin, 1954]. Для штаммов *Komagataeibacter xylinus* В-11240 и *Komagataeibacter xylinus sucrofermentans* В-12428 образование гель-пленки и помутнение среды не наблюдалось. При нескольких пересевах также образование гель-пленки и помутнение среды не наблюдалось. Можно сделать заключение, что эти штаммы были доставлены нежизнеспособными.

На втором этапе изучались трофические предпочтения штаммов В-12429 и В-12431. Для этого биосинтез БНЦ осуществлялся на трёх средах: среде Хестрина-Шремма, среде с мелом для уксуснокислых бактерий (глюкоза – 100,0 г/л; дрожжевой экстракт – 10,0 г/л; CaCO₃ – 20,0 г/л; рН 6,8) и глюкозной полусинтетической среде (глюкоза – 20 г/л; сухой чёрный чай – 10 г/л, после приготовления среда фильтровалась). Результаты показали (табл.5.6), что среда с экстрактивными веществами чёрного чая оказалась непригодной для биосинтеза БНЦ штамма-

ми В-12429 и В-12431, так как БНЦ на ней не синтезировалась. На среде Хестрина-Шремма выход БНЦ выше, чем на среде с мелом в 7,1 раза для штамма В-12429 и в 9,5 раза – для штамма В-12431. Можно сделать вывод, что предпочтительной оказалась среда Хестрина-Шремма. Именно она была использована в качестве контрольной среды в дальнейших экспериментах.

Таблица 5.6 - Биосинтез БНЦ штаммами ВКПМ В-12429 и В-12431 через 7 суток на синтетических средах

Питательная среда	Хестрина-Шремма	с мелом	с экстрактивными веществами черного чая
<i>Komagataeibacter xylinus</i> ВКПМ В-12429			
Продуктивность БНЦ, г/л	0,254	0,036	-
Выход БНЦ от массы РВ, %	1,27	0,18	-
<i>Komagataeibacter xylinus</i> ВКПМ В-12431			
Продуктивность БНЦ, г/л	0,436	0,046	-
Выход БНЦ от массы РВ, %	2,18	0,23	-

5.4.2 Скрининг продуцентов бактериальной наноцеллюлозы на питательных средах из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья

Далее изучался биосинтез БНЦ с помощью штаммов В-12429 и В-12431 на питательных средах из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья. Использовались три питательных среды: опытные среды, полученные из мискантуса и шелухи овса по **способу 3** и контрольная синтетическая среда Хестрина-Шремма. Оказалось, что на нативных гидролизных средах и на гидролизных средах с внесением экстрактивных веществ чёрного чая индивидуальные штаммы не способны продуцировать БНЦ. Поэтому было принято решение внести в гидролизные среды питательные вещества аналогично составу среды Хестрина-Шремма (кроме глюкозы). Кроме того, при биосинтезе БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12, питательные среды подвергались пастеризации при 100 °С без выдержки, что при использовании индивидуальных штаммов *Komagataeibacter xylinus* оказалось неприемлемым, и наблюдалась контаминация посторонней микрофлорой. Поэтому проводилось автоклавирование питательных сред при 0,5 атм 30 минут. После проверки стерильности в среды

вносилось по 10 % инокулята, предварительно адаптированного на исследуемой среде, биосинтез проводился статически в течение 14 суток при температуре 28 °С. Емкости сверху накрывались стерильной бумагой.

Кривые изменения РВ в процессе биосинтеза БНЦ представлены на рис. 5.18. Основная убыль РВ наблюдается первые 7 суток биосинтеза, далее кривые выходят на плато. Для штамма В-12429 остаточная концентрация веществ составляет 7 г/л, для штамма В-12431 – 4-5 г/л.

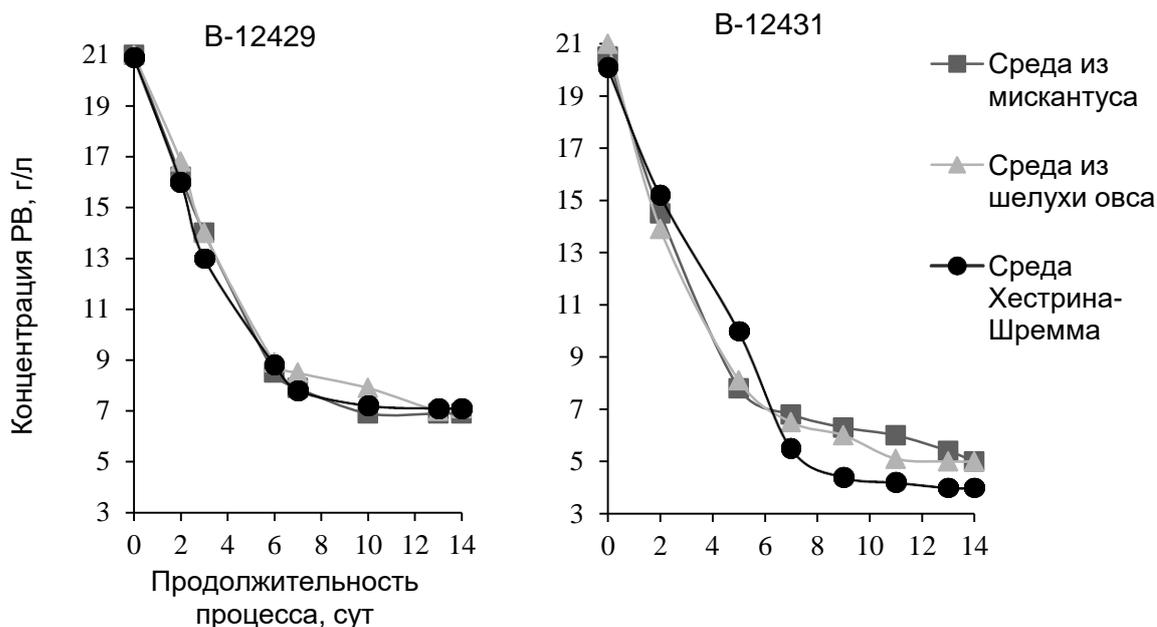


Рисунок 5.18 – Изменение концентрации РВ в процессе биосинтеза БНЦ штаммами *Komagataeibacter xylinus* В-12429 и В-12431

Кривые изменения рН приведены на рис. 5.19. Особенностью штамма В-12429 является наблюдаемый минимум рН 3,5 на 4-е сутки биосинтеза, после чего рН постепенно повышается до 3,9-4,3. Для штамма В-12431 рН снижается до 3,6-3,9 на 3-5 сутки биосинтеза и остаётся на этом уровне до конца эксперимента.

Кривые изменения численности уксуснокислых бактерий приведены на рис. 5.20. Из графиков видно, что при культивировании не наблюдается длительной лаг-фазы, вероятно это связано с предварительной адаптацией продуцентов к используемой среде. Со 2-х по 14-е сутки наблюдается стационарная фаза. Количество бактерий при культивировании на гидролизатах на 7-е сутки выше в 3-4 раза, чем при культивировании на синтетической среде. Для штамма В-12431 на всех пита-

тельных средах численность бактерий несколько выше, чем для штамма В-12429. Известно, что численность уксуснокислых бактерий служит маркером синтеза БНЦ: чем выше концентрация бактерий, тем выше выход БНЦ [Römling, 2015; Stepanov, 2018]. Поэтому самый высокий выход БНЦ можно ожидать для штамма В-12431 на среде ферментативного гидролизата шелухи овса.

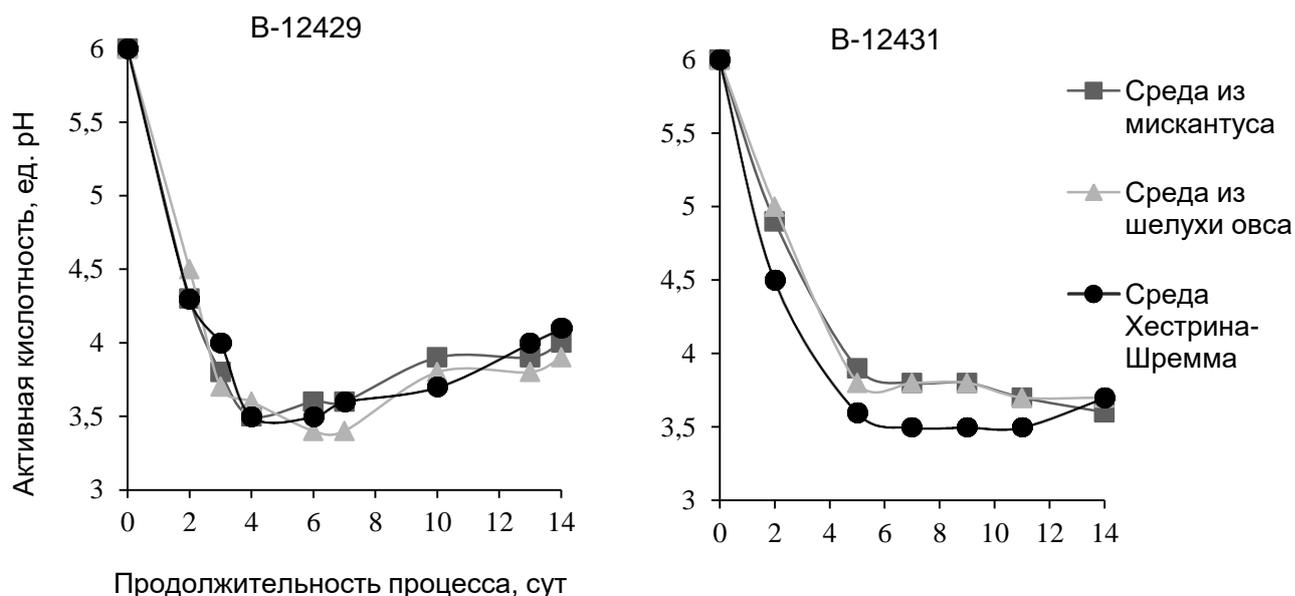


Рисунок 5.19 – Изменение активной кислотности в процессе биосинтеза БНЦ штаммами *Komagataeibacter xylinus* В-12429 и В-12431

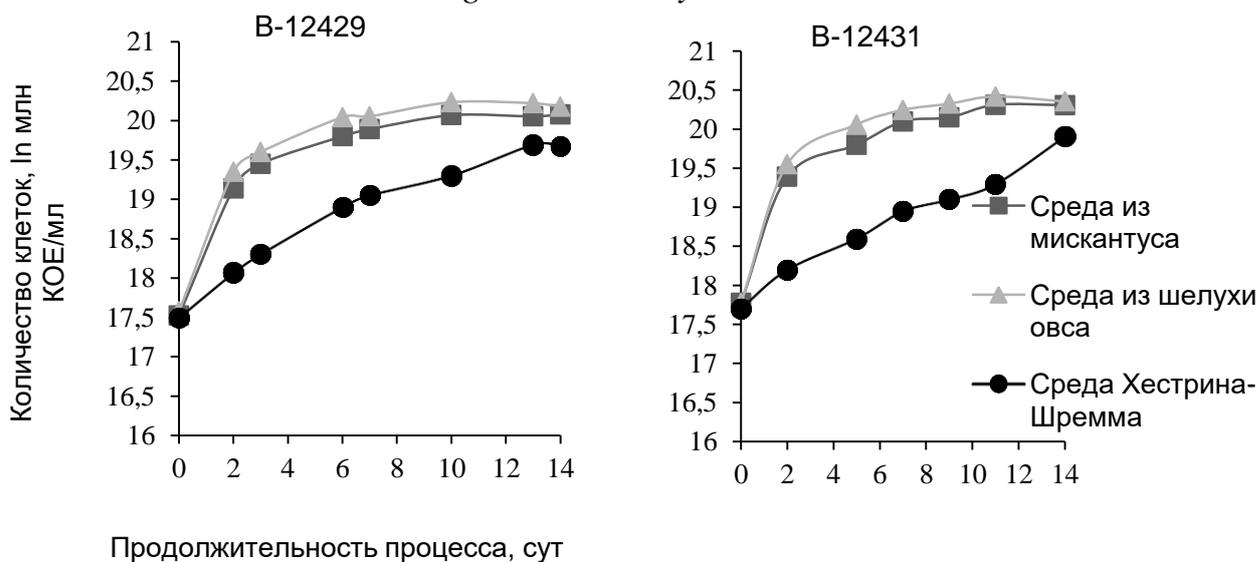


Рисунок 5.20 – Изменение численности уксуснокислых бактерий в процессе биосинтеза БНЦ штаммами *Komagataeibacter xylinus* В-12429 и В-12431

Наибольший выход БНЦ был получен на среде ферментативного гидролизата шелухи овса (рис.5.21): 3,5 % для штамма В-12429, 4,1 % – для В-12431. Интересно, что в опыте со штаммом В-12429 выход БНЦ на среде из мискантуса был близок к выходу на среде из шелухи овса, а в опыте со штаммом В-12431 наблюдается большой разрыв между кривыми выхода. По-разному прошел биосинтез БНЦ и на средах Хестрина-Шремма: если в опыте со штаммом В-12429 выход продолжал увеличиваться спустя 14 суток, то в опыте со штаммом В-12431 – начал снижаться уже спустя 7 суток.

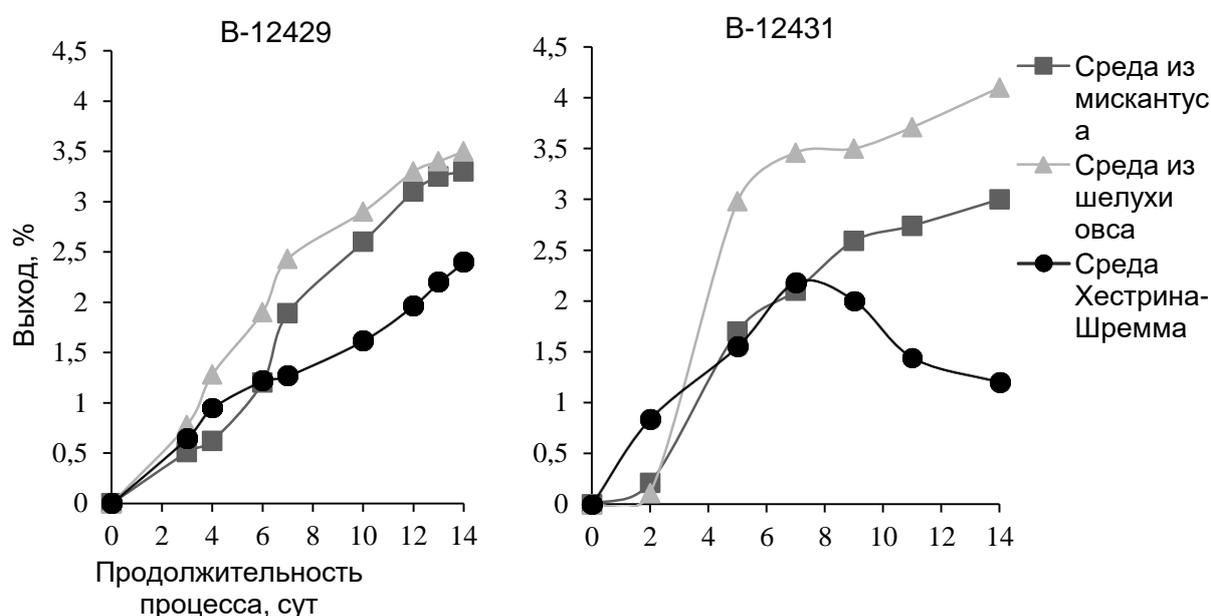


Рисунок 5.21– Изменение выхода БНЦ в процессе биосинтеза штаммами *Komagataeibacter xylinus* В-12429 и В-12431

Самые низкие выходы БНЦ получены индивидуальными штаммами *Komagataeibacter xylinus* на синтетических средах: они на 76-88 %, чем выход БНЦ, полученный на синтетической среде с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12 (табл.5.7). При этом выходы, полученные нами на синтетической среде полностью воспроизводят описанные в литературе выходы для этих продуцентов: [Casarica, 2013] для штамма В-12429 и [Mangayil, 2017] для штамма В-12431.

На гидролизных средах выход БНЦ для индивидуальных штаммов повышается на 38-46 % для штамма В-12429 и на 150-242 % для штамма В-12431. Явление повышения выхода БНЦ на гидролизных средах по сравнению с синтетической средой неоднократно описано для индивидуальных штаммов [Velásquez-

Riaño, 2017; Urbina, 2021]. Высказано предположение, что это может быть связано с присутствием в гидролизатах растворимых целлоолигосахаридов, которые могут утилизироваться штаммами, имеющими эндо-1,4-β-глюканазу [Hong, 2012].

Таблица 5.7 – Выходы БНЦ через 14 суток биосинтеза

Питательная среда	Продуцент		
	<i>Medusomyces gisevii</i> Sa-12	B-12429	B-12431
Ферментативный гидролизат из плодовых оболочек овса	10,0	3,5	4,1
Ферментативный гидролизат из мискантуса	6,3	3,3	3,0
Синтетическая среда	10,0	2,4	1,2

Однако, несмотря на повышение выхода БНЦ на гидролизных средах для индивидуальных штаммов *Komagataeibacter xylinus*, он ниже, чем выход БНЦ, полученный с помощью симбиотической культуры: на среде из шелухи овса на 59-65 %, на среде из мискантуса на 44-48 %. При этом для используемых продуцентов выход БНЦ на среде из мискантуса ниже на 6 %, 27 % и 37 % соответственно, чем на среде из шелухи овса. Это доказывает наличие в самом мискантусе ингибиторов биосинтеза БНЦ, так как технологические стадии осуществлялись одинаковы.

Можно сделать вывод, что на средах ферментативных гидролизатов легко возобновляемого целлюлозосодержащего сырья, индивидуальные штаммы не могут конкурировать с симбиотической культурой. Кроме критично низкого выхода БНЦ для индивидуальных штаммов появляется 1) необходимость внесения дополнительных питательных веществ в среду, без которых рост БНЦ практически останавливается, 2) необходимость стерилизации питательных сред, в то время как для симбиотической культуры достаточно пастеризации при 100 °С. Эти два фактора являются важными технологическими преимуществами при промышленном производстве БНЦ [Velásquez-Riaño, 2017].

В литературе описаны чрезвычайно высокие выходы БНЦ, достигнутые при использовании индивидуальных штаммов [Velásquez-Riaño, 2017; Urbina, 2021], однако промышленное производство БНЦ с помощью индивидуальных штаммов весьма ограничено [Forte, 2021]. В то время как при использовании

симбиотической культуры промышленное производство БНЦ в мировой практике неуклонно возрастает, в том числе применяемой для технических целей [Forte, 2021; Pillai, 2021].

5.4.3 Исследование зависимости физико-химических свойств БНЦ от вида используемого продуцента

При исследовании физико-химических свойств БНЦ применены все основные методы анализа, сложившиеся в мировой практике для характеристики БНЦ. Доказательством бактериального происхождения целлюлозы служит её наноразмерность, что доказывается с помощью РЭМ. Фото РЭМ образцов БНЦ, полученных с помощью индивидуальных штаммов и симбиотической культуры, на гидролизных и контрольных средах приведены на рис. 5.22. Установлено, что независимо от способа подготовки субстрата все образцы БНЦ, полученные на ферментативных гидролизатах плодовых оболочек овса и мискантуса характеризуются сетчатой случайной структурой, что является характерным признаком БНЦ [Gama, 2016].

По полученным микрофотографиям был измерен диаметр микрофибрилл. Типичное распределение диаметра фибрилл представлено на рис. 5.23. В табл. 5.8 приведены диаметры микрофибрилл БНЦ, синтезированной индивидуальными штаммами и симбиотической культурой на гидролизных средах. Значимой статистической разницы по диаметру микрофибрилл не обнаружено. Вторым важным признаком БНЦ, отличающим её от других видов целлюлоз, является её химическая чистота. БНЦ синтезируется микроорганизмами без гемицеллюлозы и лигнина, а промывка позволяет очистить её от остатков питательной среды и клеток микроорганизмов.

В табл. 5.9 приведено отнесение полос поглощения функциональных групп в образцах БНЦ, полученных из шелухи овса и мискантуса с помощью *Komagataeibacter xylinus* В-12429 и В-12431. Все образцы БНЦ характеризуются близкими значениями валентных колебаний, соответствующим колебаниям

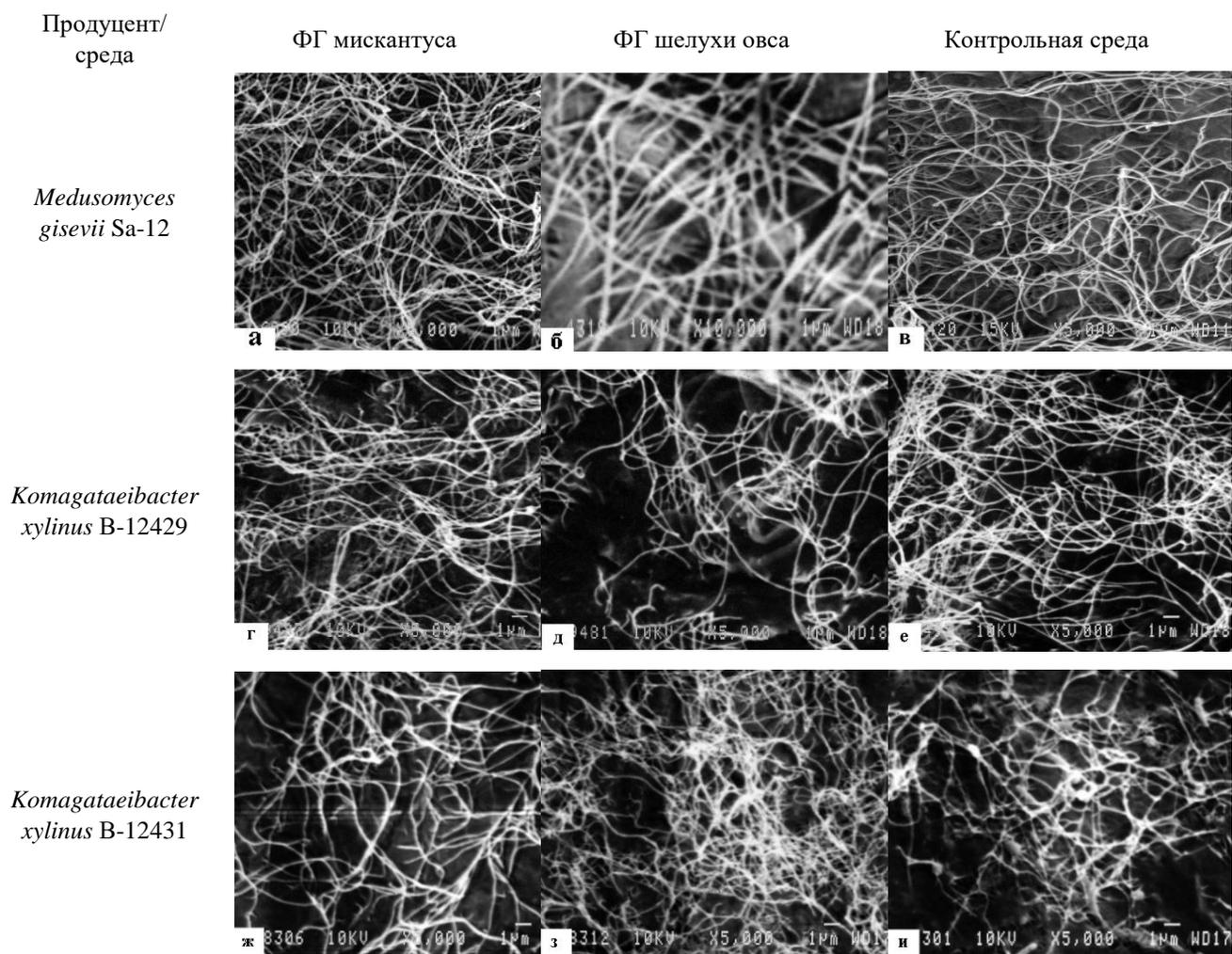


Рисунок 5.22 – Микрофотографии образцов БНЦ через 3 суток культивирования, РЭМ, х5000. а, г, ж – ферментативный гидролизат (ФГ) мискантуса (субстрат 3); б, д, з – ферментативный гидролизат шелухи овса (субстрат 3); в, е, и – контрольная среда; а, б, в – *Medusomyces gisevii* Sa-12; г, д, е – *Komagataeibacter xylinus* B-12429; ж, з, и – *Komagataeibacter xylinus* B-12431.

целлюлозы [Новый справочник...], что свидетельствует об одинаковой целлюлозной структуре представленных образцов [Alves, 2020; Yin, 2011; Goh, 2012].

Таблица 5.8 – Диаметр микрофибрилл БНЦ, полученных на гидролизных средах

Штамм/среда	ФГ Ц мискантуса	ФГ Ц плодовых оболочек овса	Контроль
<i>Medusomyces gisevii</i> Sa-12	88,6	82,4	87,0
<i>Komagataeibacter xylinus</i> B-12429	91,1	90,8	89,6
<i>Komagataeibacter xylinus</i> B-12431	82,1	90,1	82,8

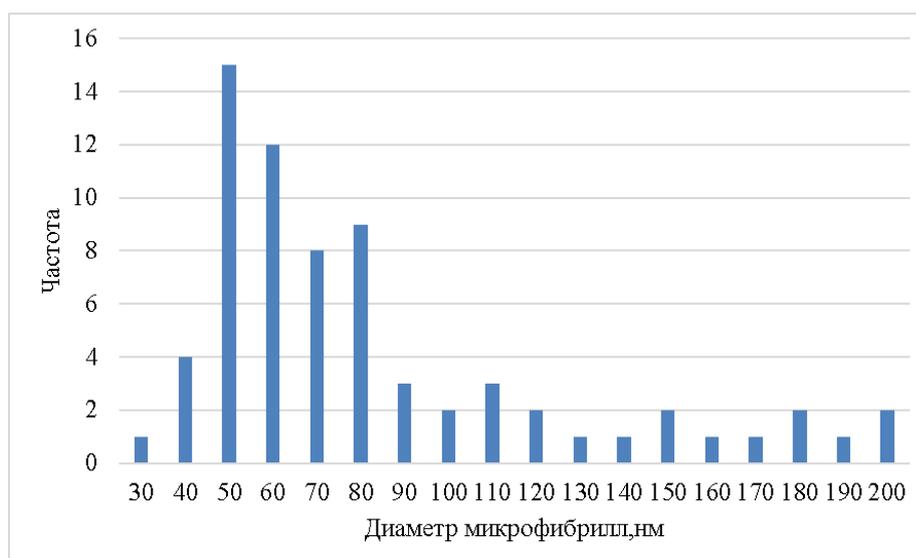


Рисунок 5.23 – Распределение значений диаметров микрофибрилл образца БНЦ, полученного с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12 на ферментативном гидролизате из мискантуса

Конкретно, полосы поглощения при 3434 см⁻¹ обусловлены валентными колебаниями ОН-групп, полосы поглощения при 2894 см⁻¹ – валентными колебаниями СН₂, СН-групп. Полосы поглощения при 1634 см⁻¹ характеризуют деформационные колебания ОН-групп прочно связанной воды. Полосы поглощения в области 1432-1369 см⁻¹ указывают на деформационные колебания СН₂, СН-групп. Полосы поглощения в области 1318 см⁻¹ указывают на деформационные колебания первичной спиртовой группы ОН, в области 1280 см⁻¹ – на деформационные колебания спиртовой группы СН₂, в области 1163 см⁻¹ – на валентные колебания спиртовых групп С-О-С и С-О. Полосы поглощения при 896 см⁻¹ подтверждают наличие β-1,4 гликозидных связей между молекулами глюкозы. Таким образом, результаты ИК-спектроскопии подтверждают химические функциональные возможности целлюлозных образцов реагировать с органическими радикалами и катионами металлов, удерживая их на своей поверхности [Alves, 2020].

Любой вид целлюлозы можно охарактеризовать с помощью такого универсального показателя, как степень полимеризации (табл. 5.10). *Komagataeibacter xylinus* В-12429 характеризуется степенью полимеризации 800-900, что в 1,6-2,8 раз ниже, чем степень полимеризации *Medusomyces gisevii* Sa-12. *Komagataeibacter xylinus* В-12431 характеризуется степенью полимеризации 1920-2600, что, напротив,

Таблица 5.9 – Отнесение полос поглощения функциональных групп в образцах БНЦ, полученных из шелухи овса и мискантуса с помощью *Komagataeibacter xylinus* В-12429 и В-12431

Отнесение полос поглощения *	Максимум полосы поглощения, см ⁻¹					
	<i>Komagataeibacter xylinus</i> В-12429			<i>Komagataeibacter xylinus</i> В-12431		
	ФГ шелу- хи овса	ФГ М	Конт- роль	ФГ шелу- хи овса	ФГ М	Конт- роль
ν ОН-групп, участвующих в межмолекулярных и внутримолекулярных Н-связях	3435	3413	3368	3415	3411	3379
ν связей в группах СН и СН ₂	2916 2848	2916 2847	2916 2848	2917 2850	2914	2915
δ связей НОН обусловлено присутствием прочно связанной воды	1639	1645	1647	1639	1640	1641
δ групп СН ₂	1426 1371	1426 1372	1426 1369	1426 1369	1426 1369	1426 1369
δ групп ОН в СН ₂ ОН	1335 1315	1335 1315	1335	1336 1316	1335 1315	1335 1315
δ групп СН ₂ в СН ₂ ОН	1278	1278 1232	1279	1279 1248 1233	1279 1247 1233	1279 1248 1233
δ групп ОН	-	-	-	1203	-	1203
ν связей С-О (характерные для полисахаридов полосы, обусловленные наличием ацетильных связей С-О-С и связей С-О в спиртах)	1162 1058	1161 1057	1160 1109 1057	1162 1110 1055 1030	1162 1111 1057 1032	1162 1110 1060 1033
β -1,4 связи	894	894	850	895	896	896

* ν – валентные колебания, δ – деформационные колебания
 ФГ шелухи овса – ферментативный гидролизат шелухи овса (субстрат 3);
 ФГ М – ферментативный гидролизат мискантуса (субстрат 3)

в 0,9-1,8 раз выше, чем степень полимеризации *Medusomyces gisevii* Sa-12. Для *Komagataeibacter xylinus* В-12429 минимальная степень полимеризации зафиксирована на среде ферментативного гидролизата мискантуса, а для *Komagataeibacter xylinus* В-12431 – на контрольной среде. Для обоих продуцентов наблюдается небольшое снижение степени полимеризации через 14 суток по сравнению с 7-ми сутками, что хорошо согласуется с литературными данными.

На рис. 5.24 представлена типичная кривая деформации БНЦ (на примере образца БНЦ, полученного с помощью *Komagataeibacter xylinus* В-12431 на контрольной среде Хестрина-Шремма). БНЦ – материал, не имеющий выраженного

Таблица 5.10 – Физико-химические свойства БНЦ в зависимости от используемого продуцента и вида легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья по сравнению с контролем

Характеристики	<i>Medusomyces gisevii Sa-12</i>			<i>Komagataeibacter xylinus B-12429</i>			<i>Komagataeibacter xylinus B-12431</i>		
	ФГ ПОО	ФГ М	Конт- роль	ФГ ПОО	ФГ М	Конт- роль	ФГ ПОО	ФГ М	Конт- роль
Степень полимеризации в зависимости от продолжительности биосинтеза БНЦ									
7 суток	1760	1550	2600	860	880	900	2600	2400	1900
14 суток	1450	1470	2200	820	800	880	1940	1920	2200
Прочностные характеристики									
Прочность при разрыве, МПа	26,2	21,5	33,2	41,2	23,9	5,7	65,6	83,7	128,3
Условный предел текучести, МПа	3,7	3,0	5,6	3,0	3,9	1,2	5,8	10,9	8,4
Относительное удлинение при максимальной нагрузке, %	1,7	1,2	1,5	1,1	1,4	0,5	1,9	2,6	2,7
Относительное удлинение при пределе текучести, %	0,7	0,4	0,6	0,3	0,3	0,1	0,3	0,5	0,4
Толщина образца, мкм	50	30	20	17,5	10	7,5	15	5	5
Модуль Юнга, МПа	529	510	933,0	1142	1212	1033	2215	2180	2143
Сводные данные термогравиметрического анализа									
Изменение массы образца до температуры пиролиза, %;	84,1	78,2	73,7	94,9	95,5	96,2	98,8	98,8	96,2
Остаток, %	15,9	21,8	26,3	5,1	4,5	3,8	1,2	1,2	3,8
Температура начала разложения, °С	329,3	317,6	307,1	294,8	305,8	290,7	302,1	301,7	300,5
Концентрации алломорфов целлюлозы и степень кристалличности, определенные методом РСА									
I α - алломорф, %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,2	94,2	92,8	93,5
I β - алломорф, %	–	–	–	–	–	0,8	5,8	7,2	6,5
Степень кристалличности (определенная на отражение), %	93	94	86	87	74	76	91	90	94
Степень кристалличности (определенная на пропускание), %	87	92	88	90	75	88	89	100	100
Примечания: ФГ М – ферментативный гидролизат мискантуса (субстрат 3); ФГ шелухи овса – ферментативный гидролизат шелухи овса (субстрат 3); контрольной средой для <i>Medusomyces gisevii Sa-12</i> является полусинтетическая среда с экстрактом чёрного чая, для <i>Komagataeibacter xylinus B-12429</i> и <i>B-12431</i> – среда Хестрина-Шремма									

предела текучести. Модуль Юнга образцов БНЦ, полученных с помощью индивидуальных штаммов выше, чем образцов, полученных с помощью симбиотической культуры. Для штамма В-12429 – в 1,1-2,4 раза (1033-2112 МПа против 510-933 МПа), а для штамма В-12431 – в 2,2-4,3 раза (2215-2243 МПа против 510-933 МПа). Это вполне закономерно, так как обычно БНЦ, полученная с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12 характеризуется ещё более низким модулем Юнга [Pillai, 2021].

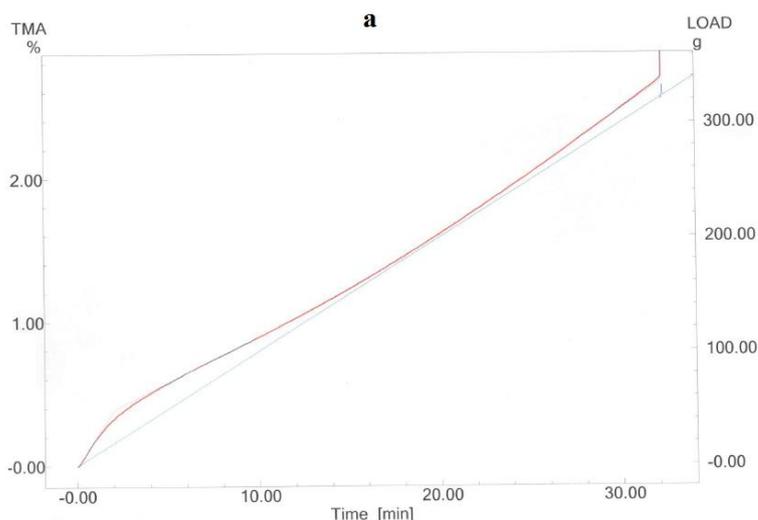


Рисунок 5.24 – Кривая деформации образца БНЦ, полученного с помощью *Komagataeibacter xylinus* В-12431 на контрольной среде Хестрина-Шремма

Влажность исследованных образцов находится в диапазоне 96-99 %. Температуры начала пиролиза близки для всех образцов в независимости от среды на которой они получены (табл. 5.10). Сравнение с ранее полученными данными затруднено, так как в табл. 5.10 приведены данные термогравиметрического анализа сухих образцов БНЦ, полученных с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12 и влажных, полученных с помощью *Komagataeibacter xylinus* В-12429 и В-12431.

Дифракционные картины образцов БНЦ, полученных разными способами предобработки шелухи овса, снятые на отражение и на просвет, приведены на рис. 5.25. Во всех случаях получены дифракционные картины, характерные для БНЦ [French, 2014; Pacheco, 2017; Vazquez, 2013; Urbina, 2021]. На представленных дифрактограммах указаны индексы основных отражений целлюлозы I α . Снятые на отражение и прохождение дифрактограммы резко различаются.

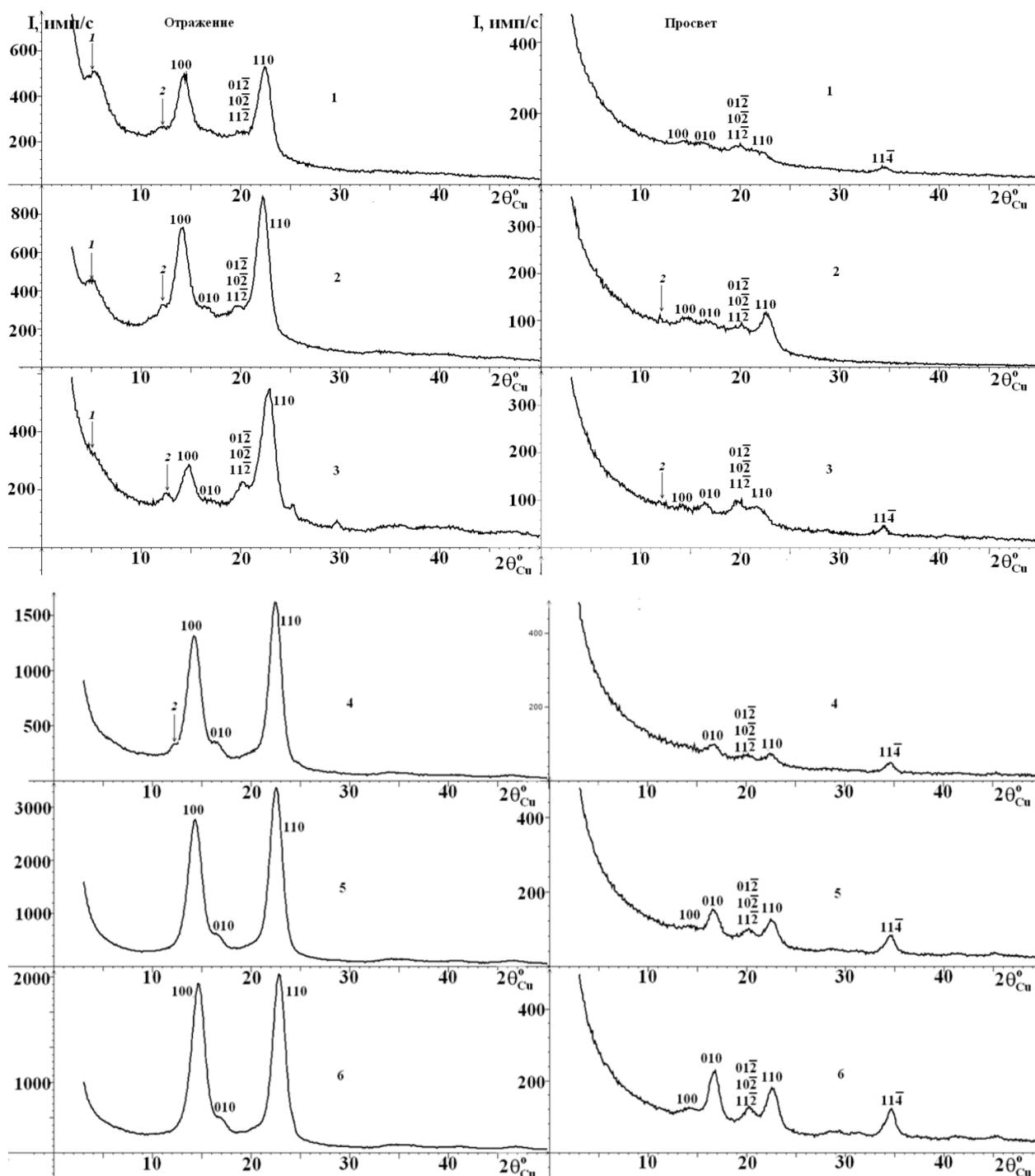


Рисунок 5.25 – Область $2\theta_{Cu}$ от 3 до 50° дифрактограмм образцов БНЦ, снятых на отражение и просвет. Указаны индексы отражений для целлюлозы Ia
 1 – синтетическая среда Хестрина-Шремма, продуцент *Komagataeibacter xylinus* B-12429,
 2 – ферментативный гидролизат мискантуса (субстрат 3), продуцент *Komagataeibacter xylinus* B-12429,
 3 – ферментативный гидролизат шелухи овса (субстрат 3), продуцент *Komagataeibacter xylinus* B-12429,
 4 – синтетическая среда Хестрина-Шремма, продуцент *Komagataeibacter xylinus* B-12431,
 5 – ферментативный гидролизат мискантуса (субстрат 3), продуцент *Komagataeibacter xylinus* B-12431,
 6 – ферментативный гидролизат шелухи овса (субстрат 3), продуцент *Komagataeibacter xylinus* B-12431

Например, на дифрактограммах, зарегистрированных в геометрии на прохождение, ослаблено или даже отсутствует отражение (100).

Результаты расчёта дифрактограмм методом полнопрофильного анализа показали соответствие структуры всех образцов БНЦ алломорфу I α (табл. 5.10) на 92,8-100,0 %. Экстремально высокое содержание алломорфа I α получено для симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 и для индивидуального штамма *Komagataeibacter xylinus* B-12429 – 99,2-100 %. Это очень высокий показатель. Преимущественное содержание алломорфа I α характерно для БНЦ [Klemm, 2018].

Получены высокие степени кристалличности, при этом они не зависят от вида целлюлозосодержащего сырья (шелухи овса или мискантуса), но зависят от используемого штамма: для *Medusomyces gisevii* Sa-12 степень кристалличности варьирует от 86 до 94 %, для *Komagataeibacter xylinus* B-12429 – от 74 до 90 %, для *Komagataeibacter xylinus* B-12431 – от 89 до 100 %. Таким образом, именно *Komagataeibacter xylinus* B-12431 характеризуется высочайшей степенью кристалличности, превышающей все опубликованные данные [Gama, 2016; Keshk, 2014; Campano, 2016; Velásquez-Riaño, 2017].

Интерпретация проведена согласно [French, 2020], подробности в [Aleshina, 2018]. Получены совершенно нетипичные результаты. Одной из проблем замены синтетической питательной среды на нетрадиционные среды из целлюлозосодержащего сырья является снижение степени кристалличности и снижение содержания алломорфа I α в образцах БНЦ. Например, при замене синтетической среды на ферментативный гидролизат шелухи риса для биосинтеза БНЦ степень кристалличности снизилась до 28 % [Goelzer, 2009], а использование виноградного жмыха снижает содержание алломорфа I α в образцах БНЦ от 72 % до 56 % [Vazquez, 2013].

В настоящее время в мировом сообществе накоплено достаточно экспериментального опыта по получению БНЦ, при этом исследователи делают упор на высоком качестве БНЦ в сравнении с растительной целлюлозой. Для обоснования преимуществ БНЦ ученые стараются применить многообразные виды анализа [Gama, 2016; Keshk, 2014; Campano, 2016; Velásquez-Riaño, 2017; Pacheco, 2017;

Hussain, 2019; Urbina 2021], образцы БНЦ сравниваются между собой, однако до сих пор отсутствует единый критерий качества. Поэтому, мы предлагаем ввести два критерия качества БНЦ: степень кристалличности и содержание алломорфа I α , определенные методом РСА, так как только РСА можно считать арбитражным методом для определения структурных характеристик БНЦ [French, 2014; French, 2020]. Чем больше эти показатели, тем выше качество образцов БНЦ.

5.5 Получение бактериальной наноцеллюлозы из целлюлозосодержащего сырья в условиях опытно-промышленного производства

Разработаны фундаментальные основы технологии получения БНЦ из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья. Блочно в разработанной технологии БНЦ можно выделить следующие основные этапы:

- химическая обработка сырья осуществляется двустадийно разбавленным раствором азотной кислоты (4 мас. %) и последующей обработкой разбавленным раствором гидроксида натрия (4 мас. %) с получением технической целлюлозы азотнокислым способом;
- ферментативный гидролиз технической целлюлозы;
- приготовление питательной среды на основе энзиматического гидролизата из технической целлюлозы;
- биосинтез БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12;
- очистка БНЦ с помощью 2 мас.% раствора гидроксида натрия и 1 мас. % раствора соляной кислоты;
- стерилизация БНЦ;
- упаковывание БНЦ.

Разработанная технология была апробирована на опытно-промышленном производстве ИПХЭТ СО РАН. Аппаратурно-технологическая схема установки получения бактериальной целлюлозы приведена на рис. 5.26 Рассмотрим работу по схеме на примере использования в качестве сырья шелухи овса.

На первой стадии проводили предварительную обработку 10 кг сырья в 250 л реакторе (поз. 1). В реактор дозировали расчетное количество воды из мерника (поз. 2) и 56 %-ую азотную кислоту для получения 4 % раствора. В реакторе проводили обработку сырья при гидромодуле 1:20 (мас./об.) в течение заданного времени. В ходе процесса осуществляли постоянное перемешивание и обеспечивали температурный режим обработки с помощью теплообменника (поз. 3). Термостат осуществлял циркулирование теплоносителя через теплообменный элемент реактора и поддержание постоянной температуры в реакторе. После окончания предварительной обработки реакционная масса сбрасывалась в емкостной фильтр (поз. 4), где проводили отделение пульпы от отработанного раствора. Отделенную на фильтре жидкую фазу сливали в сборник (поз. 5) Полученную пульпу промывали в реакторе (поз. 1) водой до нейтральной реакции. В результате получили 3,7 кг пульпы в пересчёте на абсолютно сухое вещество. Для получения целлюлозы полученный продукт азотнокислой обработки шелухи овса обрабатывали в реакторе (поз. 1) 4%-ным раствором гидроксида натрия. Затем отфильтровывали целлюлозу на фильтре (поз. 4) и промывали до нейтральной реакции. В результате из шелухи овса получали 2,4 кг технической целлюлозы в пересчёте на абсолютно сухое вещество. Процесс получения целлюлозы проводили многократно для наработки необходимого количества субстрата. Подготовку воды для ферментативного гидролиза проводили в ионообменной установке водоподготовки (поз. 7). Ферментативный гидролиз проводили последовательно в ферментёре объемом 11 л (поз. 6) – для получения питательной среды для приготовления инокулята и в ферментёр объемом 100 л (поз. 9) – непосредственно для наработки гидролизата в требуемом количестве. Суспензию в ферментёре термостатировали и вносили ферментные препараты CelloLux-A и BrewZyme BGX. Продолжительность ферментативного гидролиза 72 ч. Поскольку для биосинтеза ВС требуется стандартная питательная среда, то ферментативный гидролиз проводили при концентрации субстрата 40 г/л, чтобы имелся технологический запас и упростился процесс приготовления питательной среды, в которой после стандартизации должно содержаться 20 г/л глюкозы. По завершении процесса ферментативного

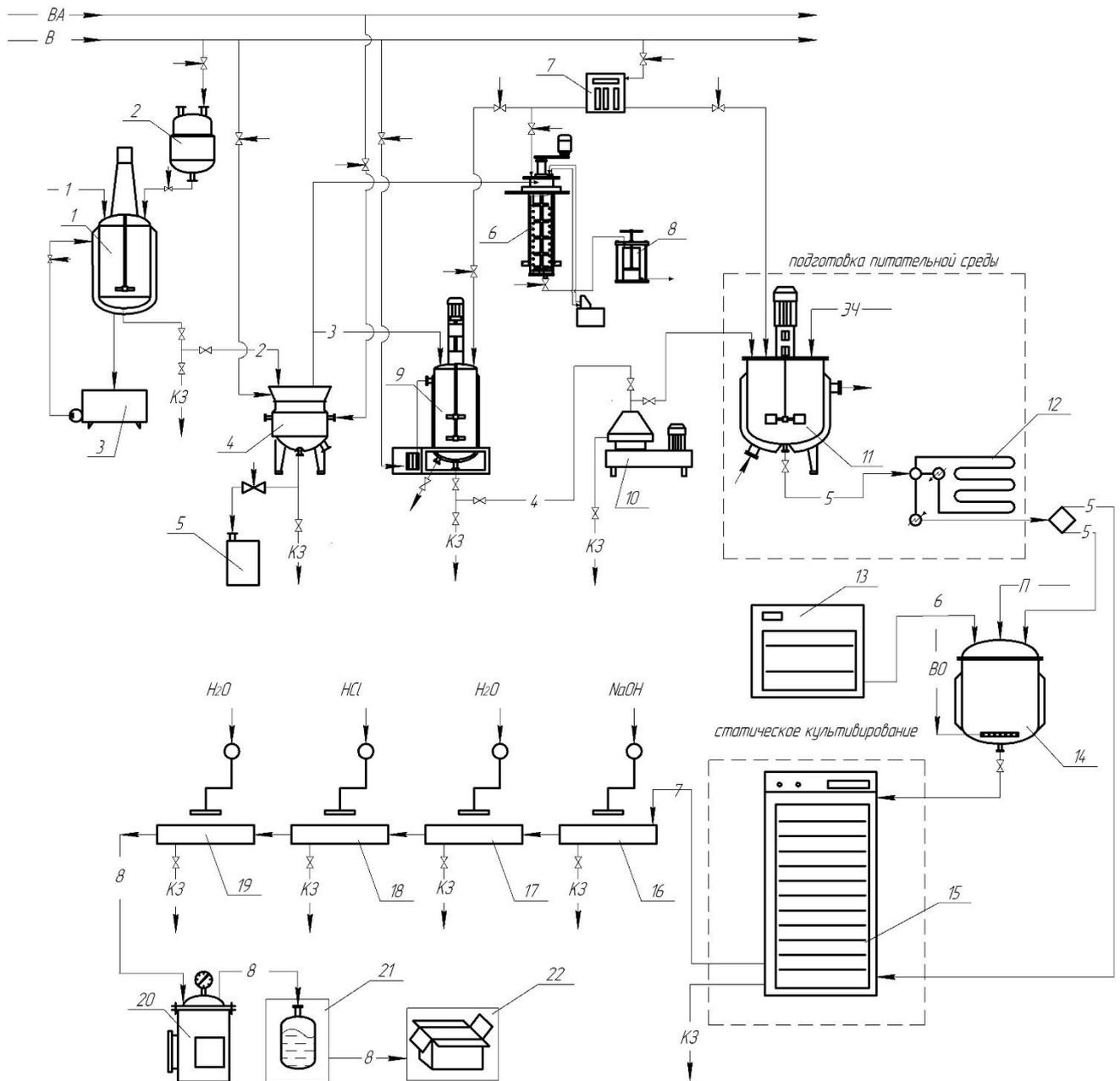


Рисунок 5.26 – Аппаратурно-технологическая схема установки получения бактериальной целлюлозы

1 – шелуха овса или мискантус, 2 – реакционная масса, 3 – техническая целлюлоза шелухи овса или мискантуса, 4 – ферментативный гидролизат, 5 – питательная среда, 6 – инокулят, 7 – техническая БНЦ, 8 – очищенная БНЦ, ВА. Вакуум, ВО. Воздух, ВЗ. Холодная вода, ЭЧ. Экстракт черного чая, П. Продуцент, КЗ. Промывные стоки

1 – реактор, 2 – мерник, 3 – теплообменник, 4 – фильтр емкостной, 5 – сборник, 6 – 11-л ферментатор, 7 – установка водоподготовки, 8 – пресс корзиночный, 9 – 100-л ферментер, 10 – центрифуга, 11 – емкость культуральной среды, 12 – стерилизатор, 13 – термостат суховоздушный, 14 – смеситель, 15 – климатическая камера Binder KB 400, 16-19 – ванна промывки, 20 – стерилизатор паровой, 21 – контейнер, 22 – ящик

гидролиза получен ферментативный гидролизат с концентрацией редуцирующих сахаров 32,2 г/л, что эквивалентно выходу 72,4% (в лабораторных условиях выход редуцирующих сахаров составил 73,5 % при концентрации субстрата 30,0 г/л). Таким образом, процесс ферментативного гидролиза целлюлозы из шелухи овса успешно масштабирован.

Ферментативный гидролизат, полученный из технической целлюлозы шелухи овса отфильтровывали от остатков субстратов: из ферментёра (поз. 6) передавали в корзиночный пресс (поз. 8), а из ферментёра (поз. 9) в центрифугу (поз. 10), в результате получали целевую фракцию – гидролизат. Гидролизат использовали для приготовления питательной среды в ёмкости культуральной среды (поз. 11), куда также в расчетном количестве вносили экстракт черного чая и осуществляли перемешивание при температуре 100 °С, что позволило получить готовые питательные среды с концентрацией экстрактивных веществ черного байхового чая 1,6 г/л. После приготовления готовой питательной среды проводили ее тепловую обработку стерилизаторе (поз. 12) и направляли в смеситель (поз. 14).

Продуцент *Medusomyces gisevii* Sa-12, предварительно адаптировали на питательной среде, полученной из ферментативного гидролизата в ферментёре объемом 11 л (поз. 6), в суховоздушном термостате (поз. 13) с получением инокулята. Инокулят вносили в питательную среду в количестве 10 об.% в смеситель (поз. 14). Среду с внесённым инокулятом, имеющую начальную концентрацию редуцирующих сахаров 20 г/л разливали в контейнеры. Контейнеры размещали в климатическую камеру Binder KB (поз. 15) и проводили биосинтез БНЦ в течение 7 суток. В климатической камере проводилось автоматическое термостатирование среды с помощью программируемой контроллером системой нагрева с принудительной циркуляцией потоков, что гарантирует равномерную температуру на каждой полке камеры. После завершения культивирования гель-плёнки БНЦ отделяли от культуральной среды и промывали дистиллированной водой. После промывки грязную (с остатками питательной среды и клетками) БНЦ очищали в ваннах промывки (поз. 16-19) в соответствии с п. 2.3.5 б. Выход БНЦ в климати-

ческой камере объемом 400 л составил 10% от концентрации глюкозы по сухому веществу, что соответствует выходу в лабораторных условиях.

Чистую, жемчужно-белую БНЦ стерилизовали острым паром в паровом стерилизаторе (поз. 20) при 140 °С в течение 40 мин и помещали в контейнеры (поз. 21) и упаковывали в коробки (поз. 22). При полной загрузке климатической камеры в одном цикле используется 118 л питательной среды, что позволяет получить 11,8 кг влажной БНЦ. Для получения 118 л питательной среды необходимо переработать по разработанной схеме 15 кг шелухи овса.

Таким образом, в реализованной технологической линии производства масштабированы основные операции трансформации плодовых оболочек овса в БНЦ с сохранением на каждой технологической стадии выходов полупродуктов, полученных при лабораторных исследованиях. В итоге получен оптимистичный выход: 80,5 т БНЦ влажностью 99% из 100 т шелухи овса. Это свидетельствует об успешных инженерных решениях на каждой технологической стадии производства БНЦ из шелухи овса.

Исчерпывающее культивирование

При разработке исчерпывающего культивирования в основу положен принцип полного расходования питательной среды в процессе культивирования. Необходимо было найти такое соотношение площади питательной среды к высоте её слоя (S/h), при котором по завершении биосинтеза БНЦ вся питательная среда расходуется и культуральной жидкости больше не остаётся. В табл. 5.11 приведены результаты исчерпывающего культивирования на полусинтетической питательной среде. Приведены усреднённые данные трех повторностей.

Самый низкий выход получен в контрольном опыте (стандартное статическое культивирование) при соотношении $S/h=44:3$. При соотношении S/h менее 44:1 исчерпание среды наступает быстрее, чем заканчивается биосинтез БНЦ, при этом плёнка БНЦ слегка «подвяливается» от недостатка жидкости, а при большем – часть питательной оставалась неизрасходованной. Максимальный выход БНЦ наблюдается при соотношении $S/h=44:1$ (9 суток культивирования), он повышает

ся в 2,56 раза по сравнению с контролем, именно такое соотношение площади питательной среды к высоте её слоя можно рекомендовать для культивирования БНЦ на гидролизной среде.

Таблица 5.11 – Выход БНЦ в зависимости от соотношения S/h при исчерпывающем культивировании

Объём культуральной жидкости, мл	Соотношение S/h	Продолжительность культивирования, сутки	Выход по сравнению с контролем, %
25	44:0,5	5	126
30	44:0,6	6	130
35	44:0,7	7	144
40	44:0,8	7	156
45	44:0,9	8	163
50	44:1,0	9	256
55	44:1,1	9	151
Контроль, 200	44:3,0	9	100

Найденный режим был применён при биосинтезе БНЦ на среде ферментативного гидролизата субстрата 3 шелухи овса; ферментативный гидролиз был проведён в ферментёре объёмом 11 л; биосинтез БНЦ проведен в климатической камере Binder-400, в металлических контейнерах площадью поверхности 0,34 м². Общий объем питательной среды с начальной концентрацией редуцирующих веществ 20 г/л составлял 10 л.

Если на синтетической среде выход БНЦ повысился в 2,56 раза, то на среде ферментативного гидролизата субстрата 3 из шелухи овса – в 2,41 раза. Таким образом, выход составил 1,94 т БНЦ влажностью 98 % из 1 т шелухи овса.

Сравнение технологии получения БНЦ с мировыми аналогами

Разработанные основы технологии получения БНЦ из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья БНЦ имеют следующие преимущества перед описанными мировыми аналогами:

1) унифицированность используемого целлюлозосодержащего сырья: БНЦ успешно получена на двух видах легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья, принципиально отличающихся технически и морфологически. Это

массовый отход сельского хозяйства с нулевой себестоимостью (плодовые оболочки овса) и инновационное быстрорастущее (энергетическое) растение, интродукция которого в Западной Сибири успешно осуществлена в течение 20 лет (мискантус). Успех биосинтеза БНЦ из обоих видов сырья указывает на фундаментальный характер разработанных основ технологии, его универсальность и возможность детализации технологии на любых видах целлюлозосодержащего сырья.

2) разработанная авторская предварительная обработка сырья характеризуется:

а) технологичностью – осуществляется при атмосферном давлении в стандартном емкостном оборудовании с использованием простых, доступных реактивов: азотной кислоты и гидроксида натрия. Стабильность и воспроизводимость результатов подтверждена многократной апробацией в условиях опытно-промышленного производства;

б) экологичностью – используются разбавленные растворы химических реагентов, растворителем является вода, осуществляется замкнутый цикл производства;

в) экономичностью – используются дешёвые реагенты, варочные растворы утилизируются: отработанная азотная кислота с получением комбинированного азотного лигногуминового удобрения, гидроксида натрия – с извлечением лигниновой компоненты сырья;

3) найдены технологические режимы предварительной обработки сырья, позволяющие получить высококачественный субстрат, ферментативный гидролиз которого позволяет получить биологически доброкачественную среду, не требующую дополнительных технологических обработок (детоксификации, нейтрализации кислот и т.п.), оптимизирован процесс ферментативного гидролиза;

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

5) независимо от вида сырья и способа его предварительной обработки, культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 способна синтезировать БНЦ стандартного качества: степень кристалличности составляет 86-93 %, содержание алломорфа I-альфа – 96-98 %. Это уникальные характеристики, превышающие все известные мировые аналоги.

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

- программы и методики экспериментальных исследований (13 шт.);
- технические условия на субстрат из плодовых оболочек овса и мискантуса для биосинтеза бактериальной целлюлозы (ТУ 17.11.14-237-10018691-2018, зарег. 29.10.2018 в ФБУ «Алтайский ЦСМ»); на ферментативные гидролизаты целлюлозы плодовых оболочек овса и мискантуса (ТУ 17.11.14-238-10018691-2018, зарег. 29.10.2018 в ФБУ «Алтайский ЦСМ»); на бактериальную наноцеллюлозу из плодовых оболочек овса и мискантуса (ТУ 17.11.14-244-10018691-2019, зарегистрирован в ФБУ «Алтайский ЦСМ» рег № 009212 от 20.06.2019 г.) и лабораторные технологические инструкции на получение субстрата и ферментативных гидролизатов;
- технологический регламент получения бактериальной целлюлозы из плодовых оболочек овса и мискантуса ТР10018691.02101.00230 от 22.11.2019 г., утвержденный директором ИПХЭТ СО РАН.

5.6 Применение бактериальной наноцеллюлозы в ветеринарии и медицине

Исследование гемостатической активности бактериальной наноцеллюлозы

Исследования гемостатической активности проводились в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ под руководством д.м.н., заведующей лабораторией патологии и фармакологии гемостаза Белозерской Г.Г.

Экспериментальные исследования проводили на 6 кроликах породы «Шиншилла» обоего пола массой от 3,0 до 3,5 кг. Остановку развившегося капиллярно-

паренхиматозного кровотечения выполняли одновременно путем нанесения на одну рану образца БНЦ, а на другую – марлевого тампона (рис. 5.27) согласно [Руководство..., 2012]. В табл. 5.12 представлены сводные результаты исследований гемостатической эффективности образцов из БНЦ в сравнении с контролем – марлевым тампоном и гемостатическим препаратом «Гемотекс».

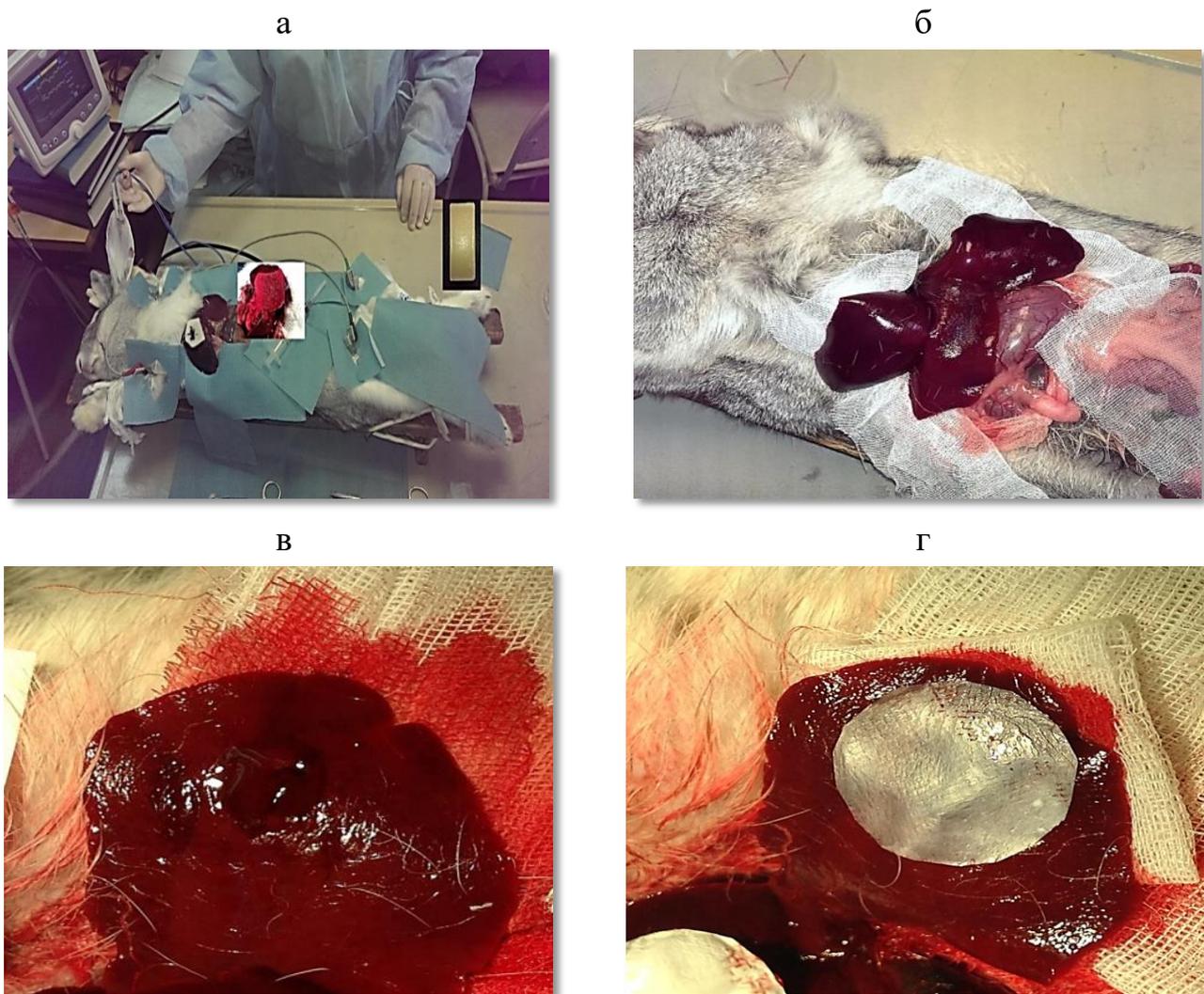


Рисунок 5.27 – Определение гемостатической активности:

- а) кролик породы «Шиншилла»; б) извлеченный передний край печени кролика после тотальной лапаротомии; в) развившееся капиллярно-паренхиматозное кровотечение после отсечения сегмента печени;
- г) аппликация на раневую поверхность печени кролика.

В результате проведенных исследований было установлено, что образцы БНЦ обладают высокой гемостатической активностью. Сравнительное исследование гемостатической эффективности образцов БНЦ с самым эффективным

препаратом «Гемотекс», показало, что образцы БНЦ уменьшали время остановки кровотечения в 1,8 раз. При этом масса кровопотери снижалась в 15 раз по сравнению с препаратом «Гемотекс». Установлено, что время остановки кровотечения и масса кровопотери для БНЦ в 7 раз меньше чем для контроля – марлевого тампона. При визуальной оценке раневой поверхности после снятия образца было отмечено образование однородной нежной эластичной пленки, которая покрывала всю раневую поверхность и не смывалась током крови, под которой развивался процесс местного тромбообразования. Получен пат. РФ № 2624242.

Таблица 5.12 – Сводные результаты исследований гемостатической эффективности

Образец	Время остановки кровотечения, с	Кровопотеря, г	Гемостатическая активность по отношению к контролю, %
БНЦ (опыт 1)	37 ± 6	0,425 ± 0,239	78,23 ± 11,74
БНЦ (опыт 2)	35 ± 7	0,900 ± 0,173	84,93 ± 5,87
БНЦ (опыт 3)	34 ± 9	0,693 ± 0,208	87,35 ± 13,11
БНЦ (опыт 4)	35 ± 9	0,088 ± 0,026	92,83 ± 13,93
«Гемотекс»	60 ± 9	1,359 ± 0,119	70,50 ± 10,59
Контроль (марлевый тампон)	246 ± 22	5,936 ± 1,433	0,00 ± 5,00

На проведенную работу получены акты испытания и внедрения (Приложение 9).

Исследование возможности применения бактериальной наноцеллюлозы в абдоминальной хирургии

Исследование возможности применения БНЦ в абдоминальной хирургии (герниология, герметизация кишечного шва, хирургический гемостаз) было выполнено в ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России на кафедре факультетской хирургии им. И.И. Неймарка и госпитальной хирургии с курсом ДПО под руководством д.м.н., профессора Лубянского В.Г. и д.м.н., профессора Жарикова А.Н.

Исследования, проведенные на собаках, показали, что достигнуты положительные результаты: при микробиологическом исследовании с условно-

патогенной архивной культурой *E. coli* БНЦ проявляет антибактериальную активность; после фиксации БНЦ на апоневрозе передней брюшной стенки и на ране тонкой кишки инфицирования материала не происходит; спустя 14 сут представленные образцы способствуют разрастанию грануляционной ткани, закрывающей как кишечный, так и апоневротический шовный материал, влажная БНЦ обладает гемостатическим эффектом. Публикации: [Zharikov, 2018 a; Zharikov, 2018 b].

На проведенные исследования получены акты испытаний (Приложение 9).

5.7 Техничко-экономическая оценка разработанной технологии бактериальной наноцеллюлозы из шелухи овса и мискантуса

Проектируемая мощность – 50 т влажной БНЦ в год выбрана исходя из потребности России в эффективных перевязочных материалах для лечения ожогов. В нашей стране ежегодно за медицинской помощью обращается 420-450 тысяч пострадавших от ожогов, 80 % случаев характеризуется незначительной площадью поражения (то есть менее 15 % тела) [Новиков, 2019]. Исходя из того, что площадь поверхности тела взрослого человека составляет 1,73 м², можно рассчитать, что при 4-х кратных перевязках 871 920 м² БНЦ в год.

По разработанной технологии 50 т БНЦ соответствуют 859 375 м². (Справочно: 1 кг это 17,2 м², 0,058 кг это 1 м²).

Производственный цикл составит 11 месяцев, валовый выпуск БНЦ 4545,45 кг/месяц или 151,5 кг/сутки; 1 месяц в году будут проводиться профилактические работы. Процесс будет осуществляться стационарным способом, так как качественные раневые покрытия с влажностью 99 % можно получить только таким способом. Для обеспечения требуемого производственного объема потребуется 60 растительных камер площадью 130 м² каждая, продолжительность одного цикла биосинтеза 9 суток. Контейнеры с питательной средой 0,5x0,5x0,05 (м³) будут устанавливаться на 10-ти этажных этажерках.

В табл. 5.13 приведена смета затрат на сырьё и материалы, в табл. 5.14 – проектная производственная калькуляция себестоимости БНЦ.

Таблица 5.13 – Смета затрат на сырьё и материалы при производстве БНЦ

Статьи затрат	Единица измерения	Норма расхода на 1 кг БНЦ	Цена реагента, руб	Затраты	
				на 1 кг БНЦ, руб.	на валовый выпуск, руб.
1 Сырьё и материалы на технологические нужды					
Шелуха овса	кг	0,220	0,5	0,110	5 500
Вода техническая	м ³	0,005	9,8	0,490	24 500
Кислота азотная 60 %	кг	0,170	16,7	2,839	141 950
Гидроксид натрия техн.	кг	0,100	2,28	0,228	11 400
Кислота соляная 35 %	кг	0,010	7,60	0,076	3 800
Целлюлюкс-А	кг	0,001	1100	1,100	55 000
Ультрафло-Коре	кг	0,001	1300	1,300	65 000
Вода очищенная	м ³	0,0012	12,1	0,0145	725
2 Вспомогательные материалы на технологические нужды					
Чай черный байховый	кг	0,010	190	1,900	95 000
Глюкоза	кг	0,004	46,0	0,184	9 200
Ткань полипропиленовая	м.п.	0,022	5,0	0,110	5 500
Ортофосфорная кислота 85,0 %	л	0,001	65,0	0,065	3 250
Гидроксид аммония 25,0 %	л	0,001	12,5	0,0125	625
Итого				8,429	421 500

Наибольший вклад в стоимость сырья вносят азотная кислота и ферментные препараты. Поэтому десятикратное использование одного варочного раствора азотной кислоты является важным не только технологическим, но и экономическим преимуществом.

Предприятие будет работать непрерывно, но в односменном режиме. На участке по предобработке целлюлозосодержащего сырья азотной кислотой вредные условия труда, на остальных участках – нормальные. Списочная численность работающих – 27 чел., среднемесячная заработная плата – 39 200 руб.

При расчете цены заложена рентабельность 20 %.

В работе [Gama, 2016] представлен проект производства БНЦ мощностью 504 т/год, при этом БНЦ планируется продавать по цене 25 \$/кг. На сайте

Таблица 5.14 – Проектная производственная калькуляция себестоимости БНЦ на единицу продукции и годовой выпуск (50 000 кг /год)

Статьи затрат	Затраты на 1 кг БНЦ, руб	Стоимость годового выпуска, руб
Сырье и материалы на технологические нужды	8,43	421 500
Электроэнергия на технологические нужды	15,48	774 000
Водоснабжение и водоотведение на технологические нужды	41,92	2 096 000
Заработная плата сотрудников	235,20	11 760 000
Отчисления на социальное страхование ОПС	63,50	3 175 000
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	141,32	7 066 000
Цеховые расходы и общезаводские расходы	39,54	1 997 000
Себестоимость производства	545,39	27 269 500
Попутная продукция (вычит.)		
Лигногуминовое удобрение (0,5 кг/1 кг БНЦ)	24,05	1 202 500
Аморфный SiO ₂ (0,004 кг/ 1 кг БНЦ)	0,32	16 200
Производственная себестоимость	521,02	26 050 800
Коммерческие расходы	26,05	1 302 500
Коммерческая себестоимость	547,07	27 353 500
Цена (без НДС и акциза)	657,00	32 850 000

<https://russian.alibaba.com> цена пищевой ната-де-кока, производимой странами Азиатско-Тихоокеанского региона (Филиппины, Индонезия, Вьетнам, Таиланд, Китай) варьирует от 0,2 до 1,0 \$/кг. Согласно представленным в данной работе расчётам, цена БНЦ составляет ~ 9 \$/кг (при курсе доллара 75 руб/\$), то есть российская БНЦ дешевле европейской в 2,5 раза, но дороже азиатской в 9-45 раз.

Согласно [Zhong, 2020] рынок БНЦ в 2022 году составит 498 млн. \$, в 2026 году превысит 700 млн. \$, поэтому важно создание отечественного производства.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

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

2. Исследован ферментативный гидролиз продуктов химической предобработки целлюлозосодержащего сырья:

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

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

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

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

- одностадийной обработки сырья разбавленным раствором азотной кислоты;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- а.с.в. – абсолютно сухое вещество
БНЦ – бактериальная наноцеллюлоза
ГЖХ – газожидкостная хроматография
ИК-спектр – инфракрасный спектр
М.д. – массовая доля
МЭК – мультиэнзимная композиция
ПАО – продукт азотнокислой обработки
ПЩД – продукт щелочной делигнификации
РВ – редуцирующие вещества
РСА – рентгенотруктурный анализ
СВ – сухие вещества
СП – степень полимеризации
ТМА – термомеханический анализ
ТГА – термогравиметрический анализ
ФП – ферментный препарат

БЛАГОДАРНОСТИ

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

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

фессора В.Г. Лубянского и д.м.н., профессора А.Н. Жарикова за исследование применения БНЦ в хирургии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Абрамова И.М., Медриш М.Э., Савельева В.Б., Романова А.Г. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в контроле качества зерновых дистиллятов // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87, № S5. – С. 173-174. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10280>
- 2 Абрамова И.М., Сербя Е.М. Биотехнологические процессы в производстве продуктов питания и кормов // Пищевая промышленность. – 2019. – № 4. – С. 12-14. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10001>
- 3 Абрамова И.М., Бессонов В.В., Богачук М.Н., Кривченко В.А., Макаренко М.А., Сокурченко М.С., Соловьев А.О., Туршатов М.В., Шевякова Л.В. Пути повышения пищевой ценности зерновой клетчатки спиртового производства // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89, № 5. – С. 110-118. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10071>
- 4 Абрамова И.М., Туршатов М.В., Кривченко В.А., Соловьев А.О., Никитенко В.Д. Биоконверсия растительного сырья в этиловый спирт и кормопродукты по замкнутому циклу // Биотехнология. – 2021. – Т. 37, № 4. – С. 106-111. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-4-106-111>
- 5 Агеев Л.М., Корольков С.И. Химико-технический контроль и учёт гидролизного и сульфитно-спиртового производства. – М., Л.: ГОСЛЕСБУМИЗДАТ, 1953. – 403 с.
- 6 Адамчик Д.А., Бычковский П.М., Юркштович Т.Л., Александрова Е.Н. Сравнительная оценка противоопухолевой активности цисплатина, иммобилизованного на модифицированных хлопковой и бактериальной целлюлозах // Онкологический журнал. – 2012 а. – Т. 6, № 3 (23) – С. 30-33.
- 7 Адамчик Д.А., Бычковский П.М., Юркштович Т.Л., Хрипунов А.К., Смыслов Р.Ю., Александрова Е.Н. Противоопухолевая активность цисплатина и проспирина, иммобилизованных на окисленной бактериальной целлюлозе // Российский биотерапевтический журнал. – 2012 б. – Т. 11, № 2. – С. 2.
- 8 Айвазян С.А., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Прикладная статистика: Основы моделирования и первичная обработка данных. Справочное изд. М.: Финансы и статистика, 1983. – 471 с.
- 9 Айлер Р. Химия кремнезема в 2-х частях / М.: Мир, 1982. – 1128 с.
- 10 Алексеева С.А., Вылегжанина М.Э., Кутин А.А., Хрипунов А.К., Лаврентьев В.К., Суханова Т.Е. Влияние условий сушки на структуру и морфологию гелевых пленок бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter xylinus* // Физико-химия полимеров: синтез, свойства и применение. – 2015. – № 21. – С. 149-153.
- 11 Алешина Л.А., Глазкова С.В., Луговская Л.А., Подойникова М.В., Фофанов А.Д., Силина Е.В. Современные представления о строении целлюлоз (обзор) // Химия растительного сырья. – 2001. – № 1. – С. 5-35.

12 Алфёров С.В., Воеводская О.А., Нгуен В.Т., Арляпов В.А., Понаморёва О.Н., Решетиллов А.Н. Уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans* как биокатализаторы в медиаторном биотопливном элементе // Сенсорные системы. – 2011. – Т. 25, № 4. – С. 346-351.

13 Алфёров С.В., Минайчева П.Р., Арляпов В.А., Асулян Л.Д., Алфёров В.А., Понаморёва О.Н., Решетиллов А.Н. Биоанод для микробного топливного элемента на основе бактерий *Gluconobacter oxydans*, иммобилизованных в полимерную матрицу // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50, № 6. – С. 570.

14 Андреев В.М., Баринлов В.А., Варфоломеев С.Д., Годжаев З.А., Гришин В.И., Дьяконов А.А., Есяков С.Я., Лачуга Ю.Ф., Каляев И.А., Луинин К.А., Матюхин В.Ф., Панченко В.Я., Редько И.Я., Рокецкий Л.Ю., Сигов А.С., Стенников В.А., Шестаков А.Л., Цивадзе А.Ю. Создание комплексных интегрированных систем энергоснабжения на базе инновационных технологий в условиях происходящих в мире процессов // Электричество. 2020. № 3. С. 4-12 <https://doi.org/10.24160/0013-5380-2020-3-4-12>

15 Андреев В.М., Баринлов В.А., Варфоломеев С.Д., Лачуга Ю.Ф., Матюхин В.Ф., Панченко В.Я., Редько И.Я., Сигов А.С., Стенников В.А. Создание комплексных интегрированных систем энергоснабжения // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Инженерные исследования. 2020. Т. 21. № 4. С. 224-237. <https://doi.org/10.22363/2312-8143-2020-21-4-224-237>

16 Аникеев, В.В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / В.В. Аникеев, К.А. Лукомская. – М.: Просвещение, 1983. – 128 с.

17 Архарова Н.А., Северин А.В., Хрипунов А.К., Крашенинников С.В., Ткаченко А.А., Орехов А.С., Давыдова Г.А., Ракова Е.В., Клечковская В.В. Композитные пленки на основе бактериальной целлюлозы и нанокристаллов гидроксиапатита: морфология, структура и свойства // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2019. – Т. 61, № 5. – С. 448-457.

18 Атыкян Н.А., Ревин В.В., Сафонов А.В., Карасева Я.Ю., Прошин И.М., Шутова В.В. Сорбенты на основе бактериальной целлюлозы для выделения Sr, U, Pu и Am из растворов // Радиохимия. – 2021. – Т. 63, № 5. – С. 476-483.

19 Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.

20 Байбакова О.В. Разработка технологии получения биоэтанола из нетрадиционного целлюлозосодержащего сырья: дис. ... канд. техн. наук: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Щелково, 2017. – 150 с.

21 Баклагина Ю.Г., Хрипунов А.К., Ткаченко А.А., Копейкин В.В., Матвеева Н.А., Лаврентьев В.К., Нилова В.К., Суханова Т.Е., Смыслов Р.Ю., Занавескина И.С., Клечковская В.В., Фейгин Л.А. Сорбционные свойства

гель-пленок бактериальной целлюлозы // Журнал прикладной химии. – 2005. – Т. 78, № 7. – С. 1197-1202.

22 Белопухов С.Л., Гришина Е.А. Исследование химического состава и ростстимулирующего действия экстрактов из гумифицированной льняной костры // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2012. – № 1 (2). – С. 97-103.

23 Белоусова З.П., Пурыгин П.П., Дуюнова А.С., Кленова Н.А., Тряпочкина А.С. Синтез и изучение антибиотических свойств 6-(2-фталалимидоэтансульфоната) бактериальной целлюлозы // Бутлеровские сообщения. – 2020. – Т. 61, № 2. – С. 29-36.

24 Бессонов В.В., Богачук М.Н., Макаренко М.А., Сокуренок М.С., Шевякова Л.В., Абрамова И.М., Туршатов М.В., Кривченко В.А., Соловьев А.О. Исследование биохимического состава зерновой клетчатки спиртового производства // Пищевая промышленность. – 2020. – № 2. – С. 12-15. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10014>

25 Богатырева А.О., Сапунова Н.Б., Щанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальных экзополисахаридов на средах с отходами биотехнологических производств // Вестник Казанского технологического университета. – 2016. – Т. 19, № 24. – С. 142-145.

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

27 Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н., Сакович Г.В. Новые сырьевые источники целлюлозы для технической химии // Вестник Казанского технологического университета. – 2011. – № 7. – С. 205–212.

28 Будаева В.В., Гисматулина Ю.А., Золотухин В.Н., Сакович Г.В., Вепрев С.Г., Шумный В.К. Показатели качества целлюлозы, полученной азотнокислым способом в лабораторных и опытно- промышленных условиях из мискантуса // Ползуновский вестник. – 2013. – № 3. – С. 162-167.

29 Бухалков М.И. Планирование на предприятиях машиностроения: учебное пособие. – Самара: СамГТУ, 1995. – 56 с.

30 Буянов А.Л., Гофман И.В., Хрипунов А.К., Ткаченко А.А., Ушакова Е.Э. Высокопрочные биосовместимые гидрогели на основе полиакриламида и целлюлозы: синтез, механические свойства и перспективы применения в качестве искусственных заменителей хрящевых тканей // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2013. – Т. 55, № 5. – С. 512-522.

31 Бычковский П.М., Юркштович Т.Л., Адамчик Д.А., Дрепаков Е.Г., Тагиль И.И. Получение полимерных лекарственных форм противоопухолевых веществ на основе окисленной бактериальной целлюлозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16, № 5. – С. 17.

32 Бычковский П.М., Юркштович Т.Л., Голуб Н.В., Соломевич С.О., Юркштович Н.К., Адамчик Д.А. Биоразлагаемые пленки на основе

окисленной бактериальной целлюлозы: получение, структура, свойства // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. – 2019. – Т. 61, № 4. – С. 261-271.

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

34 Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: практический курс. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.: ил.

35 Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология (классический университетский учебник). – М.: Издательский центр "Академия", 2005. — 472 с.

36 Варфоломеев С.Д., Ефременко Е.Н., Крылова Л.П. Биотоплива // Успехи химии. – 2010. – Т. 79. – № 6. – С. 544-564.

37 Венгеревич Н.Г., Антоненкова Е.В., Андреев В.А., Зайцева О.Б., Хрипунов А.К., Попов В.А. Применение биоактивных наноматериалов при раневом процессе // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2011. – № 1 (33). – С. 162 – 167.

38 Венгеревич Н.Г., Хрипунов А.К., Рузанова Э.А., Никифоров А.С., Иванов И.М., Ткаченко А.А. Исследование возможности применения бактериальной целлюлозы на этапах медицинской эвакуации // Биомедицинский журнал медлайн.ру. – 2014. – Т.15. – С. 620-628 [Электронный ресурс: www.medline.ru].

39 Власов А.Г., Флоринская В.А., Венедиктов А.А., Дутова К.П., Морозов В.Н., Смирнова Е.В. Инфракрасные спектры неорганических стекол и кристаллов / под. ред. А.Г. Власова и В.А. Флоринской. Изд-во «Химия»: Л., 1972. 304 с.

40 Волков О.И., Скляренко В.К. Экономика предприятия. Учебное пособие. 2-е издание. – М.: Инфра-М, 2013. – 264 с.

41 Воробьева Л.И. Техническая микробиология: учебн. пособие. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987. – 168 с.

42 Вураско А.В., Дрикер Б.Н., Мертин Э.В., Астратова Г.В. Получение целлюлозы щелочно-окислительно-органосольвентным способом // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 11 (часть 3). – С. 586–592.

43 Гаврюшина И.А., Громовых Т.И., Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Пономаренко В.И., Кисиль О.В., Садыкова В.С. Антимикробные свойства водорастворимых полисахаридов и спиртовых экстрактов мицелия *Laetiporus sulphureus* (bull.) murrill и разработка биотехнологии его получения в иммобилизованной культуре на бактериальной целлюлозе // Антибиотики и химиотерапия. – 2020. – Т. 65. – № 1-2. – С. 10-14.

44 Гельфанд Е.Д. Технология биотоплив: учебное пособие. – Архангельск: Архангельск, 2012. – 57 с.

45 Гернет М.В. Культивирование продуцентов целлюлаз. II. Стабилизация ферментов в растворах // Биотехнология. – 1985. – № 3. – С. 36-42.

46 Гернет М.В., Борисенко О.А., Грибкова И.Н. Комплексный

активатор брожения в технологии пива // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. – 2019 а. – Т. 8, № 3 (47). – С. 134-138.

47 Гернет М.В., Грибкова И.Н., Кобелев К.В. Биотехнологические аспекты получения напитков брожения на растительном сырье с повышенным сроком хранения // Пищевая промышленность. – 2019 б. – № 4. – С. 33-34. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2019-2-3-13-16>

48 Гернет М.В., Грибкова И.Н., Захаров М.А. Выявление показателей для определения прогнозирования сроков стойкости пива верхового и низового брожения // Пищевая промышленность. – 2020. – № 2. – С. 16-19. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10015>

49 Гисматулина Ю.А., Будаева В.В. Сравнение целлюлоз, выделенных из мискантуса, с хлопковой целлюлозой методом ИК-Фурье спектроскопии // Ползуновский вестник. – 2014. – № 3. – С. 177-181.

50 Гисматулина Ю. А. Химический состав перспективного недревесного сырья – мискантуса и соломы льна-межеумка // Фундаментальные исследования. – 2016. – № 4-2. – С. 249-252.

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

52 Гладченко М.А., Гайдамака С.Н., Мурыгина В.П., Варфоломеев С.Д. Анаэробная конверсия лигноцеллюлозы в материалы для получения биотоплива - летучие жирные кислоты и этанол // Биотехнология. – 2018. – Т. 34. – № 3. – С. 42-52. <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2478-3>

53 Гладышева Е.К. Разработка технологии получения бактериальной целлюлозы из плодовых оболочек овса: дис. ... канд. технич. наук: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Щелково, 2018. – 157 с.

54 Горбунова С.Ю. Использование водного гиацента *Eichornia crassipes* для биологической доочистки бытовых сточных вод // Экология моря. – 2009. – Т. 78. – С. 40-43.

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

56 ГОСТ 6840-78. Целлюлоза. Метод определения содержания альфа-целлюлозы. Издание официальное. – М., 1978. – 6 с.

57 ГОСТ 10820-75. Целлюлоза. Метод определения массовой доли пентозанов. Издание официальное. – М., 1975. – 7 с.

58 ГОСТ 10246-86. Семена гороха. Сортовые и посевные качества. Технические условия. Взамен ГОСТ 10246—81 / [Текст] – М. Изд-во стандартов, 1987. – 6 с. Утратил силу в РФ 01.01.2006.

59 ГОСТ 12038-84. Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести / Введ. 1986-07-01 – М.: Стандартинформ, 2011. – 29 с.

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

61 ГОСТ 18461-93. Целлюлоза. Метод определения содержания

золы. Издание официальное. – М., 1993. – 8 с.

62 ГОСТ 25438-82. Целлюлоза для химической переработки. Методы определения характеристической вязкости. Издание официальное. – М., 1982. – 20 с.

63 ГОСТ 32039-2013. Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности. – Введ. 2014-01-07. – М.: Стандартинформ, 2014. – 12 с.

64 ГОСТ 32573-2013. Чай черный. Технические условия. – Взамен 1938-90; введ. 01.07.2015. – М.: Изд-во стандартов, 2014. – 8 с.

65 ГОСТ 3639-79. Растворы водно-спиртовые. Методы определения концентрации этилового спирта. – Введ. 1982-01-01. – М.: ИПК Издательство стандартов, 1994. – 12 с.

66 Гофман И.В., Буянов А.Л., Хрипунов А.К., Ревельская Л.Г., Ткаченко А.А., Парамонов Б.А. Полимерные композиции на основе целлюлозы *Acetobacter xylinum* и синтетических полимеров: функциональные свойства и перспективы применения в медицине // Материалы. Технологии. Инструменты. – 2006. – Т.11, № 1. – С. 35-41.

67 Градова Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 131 с.

68 Градова Н. Б., Бабусенко Е. С., Панфилов В. И. Биологическая безопасность биотехнологических производств. – Москва: ДеЛи, 2010. – С. 132.

69 Градова Н. Б., Бабусенко Е. С., Панфилов В. И., Шакир И. В. Микробиологический контроль биотехнологических производств. – Москва: ДеЛи плюс, 2016. – С. 142.

70 Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – М.: Элевар, 2000. — 512 с.

71 Григорьева О.Н., Харина М.В. Кислотный гидролиз лигноцеллюлозосодержащего сырья в технологии получения биоэтанола // Вестник технологического университета. – 2016. – Т. 19, № 10. – С. 128–132.

72 Громовых Т.И., Луценко С.В., Данильчук Т.Н., Фан Ми Хань Перспективы направленного использования бактериальной целлюлозы в медицине // Интер-Медикап. – 2015. – № 7(13). – С. 4-9.

73 Громовых Т.И., Садыкова С.С., Луценко С.В., Дмитренко А.С., Фельдман Н.Б., Данильчук Т.Н., Каширин В.В. Бактериальная целлюлоза, синтезируемая *Gluconacetobacter hansenii*, для использования в медицине // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53, № 1. – С. 69-75.

74 Громовых П.С., Бахман М., Петрухин И.Ю., Бутенко И.Е., Дутка К.В. Биосинтез бактериальной целлюлозы продуцентом *Gluconacetobacter hansenii* в глубоинной культуре // Евразийское Научное Объединение. – 2018. – № 6-2 (40). – С. 61-65.

75 Дебабов В.Г., Богуш В.Г. Природные волокна для будущего // Природа. – 1999. – № 2. – С. 5-15.

76 Денисенко Ю.А., Мерзлов Д.А., Гусаков А.В. и др. Сравнительная характеристика ксиланаз XylA и XylE из гриба *Penicillium canescens* // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2015. – № 6. – С. 348–353.

77 Дышекова М.М., Гернет М.В., Грибкова И.Н., Борисенко О.А. Получение биомассы дрожжей для пивоваренных заводов малой мощности // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. – 2020. – Т. 9, № 1 (49). – С. 127-130.

78 Егоров Н.С. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. Учебное пособие. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 307 с., ил.

79 Егоров Н.С. Промышленная микробиология / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высшая школа, 1989. – 503 с.

80 Егорова Е.Ю. Эффективность препаратов на основе гуминовых кислот торфа под сельскохозяйственные культуры в условиях луговой степи Алтайского края: дисс. канд. сельхоз. наук. Барнаул. – 2000. – 18 с.

81 Елинов Н.П. Основы биотехнологии / Для студентов институтов, аспирантов и практических работников. – СПб.: Наука, 1995. – 600 с., ил.

82 Ефременко Е.Н., Степанов Н.А., Гудков Д.А., Сенько О.В., Лозинский В.И., Варфоломеев С.Д. Имобилизованные грибные биокатализаторы для получения комплекса целлюлаз, гидролизующего возобновляемое растительное сырье // Катализ в промышленности. – 2013. – № 1. – С. 68-77.

83 Жумабекова Б.К., Жумабекова К.А. Получение высокоактивной ассоциации «Чайного гриба» из природных штаммов // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-11. – С. 2374-2376.

84 Заявка № 96117064, Российская федерация, МПК С12N 1/20, С12P 19/04, С12P 1/06. Питательная среда для получения бактериальной целлюлозы (БЦ) / А.К. Хрипунов, А.А. Ткаченко / заявитель и патентообладатель Санкт-Петербургский государственный университет; заявл. 22.08.1996; опубл. 20.11.1998.

85 Зедгенидзе И.Г. Планирование эксперимента для исследования многокомпонентных систем. – М.: Наука, 1976. – 390 с.

86 Земнухова Л.А., Будаева В.В., Федорищева Г.А. и др. Неорганические компоненты соломы и шелухи овса // Химия растительного сырья. – 2009. – № 1. – С. 147–152.

87 Земнухова Л.А., Панасенко А.Е., Цой Е.А. и др. Состав и строение образцов аморфного кремнезёма из шелухи и соломы риса // Неорганические материалы. – 2014. – Т. 50, № 1. – С. 82–89.

88 Жбанков, Р.Г. Инфракрасные спектры и структура углеводов / Р.Г. Жбанков. – Минск: Наука и техника, 1972. – 456 с.

89 Ефременко Е.Н., Степанов Н.А., Махлис Т.А., Варфаломеев С.Д. Бактериальная целлюлоза: биокаталитический синтез и применение / Химия биомассы: биотоплива и биопластики / Под ред. Варфаломеева С.Д. – М.: Научный мир, 2017. – 790 с. (С.763-789).

- 90 Ильин А.И. Планирование на предприятии: учебник. – 5-е изд. – Минск: Новое знание, – 2004. – 635 с.
- 91 Казарцев И.А., Рощин В.И., Соловьев В.А. Разложение углеводов древесины *Populus tremula* и *Picea abies* под действием лигнинразрушающих грибов // Микология и фитопатология. – 2014. – Т. – 48. – № 2. – С. 112-117.
- 92 Капустянчик С. Ю., Бурмакина Н. В., Якименко В. Н. Оценка эколого-агрохимического состояния агроценоза с многолетним выращиванием мискантуса в Западной Сибири // Агрохимия. – 2020. – № 9. – С. 65–73. DOI: 10.31857/S0002188120090082.
- 93 Капустянчик С.Ю., Якименко В.Н., Гисматулина Ю.А., Будаева В.В. Мискантус – перспективная энергетическая культура для промышленной переработки // Экология и промышленность России. – 2021 а. – Т. 25, № 3. – С. 66-71.
- 94 Капустянчик С.Ю., Будаева В.В., Гисматулина Ю.А. Биологические особенности культуры *Miscanthus sacchariflorus* (*poaceae*) в условиях новосибирской области // Растительные ресурсы. – 2021 б. – Т. 57, № 1. – С. 49-57.
- 95 Капуцкий Ф.Н., Юркштович Т.Л., Бычковский П.М., Беляев С.А., Адамчик Д.А., Соломевич С.О. Изучение иммобилизации цисплатина карбоксилсодержащими целлюлозами // Вестник БГУ. Серия № 2. Химия. Биология. География. – 2010. – № 1. – С. 3 – 6.
- 96 Кезина Е.В., Парчайкина О.В., Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Котина Е.А. Получение карбоксиметильных производных бактериальной целлюлозы с высокой степенью замещения // Актуальная биотехнология. – 2014. – № 3. – С. 37.
- 97 Киселева О.И., Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Гаврюшина И.А., Садыкова В.С., Пигалева М.А., Рубина М.С., Громовых Т.И. Структура популяции *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в статической культуре на различных источниках углерода // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2021. – № 53. – С. 22-46.
- 98 Кировский биохимический завод [Электронный ресурс]. – URL: <https://biohimzavod.kmarket43.ru/> (дата обращения: 02.04.2022).
- 99 Кленова Н.А., Белоусова З.П., Сосова Э.Ю., Соболева В.С., Тряпочкина А.С. Анализ использования гель-пленок и «вторичных» пленок бактериальной целлюлозы как носителей антибактериальных и антифунгальных препаратов // Успехи медицинской микологии. – 2018. – Т. 18. – С. 253-255.
- 100 Кленова Н.А., Овчинникова Т.А., Маркова Ю.А., Соболева В.С., Сосова Э.Ю., Ерофеева А.Е. Получение, свойства, использование и скорость деградации пленок и гелей бактериальной целлюлозы, продуцируемой *Gluconacetobacter sucrofermentans* // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2018. – Т. 14, № 1. – С. 27-31.

- 101 Клесов А.А. Ферментативный катализ. – М.: Изд-во МГУ, 1984. – Ч.2. – 216 с.
- 102 Кобелев К.В., Гернет М.В., Грибкова И.Н. Разработка инновационного способа получения биологически активных соединений пивной дробины // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т. 51, № 1. – С. 113-124. <http://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-113-124>
- 103 Козин В. Г., Солодова Н. Л., Башкирцева Н. Ю., Абдуллин А. И. Современные технологии производства компонентов моторных топлив. Учебное пособие. – Казань: КГТУ, 2009. – 327 с.
- 104 Колобова С.А., Назмутдинов Д.З., Петухова Н.И., Халимова Л.Х. Бактериальная целлюлоза - перспективный носитель для иммобилизации микроорганизмов - деструкторов фенола // Башкирский химический журнал. 2019. – Т. 26, № 1. – С. 105-111.
- 105 Компания ООО Био-инжиниринговый центр «Мискантус» Режим доступа: <https://miscanthus.eco/> (дата обращения 28.03.22).
- 106 Корчагина А.А., Будаева В.В., Гисматулина Ю.А., Золотухин В.Н., Люханова И.В., Алешина Л.А., Будаев И.А., Вдовина Н.П., Бычин Н.В., Сакович Г.В. Новые нитраты целлюлозы: синтез и характеристика // Бутлеровские сообщения. 2021. – Т. 67. – № 9. – С. 81-86.
- 107 Корчагина А.А., Будаева В.В., Алешина Л.А., Люханова И.В., Бычин Н.В., Сакович Г.В. Модификация растительной целлюлозы и ее синтетического аналога в низкозамещенные продукты этерификации // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. – 2022. – Т. 65. – № 6. – С. 64-74.
- 108 Корольков И.И. Перколяционный гидролиз растительного сырья. – М.: Лесная промышленность, 1978. – 263 с.
- 109 Крикунова Л.Н., Ильяшенко Н.Г., Кречетникова А.Н. Методические указания к выполнению лабораторных работ по технологии хлебопекарных дрожжей (для студентов специальности 2705.00 и 2705.03). – М.: МГУПП, 1998. – 37 с.
- 110 Крылов В.Н. Справочник бумажника-технолога. Сырьё. Общие сведения. – СПб, 1993. – 71 с.
- 111 Крылов И.А., Кухаренко А.А., Панфилов В.И. Основы проектирования биотехнологических производств. – РХТУ им. Д.И. Менделеева Москва, 2003. – С. 168.
- 112 Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. – М. Мир, 2006. – 504 с.
- 113 Кузнецов А.Е., Градова Н.Б., Лушников С.В. и др. Прикладная экобиотехнология. – Учебное пособие: в 2-х т. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – Т. 1 – 629 с., Т 2 – 485 с. – Переиздание 2012, 2015 гг.
- 114 Кузнецов А.Е. Высокоэффективные экологически чистые совмещенные системы микробиологического синтеза и очистки сточных вод с оксидативным стрессовым воздействием: дис...докт. техн. наук. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2020. – 708 с.

- 115 Кутышенко В.П., Юркевич Д.И. // Биофизика. 2002. – Т.48. – № 4. – С. 690 – 700.
- 116 Кухаренко А.А., А.Ю. Винаров, Т.Е. Сидоренко, А.И. Бояринов. Интенсификация микробиологического процесса получения этанола из крахмал- и целлюлозосодержащего сырья // Бюллетень «Новые технологии». – М.: Ключ Оракул, 1999. – 93 с.
- 117 Лихтенберг Л.А., Двдцатова Е.А., Чередниченко В.С. Атлас производственных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* расы XII (для работников спиртовых заводов, перерабатывающих зерно). – М.: Пищевая промышленность, 1999. – 24 с.
- 118 Ленин В.И. Полн. собр. соч. Т. 51, С.74. – М: Издательство политической литературы, 1970. – С.74 (573 с.).
- 119 Лесной фонд России: Справочник. Москва: ВНИИЦ-лесресурс, 1995. – 280 с.
- 120 Лобанок А.Г., Бабицкая В.Г., Богдановская Ж.Н. Переработка целлюлозосодержащих отходов в ценные продукты с помощью микроорганизмов. – М.: ОНТИТЭИмикробиопром, 1981. – 43 с.
- 121 Лобанок А.Г., Бабицкая В.Г., Богдановская Ж.Н. Микробный синтез на основе целлюлозы. Белок и другие ценные продукты. – Минск: Наука и техника, 1988. – 216 с.
- 122 Луковенков А.В., Быков В.И., Варфоломеев С.Д. Идентификация механизмов линейных необратимых последовательных реакций // Кинетика и катализ. 2021. Т. 62. № 5. С. 509-517. <https://doi.org/10.31857/S0453881121050038>
- 123 Макарова Е.И. Биоконверсия непищевого целлюлозосодержащего сырья: энергетических растений и отходов АПК: дис... канд. технич. наук: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии). – Щелково, 2015. – 161 с.
- 124 Мартьянов С.В., Журина М.В., Эль-Регистан Г.И., Плакунов В.К. Активирующее действие азитромицина на формирование бактериальных биопленок и борьба с этим явлением // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 1. С. 27. <https://doi.org/10.7868/S0026365614060123>
- 125 Медриш М.Э., Поляков В.А., Абрамова И.М., Савельева В.Б., Матросова Н.В. Применение метода газовой хроматографии в контроле качества спиртных напитков на основе зерновых дистиллятов // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87, № S5. – С. 189. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10296>
- 126 Медриш М.Э., Абрамова И.М., Савельева В.Б., Павленко С.В., Приемухова Н.В. Методика определения летучих примесей в спиртных напитках, полученных на основе выдержанных зерновых дистиллятов // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87, № S5. – С. 188-189. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10295>
- 127 Меледина Т.В., Давыденко С.Г. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм: учебное пособие. –

СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 88 с.

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

129 Минаева О.М., Акимова Е.Е., Минаев К.М., Семенов С.Ю., Писарчук А.Д. Поглощение ряда тяжелых металлов из водных растворов растениями водного гиацинта (*Eichhorniacrassipes (mart.) solms*) // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2009. – № 4 (8). – С. 106-111.

130 Миронова Г.Ф., Повышение эффективности процесса получения биоэтанола из шелухи овса: дис... канд. техн. наук: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии). – Москва, 2018. – 118 с.

131 Непенин Н.Н. Производство целлюлозы: утв. ВКВШ при СНК СССР в качестве учебника для лесотех. вузов / проф. Н. Н. Непенин. - Москва: Гослестехиздат, 1940 (Калуга). – 992 с. : ил.

132 Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. – М.: Академия, 2006. – 353 с.

133 Нетрусов А. И. Введение в биотехнологию: учебник для вузов. – Москва: Академия, 2014. –288 с.

134 Никитин Н.И. Химия древесины и целлюлозы. – Москва; Ленинград : Изд-во Акад. наук СССР. [Ленингр. отд-ние], 1962. - 714 с. : ил.

135 Никитин В.М., Оболенская А.В., Щеглов В.П. Химия древесины и целлюлозы. – М.: Лесная промышленность, 1978. – 368 с.

136 Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Атрощик Е.А., Константинов А.И., Перминова И.В., Эль-Регистан Г.И. Функциональная активность гуминовых веществ в пролонгировании выживания популяции углеводородокисляющей бактерии *Acinetobacter junii* // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 1. – С. 74-87. <https://doi.org/10.31857/S0026365620010103>

137 Новаковская С.С. Справочник технолога дрожжевого производства. – М.: Пищевая промышленность, 1972. – 289 с., ил.

138 Новиков И.В. Применение комбинированных способов местного лечения у пациентов с различными вариантами локальных ожоговых ран: дис... канд. мед. наук: 14.01.17 – Хирургия – Самара, 2019. – 115 с.

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

140 Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учебное пособие для вузов. – М.: Экология, 1991. – 320 с.

141 Павлова А.А., Верещагин А.Л., Чашилов Д.В. Влияние препаратов из частей растений вьюнка полевого (*Convolvulus arvensis L.*) и сроков сбора на морфометрические показатели прорастающих семян гороха (*Pisum sativum L.*) // Вестник Алтайской науки. – 2014. – N. 4. – С. 162-165.

142 Пат. 2141530 Россия, МПК C12P19/02, C12N1/20. Состав

питательной среды культивирования *Acetobacter xylinum* для получения бактериальной целлюлозы / А.К. Хрипунов, А.А. Ткаченко. – № 98108987/13; заявлено 05.05.1998; опубл. 20.11.1999.

143 Пат. 2189394 Россия, МПК С12Р19/04, С12N1/20, С12N1/20, С12R1/02. Состав питательной среды культивирования *Acetobacter xylinum* для получения бактериальной целлюлозы (варианты) / А.К. Хрипунов, А.А. Ткаченко. – № 98100669/13; заявлено 12.01.1998; опубл. 20.08.2000, Бюл. № 26. – 16 с.

144 Пат. 2472891 Россия, МПК D21H17/25, D21H25/18. Способ восстановления недостающих частей листов бумаги / Е.Г. Смирнова, Е.М. Лоцманова, А.К. Хрипунов, А.А. Ткаченко. – № 2011123979/05; заявл. 15.06.2011; опубл. 20.12.2012, Бюл. № 35. – 1 стр.

145 Пат. 2415221 Россия, D21H27/12, D21H17/25, С12S3/08. Способ получения электроизоляционной бумаги / Н.М. Журавлева, Б.И. Сажин, Е.Г. Смирнова, А.К. Хрипунов, А.А. Ткаченко. – № 2010117529/12; заявл. 30.04.2010; опубл. 27.03.2011, Бюл. № 9. – 5 стр.

146 Пат. 2545729 Россия, А61К9/00, А61L15/18, А61L15/28, А61L15/40. Сетчатое биоактивное раневое покрытие / К.Н. Касанов, Р.А. Евсеев, Ю.А. Игнатьева, А.К. Хрипунов, В.А. Попов, А.И. Везенцев, М.В. Успенская. – № 2013145823/15; заявл. 15.10.2013; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 29. – 8 стр.

147 Пат. 94151 Россия, А61F13/02. Биологически активное покрытие для лечения ран / Н.В. Калмыкова, Е.В. Канов, П.В. Кругляков, Д.Г. Польшцев, Е.В. Скоробогатая. – № 2009147084/22; заявл. 18.12.2009; опубл. 20.05.2010, Бюл. № 14. – 2 стр.

148 Пат. 2437681 Россия, А61L15/18, А61L15/44, А61L15/28. Раневое покрытие с лечебным действием / В.А. Попов, Н.Г. Венгерович, А.К. Хрипунов, Л.А. Ткаченко, Е.Р. Гасилова, Г.П. Александрова, К.Н. Касанов, Е.В. Антоненкова. – № 2010133389/15; заявл. 09.08.2010; опубл. 27.12.2011, Бюл. № 36. – 10 стр.

149 Пат. 18882 Евразийский Союз, МПК С07Н3/02, С07Н1/08, С07П1/00, С07П3/00. 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.

150 Пат. № 2288262 Российская Федерация, МПК С12N1/16, С12N13/00. 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.

151 Пат. РФ № 2331666. Применение штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-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. – 4 с.

152 Пат. 2331667 Российская Федерация, МПК C12N1/16, C12P7/06, C12R1/865. Применение штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-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. – 4 с.

153 Пат. № 2536257, Российская федерация, МПК C12 N1/20, C12 R1/01. Способ получения бактериальной целлюлозы / В.В. Ревин, Е.В. Лияськина, М.И. Назаркина, Н.В. Киреев; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». № 2013127538/10; заявл. 17.06.2013; опубл. 20.12.2014, Бюл. № 35.

154 Пат. № 2536973, Российская федерация, МПК C12 N1/20, C12 R19/04, C12 R1/01. Способ получения бактериальной целлюлозы / В.В. Ревин, Е.В. Лияськина, М.И. Назаркина; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». № 2013154403/10; заявл. 06.12.2013; опубл. 27.12.2014, Бюл. № 36.

155 Пат. № 2564567, Российская федерация, МПК B27N 1/02, C12N 1/20, A61L 15/18, 15/28. Способ получения биокомпозита / В.В. Ревин, Е.В. Лияськина; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». № 2014147770/10; заявл. 26.11.2014; опубл. 10.10.2015, Бюл. № 28.

156 Пат. № 2720099, Российская федерация, МПК C12P 19/04, C08B 16/00, A61K 35/74. Способ получения диальдегидпроизводной гель-пленки бактериальной целлюлозы / Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Герасимова Л.А., Леднева Е.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». № 2019135544; заявл. 05.11.2019; опубл. 24.04.2020, Бюл. № 12.

157 Пат. № 2736061, Российская федерация, МПК A61K 35/74, A61K 47/36, A61L 15/28, A61L 15/18, C12N 1/20, A61P 7/04. Способ получения биокомпозита на основе аэрогеля бактериальной целлюлозы, обладающего кровоостанавливающими свойствами / Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назарова Н.Б., Саликов А.В., Федоров И.Г.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный

университет им. Н.П. Огарева». № 2019135973; заявл. 08.11.2019; опубл. 11.11.2020, Бюл. № 32.

158 Пат. № 2733137, Российская федерация, C12N 1/20, A61L 15/36. Способ получения биокомпозита с регенерационными свойствами на основе гидрогеля бактериальной целлюлозы / Ревин В.В., Лияськина Е.В., Богатырева А.О.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». № 2019135970; заявл. 08.11.2019; опубл. 29.09.2020, Бюл. № 28.

159 Пат. № 2681281, Российская федерация, C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/01. Штамм бактерии *Komagataeibacter hansenii* – продуцент бактериальной целлюлозы / Ревин В.В., Сапунова Н.Б., Лияськина Е.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» № 2018126807; заявл. 20.07.2018; опубл. 05.03.2019, Бюл. № 7.

160 Пат. № 2659175, Российская федерация, A61K 31/728, C08B 1/02, C12P 19/04. Композиция на основе бактериальной целлюлозы и гиалуроновой кислоты / Трофимов В.А., Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Пузанов С.Ю., Петрова Е.С.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». № 2017112620; заявл. 12.04.201; опубл. 28.06.2018, Бюл. № 19.

161 Пат. № 2523606, Российская федерация, C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/01. Штамм *Gluconacetobacter sucrofermentans* – продуцент бактериальной целлюлозы / Ревин В.В., Лияськина Е.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». № 2013111072/10; заявл. 12.03.2013; опубл. 20.07.2014, Бюл. № 20.

162 Пат. № 2743012, Российская федерация, B01J 20/24, B01J 20/30, C02F 1/28, C02F 1/62, C08B 15/00. Способ получения микропористого сорбента на основе бактериальной целлюлозы / Пестов Н.А., Ревин В.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». № 2020127968; заявл. 21.08.2020; опубл. 12.02.2021. Бюл. № 5.

163 Пат. № 270062 Российская федерация, C12N 1/20, C12P 1/04, C12R 1/01. Способ получения аэрогеля на основе бактериальной целлюлозы для звукоизоляционного материала / Ревин В.В., Щанкин М.В., Пестов Н.А.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное

образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». № 2018144378; заявл. 14.12.2018; опубл. 18.09.2019, Бюл. № 26.

164 Пат. № 2695066 Российская федерация, А61L 15/28, А61К 31/05, А61К 31/717, А61К 35/741, А61Р 41/00. Способ лечения травматических разрывов печени с использованием пленочного покрытия на основе бактериальной целлюлозы / В.В. Ревин, А.Н. Беляев, Н.В. Ревина, С.В. Костин; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». № 2019101477; заявл. 18.01.2019; опубл. 19.07.2019, Бюл. № 20.

165 Пат. № 2568605, Российская федерация, МПК С12N 1/22, С12P 19/04. Штамм *Komagataeibacter xulinus* – продуцент бактериальной целлюлозы / Т.Г. Волова, С.В. Прудникова, Е.И. Шишацкая; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет». № 2014150288/10; заявл. 11.12.2014; опубл. 20.11.2015, Бюл. № 32.

166 Пат. № 2464307, Российская федерация, МПК С12N 1/20, С12P 19/04, С12R 1/01. Штамм бактерий *Cluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 – продуцент бактериальной целлюлозы / Т.И. Громовых, Фан Ми Хань, Т.Н. Данильчук; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств». № 2011121841/10; заявл. 31.05.2011; опубл. 20.10.2012, Бюл. № 29.

167 Пат. № 2189394, Российская федерация, МПК С12P 19/04, С12N 1/20, С12 R 1/02. Состав питательной среды культивирования *Acetobacter xulinum* для получения бактериальной целлюлозы (варианты) / А.К. Хрипунов, А.А. Ткаченко; заявитель и патентообладатель Санкт-Петербургский государственный университет. № [98100669/13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-11482-1_13); заявл. 12.01.1998; опубл. 20.09.2002, Бюл. № 26.

168 Пашкеева О.Э., Гродницкая И.Д., Антонов Г.И., Ломовский О.И., Гайдашева И.И. Влияние обработки семян сосны обыкновенной микробными и фитопрепаратами на сохранность сеянцев и свойства почвы в лесном питомнике // Лесоведение. – 2021. – № 2. – С. 143-155. <https://doi.org/10.31857/C0024114821020066>

169 Пиневиц А.В. Чудо-пленки, или слово о бактериальной целлюлозе // Санкт-Петербургский университет. – 2007. – № 3. – С. 33-39.

170 Пермякова Л.В. Классификация стимуляторов жизненной активности дрожжей // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 42, № 3. – С. 46–55.

171 Петрухин И.Ю., Демченко А.Г., Каширин В.В. Оценка цитотоксичности бактериальной целлюлозы, синтезируемой штаммом

Glucanacetobacter hansenii // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16/, № 4. – С. 227-228.

172 Петухова, Н.И. Синтез целлюлозы изолятами уксуснокислых бактерий из «Чайного гриба» / Н.И. Петухова, С.А. Колобова, Р.Р. Назмутдинова, В.В. Зорин // Башкирский химический журнал. – 2016. – Т. 23, № 1. – С. 7-13.

173 Плюта В.А., Андреев Ю.В., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Образование биопленок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 в присутствии перекиси водорода; влияние гена АПА // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2013. – № 4. – С. 10-14.
<https://10.3103/S089141681304006X>

174 Погорелова Н.А., Чернигова С.В., Рогачев Е.А. Морфологические особенности строения бактериальной целлюлозы и нанокompозитов на ее основе для изготовления современных раневых покрытий // Вестник Омского государственного аграрного университета. – 2019. – № 4 (36). – С. 131-141.

175 Подгорбунских Е.М., Бычков А.Л., Булина Н.В., Ломовский О.И. Разупорядочение кристаллической структуры целлюлозы при механической активации // Журнал структурной химии. – 2018. – Т. 59, № 1. – С. 204-211.
<https://doi.org/110.26902/JSC20180132>

176 Попов А.И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование / Под ред. Е.И. Ермакова. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2004. – 248 с.

177 Прусакова Л.Д., Кефели В.И., Белопухов С.Л., Вакуленко В.В., Кузнецова С.А. Роль фенольных соединений в растениях // Агрoхимия. – 2008. – № 7. – С. 86-96.

178 Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назаркина М.И., Богатырева А.О., Щанкин М.В. Получение бактериальной целлюлозы на отходах пищевой промышленности // Актуальная биотехнология. – 2014. – № 3. – С.112.

179 Ревин В.В., Лияськина Е.В., Сапунова Н.Б., Богатырева А.О. Выделение и характеристика штаммов – продуцентов бактериальной целлюлозы // Микробиология. – 2020. – Т. 89, № 1. – С. 88-98.

180 Ревина Н.В., Лияськина Е.В., Костин С.В. Раневые покрытия на основе бактериальной целлюлозы для регенерационных процессов // Гены и Клетки. – 2017. – Т. 12, № 3. – С. 147-148.

181 Римарева Л.В., Воронцова Н.Н. Микробиологический контроль спиртового и ферментного производств. – М.: Россельхозакадемия, 2005. – 200 с.

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

183 Риц В.А., Ильин А.И. Методы обработки и утилизации осадков сточных вод предприятий гидролизной промышленности. – М.: ОНТИТЭИмикробиопром, 1983. – 36 с.

184 Роговин З.А. Химия и технология производства вискозного волокна: утв. ВКВШ при СНК СССР в качестве учебника для хим.-технол. вузов / проф. З. А. Роговин. – Москва: Госхимиздат, 1940. – 588 с.: ил., граф., схем.

185 Розанов А.С., Котенко А.В., Акбердин И.Р. и др. Рекомбинантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* для получения этанола из растительной биомассы // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. – № 4/2. – С. 989–998.

186 Рубина М.С., Пигалёва М.А., Бутенко И.Е., Будников А.В., Наумкин А.В., Громовых Т.И., Луценко С.В., Васильков А.Ю. Эффект взаимодействия бактериальной целлюлозы с наночастицами золота, полученными методом металло-парового синтеза // Доклады Академии наук. – 2019. – Т. 488, № 4. – С. 391-396.

187 Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 453-479.

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

189 Сапунова Н.Б., Богатырева А.О., Щанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальной целлюлозы на среде с мелассой // Вестник казанского технологического университета. – 2016. – Т. 19, № 24. – С. 154-156.

190 Сапунова Н. Б., Богатырева А. О., Ревина Н. В., Лияськина Е. В., Ревин В. В. Биоматериалы на основе бактериальной целлюлозы для регенеративной медицины // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14, №. S. – С. 205-206.

191 Свергузова С.В., Шайхиев И.Г., Гречина А.С., Шайхиева К.И. Использование отходов от переработки биомассы овса в качестве сорбционных материалов для удаления поллютантов из водных сред (обзор литературы) // Экономика строительства и природопользования. – 2018. – № 2 (67). – С. 51-60.

192 Сербя Е.М., Оверченко М.Б., Римарева Л.В. Биотехнологические основы микробной конверсии концентрированного зернового сусла в этанол. – М.: Библио-Глобус, 2017. – 120 с. <https://doi.org/10.18334/9785950050169>

193 Сербя Е.М., Абрамова И.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Грунин Е.А. Влияние ферментных препаратов на технологические показатели зернового сусла и качество спирта // Пиво и напитки. – 2018. – № 1. – С. 50-54.

194 Сербя Е.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Шелехова Н.В., Погоржельская Н.С., Абрамова И.М. Биотехнологические аспекты получения функциональных ингредиентов на основе конверсии биомассы *Saccharomyces cerevisiae* 985-т // Биотехнология. – 2020. – Т. 36, № 4. – С. 34-41. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-34-41>

195 Сергиенко В.И., Земнухова Л.А., Егоров А.Г., Шкорина Е.Д., Василюк Н.С. Возобновляемые источники химического сырья: комплексная

переработка отходов риса и гречихи // Российский химический журнал. – 2004. – Т. 48, № 3. – С. 116-124.

196 Сеницын А.П. Физико-химические основы ферментативной конверсии полисахаридов: дис...докт. хим. наук. – М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1987.

197 Сеницын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. – М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1995. – 224 с.

198 Сеницын, А.П., Рожкова А.М., Сеницына О.А., Холмова М.А., Терентьев К.Ю., Казаков Я.В., Чухчин Д.Г., Новожилов Е.В. Получение биокатализатора на основе рекомбинантных целлюлолитических ферментных препаратов *Penicillium verruculosum* и его применение в бумажной промышленности // Катализ в промышленности. – 2015. – Т. 15, №. 6. – Р. 84-89.

199 Скворцова З.Н., Громовых Т.И., Грачев В.С., Траскин В.Ю. Физико-химическая механика бактериальной целлюлозы // Коллоидный журнал. – 2019. – Т. 81, № 4. – С. 441-452.

200 Скворцова З.Н., Траскин В.Ю., Грачев В.С., Громовых Т.И. Влияние растворов электролитов на механические свойства бактериальной целлюлозы // Коллоидный журнал. – 2020. – Т. 82, № 4. – С. 517-520.

201 Славянский А.К., Шарков В.И., Ливеровский А. А., Буевской А. В., Медников Ф. А., Лямин В. А., Солодкий Ф. Т., Цацка Э. М., Дмитриева О. А., Никандров Б. Ф. Химическая технология древесины. – М.: ГОСЛЕСБУМИЗДАТ, 1962. – 576 с.

202 Смирнова Е.Г. Повышение устойчивости бумаги к старению формированием ее композиционного состава: автореф. дис... док. техн. наук: 05.21.03. – Санкт-Петербург, 2014. – 311 с.

203 Смирнова Е.Г., Лоцманова Е.М. Применение бактериальной целлюлозы в композиции бумажной массы для механизированной реставрации старинных документов // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета технологии и дизайна. Серия 1: Естественные и технические науки. – 2019. – № 2. – С. 83-87.

204 Смирнова Е.Г., Лоцманова Е.М., Журавлева Н.М., Резник А.С., Вураско А.В., Дриккер Б.Н. и др. Материалы из нетрадиционных видов волокон: технологии получения, свойства, перспективы применения: монография / Под ред. А.В. Вураско. – Екатеринбург: Изд-во УГЛТУ, 2020. – 252 с.

205 Стабников В.Н. Перегонка и ректификация этилового спирта. М.: Пищевая промышленность. – 1969, 456 с.

206 Суханова И.М., Алиев Ш.А., Газизов Р.Р., Ильясов М.М., Рахманова Г.Ф., Сидоров В.В. Влияние обработки семян органоминеральными суспензиями и их наноаналогами на морфометрические параметры проростков // Эффективное растениеводство. – 2017. – № 8. – С. 70-72.

207 Сушкова В.И., Устюжанинова Л.В., Березина О.В., Яроцкий С.В. Методы подготовки растительного сырья к биоконверсии в кормовые продукты и биоэтанол // Химия растительного сырья. – 2016. – № 1. – С. 93–119.

208 Ткачева Н.И. и др. Модификация целлюлозы – перспективное направление в создании новых материалов // Высокомолекулярные соединения, серия Б. – 2013. – Т. 55, № 8. – Р. 1086-1107.

209 Туршатов М.В., Леденев В.П., Кононенко В.В. и др. Технологические аспекты получения биоэтанола и кормов из крахмального молока и отрубей, образующихся при глубокой переработке зерновых культур // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. – 2016. – С. 413–419.

210 Ультрафло Коре [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.rusferment.com/preparaty-dlya-proizvodstva/gemitsellyulaza/ultraflo-kore.html> (дата обращения: 29.04.2020).

211 Фан Ми Хань, Громовых Т.И. Получение бактериальной целлюлозы микробиологическим синтезом // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2012. – № 5. – С. 67-58.

212 Фан Ми Хань. Биотехнология бактериальной целлюлозы с использованием штамма-продуцента *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.01.06. – Москва, 2013. – 162 с.

213 Хайруллин А.Р., Северин А.В., Хрипунов А.К., Ткаченко А.А., Паутов В.Д. Композиты на основе бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter xylinus* и фосфатов кальция и их диэлектрические свойства // Журнал прикладной химии. – 2013 а. – Т. 86, № 8. – С. 1324-1330.

214 Хайруллин А.Р., Паутов В.Д., Темникова Н.Е. Влияние воды на релаксационные характеристики первичного гидроксила в целлюлозе *Glucoacetobacter xylinus* (часть 2) // Вестник Казанского технологического университета. – 2013 б. – Т. 16, № 2. – С. 89-91.

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

216 Химия биомассы: биотоплива и биопластики / Под ред. С.Д. Варфоломеева. – М.: Научный мир, 2017. – 790 с.

217 Холодова С.Н., Рудиков Д.А. О возможности применения водного гиацинта для очистки загрязненных вод // Вода и экология: проблемы и решения. – 2019. – № 3 (79). – С. 70-76. <https://doi.org/10.23968/2305-3488.2019.24.3.70-76>

218 Холькин Ю.И. Современная технология ксилита. М.: ОНТИТЭИмикробиопром, 1983. – 56 с.

219 Холькин Ю.И., Макаров В.Л., Елкин В.А. Бессточная технология в гидролизно-дрожжевом производстве. – М.: ОНТИТЭИмикробиопром, 1983. – 200 с.

- 220 Холькин Ю.И., Елкин В.А., Иванов А.С. и др. Растительные углеводно-белковые корма // Гидролизная и лесотехническая промышленность, 1987. – № 4. – С. 4-6.
- 221 Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств: учебник для вузов. – М.: Лесная промышленность, 1989. – 496 с.
- 222 Христева Л.А. Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. – Днепропетровск, 1980, т. 2, с.5-23.
- 223 Христева Л.А. Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. – Днепропетровск, 1980, т. 4, с.33-41.
- 224 ЦеллоЛюкс–А [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.sibbio.ru/catalog/spirtoproizvodstvo/tsellolyuks-a> (дата обращения: 29.04.2020).
- 225 Целлюлоза – не только лес [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.proektnoegosudarstvo.ru/psession/1438/> (дата обращения: 10.10.2020)
- 226 Чернигова С.В., Чернигов Ю.В., Погорелова Н.А., Горбатенко А.В. Наноматериал из бактериальной целлюлозы - современное средство для изготовления имплантатов трахеи // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2019. – № 10 (180). – С. 110-117.
- 227 Чукин Г.Д. Химия поверхности и строение дисперсного кремнезема / М.: ООО «Принта», 2008. – 172 с.
- 228 Шакир И.В., Красноштанова А.А., Бабусенко Е.С., Парфенова Е.В., Суясов Н.А., Смирнова В.Д. Общая биотехнология. Лабораторный практикум: учебное пособие РХТУ. – 2007. – 120 с.
- 229 Шарков В.И., Сапотницкий С.А., Дмитриева О.А., Туманов И.Ф. Технология гидролизных производств. – М.: Лесная промышленность, 1973. – 408 с.
- 230 Шарков В.И., Куйбина Н.И., Соловьева Ю.П., Павлова Т.А. Количественный химический анализ растительного сырья. – М.: Лесная промышленность, 1976. – 72 с.
- 231 Шелехова Н.В., Абрамова И.М., Шелехова Т.М., Скворцова Л.И., Полтавская Н.В., Погоржельская Н.С. Расширение аналитических возможностей газовой хромато-масс-спектрометрии для исследования дистиллированных напитков // Пищевая промышленность. – 2022. – № 4. – С. 63-66. <https://doi.org/10.52653/PPI.2022.4.4.011>
- 232 Шуваева Г.П., Корнеева О.С., Божко О.Ю. Производство дрожжей с использованием экстрактов топинамбура *Helianthus tuberosus* // Биотехнология. 2012. № 3. С. 67-68.
- 233 Юркевич Д.И., Кутышенко В.П. Медузомицет (Чайный гриб): научная история, состав, особенности физиологии и метаболизма // Биофизика. 2002. – Т. 47. – № 6. – С. 1116 – 1129.
- 234 Якименко В.Н., Капустянчик С.Ю., Галицын Г.Ю. Возделывание мискантуса в континентальных регионах России // Земледелие. – 2021. – № 2. – С. 27-31.

- 235 Яровенко В.Л., Устинников Б.А., Богданов Ю.П., Громов С.И. Справочник по производству спирта. Сырьё, технология и технохимконтроль. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 336 с.
- 236 Яровенко В.Л., Маринченко В.А., Смирнов В.А. и др. Технология спирта / Под ред. В.Л. Яровенко. – М.: Колос, 2002. – 464 с.
- 237 Abdelraof M., Hasanin M.S., El-Saied H. Ecofriendly green conversion of potato peel wastes to high productivity bacterial cellulose // Carbohydr. Polym. – 2019. – Vol. 211. – P. 75-83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.095>
- 238 Abdullah B., Syed Muhammad S. A. F., Shokravi Z. Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2019. – Vol. 107. – P. 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.018>
- 239 Abedi A., Dalai A.K. Study on the quality of oat hull fuel pellets using bio-additives // Biomass and Bioenergy. – 2017. – Vol. 106. – P. 166–75. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.08.024>
- 240 Abedi A., Dalai A.K. Steam gasification of oat hull pellets over Ni-based catalysts: Syngas yield and tar reduction // Fuel. – 2019. – Vol. 254, 115585. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.05.168>
- 241 Abeer M. M., Mohd Amin, M. C., and Martin, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects // J. Pharm. Pharmacol. – 2014. – № 66. – P. 1047–1061. <https://doi.org/10.1111/jphp.12234>
- 242 Abeer M.M., Amin, M.C.I.M., & Martin, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. Royal Pharmaceutical Society // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2014. – № 66. – P. 1047–1061. <https://doi.org/10.1111/jphp.12234>
- 243 Abol-Fotouh D., Hassan, M.A., Shokry H., Roig A., Azab, M.S., & Kashyout, A.B. Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: low-cost and enhanced production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1 // Scientific Reports. – 2020. – № 10. – P. 3419. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60315-9>
- 244 Abraham R.E., Verma M.L., Barrow C.J., Puri M. Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass // Biotechnol Biofuels. – 2014. – № 7. – P. 1. <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/90>
- 245 Abubaker H. O., Sulieman A. M. E., Elamin H. B. Utilization of *Schizosaccharomyces pombe* for Production of ethanol from Cane Molasses // J. Microbiol. Res. – 2012. – T. 2. – P. 36-40. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20120202.06>
- 246 Adebayo-Tayo B.C., Akintunde M., Alao S. Comparative effect of agrowastes on bacterial cellulose production by *Acinetobacter sp. Ban1* and *Acetobacter pas teurianus pw1* // Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences. – 2017. – № 4. – P. 145–154. <https://doi.org/10.9734/JABB/2017/34171>

247 Agrawal R., Satlewal A., Gaur R., Mathur A., Kumar R., Gupta RP., Tuli DK Pilot scale pretreatment of wheat straw and comparative evaluation of commercial enzyme preparations for biomass saccharification and fermentation // *Biochem Eng J.* – 2015. – № 102. – P. 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.018>

248 Agrawal R., Bhadana B., Mathur A. S., et al. Improved Enzymatic Hydrolysis of Pilot Scale Pretreated Rice Straw at High Total Solids Loading // *Frontiers in Energy Research.* – 2018. – № 6. – P. 115. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00115>

249 Ahvenainen P., Kontro I., Svedstrom K. Comparison of sample crystallinity determination methods by X-ray diffraction for challenging cellulose I materials // *Cellulose.* – 2016. – Vol. 23, № 2. – P. 1073-1086. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0881-6>

250 Akim G.L., Burov A.V., Evstigneev E.I., Mironov T.Ya., Puzyrev S.S., Filatov B.N. *Tekhnologiya Tsellyulozno-Bumazhnogo Proizvodstva (Technology of Pulp and Paper Industry. Reference Book).* – 2006. – Vol. 1, Part 3: *Proizvodstvo Polufabrikatov (Production of Semi-Finished Products)*, Politekhnik Press, Saint-Petersburg. Book can be downloaded free of charge from direct link: <http://www.twirpx.com/file/641887>.

251 Albuquerque, P.B.S., de Oliveira W.F., dos Santos Silva P.M., dos Santos Correia, M.T., Kennedy, J.F., Barroso Coelho, L.C.B. Epiphanies of well-known and newly discovered macromolecular carbohydrates – A review // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.046>

252 Algar I., Fernandes S., Mondragon G., Castro C., Garcia-Astrain C., Gabilondo N., Eceiza A. Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies // *J Appl Polym Sci.* – 2015. – Vol. 131, № 1. – P. 41237. <https://doi.org/10.1002/app.41237>

253 Alferov S.V., Minaicheva P.R., Arlyapov V.A., Asulyan L.D., Alferov V.A., Ponamoreva O.N., Reshetilov A.N. Bioanode for a microbial fuel cell based on *Gluconobacter oxydans* immobilized into a polymer matrix // *Applied Biochemistry and Microbiology.* – 2014. – T. 50, № 6. – C. 637-643.

254 Almeida J.R., Modig T., Petersson A., et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* – 2007. – Vol. 82, № 4. – P. 340–349. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>

255 Aloni Y., Delmer D.P., Benziman M. Achievement of high rates of in vitro synthesis of 1, 4-beta-D-glucan: activation by cooperative interaction of the *Acetobacter xylinum* enzyme system with GTP, polyethylene glycol, and a protein factor // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1982. – Vol. 79, No. 21. – P. 6448-6452. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.21.6448>

256 Aloulou A., Hamden K., Elloumi D., Ali M.B., Hargafi K., Jaouadi B., Ayadi F., Elfeki A., Ammar E. Hypoglycemic and antilipidemic properties of

Kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats BMC Complement. Altern. Med. – 2012. – № 12. – P. 63-71. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/63>

257 Alves A.A., Silva W.E., Belian M.F., Lins L.S.G., Galembeck A. Bacterial cellulose membranes for environmental water remediation and industrial wastewater treatment // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2020. – Vol. 17. – Issue 7. – P. 3997–4008. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02746-5>

258 Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review // Bioresour Technol. – 2010. – № 101. – P. 4851-4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>

259 Amin M.C.I.M., Abadi A.G., Ahmad N., Katas H., Jamal J.A. Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery // Carbohydrate Polymers. – 2012 b. – Vol. 88, No. 2. – P. 465-473. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.022>

260 Amin M. Sulfahri, Sumitro S.B., Saptasari M. Bioethanol production from algae *Spirogyra hyalina* using *Zymomonas mobilis* // Biofuels. – 2016. – P. 1-6. <https://doi.org/10.1080/17597269.2016.1168028>

261 Anderson J. W., Baird P., Davis R. H., Ferreri Jr., Knudtson S., Koraym M. A., et al. Health benefits of dietary fiber. – 2009. – Nutr. Rev. 67. – P. 188–205. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>

262 Andrade F. K., Silva J. P., Carvalho M., Castanheira E. M. S., Soares R., Gama M. Studies on the hemocompatibility of bacterial cellulose // J. Biomed. Mater. Res. A 98. – 2011. – P. 554–566. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33148>

263 Andriani D., Apriyana A. Y. and Karina M. The optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review // Cellulose. – 2020. – № 27. – P. 6747–6766. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03273-9>

264 Anton-Sales I., Beekmann U., Laromaine A., Roig A. and Kralisch D. Opportunities of bacterial cellulose to treat epithelial tissues // Curr. Drug Targets. – 2019. – № 20. – P. 808–822. <https://doi.org/10.2174/1389450120666181129092144>

265 Aro E. From first generation biofuels to advanced solar biofuels // Ambio. – 2016. – Vol. 45. – P. 24–31. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0730-0>

266 Aruwajoye G. S., Sewsynker-Sukai Y., Kana E. B. G. Valorisation of cassava peels through simultaneous saccharification and ethanol production: Effect of prehydrolysis time, kinetic assessment and preliminary scale up // Fuel. – 2020. – Vol. 278. – № 118351. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118351>

267 ASTM D 1103-60 (1978) «Standard test method for α -cellulose» American Society for Testing and Materials, American National Standard, USA

268 Atykyan N., Revin V. & Shutova, Raman V. and FT-IR Spectroscopy investigation the cellulose structural differences from bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* during the different regimes of cultivation on a molasses media.

AMB Express . – 2020. – 10(1). – P. 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01020-8>

269 Autier L., Clavreul A., Cacicedo M. L., Franconi F., Sindji L., Rousseau A., ... & Menei P. A new glioblastoma cell trap for implantation after surgical resection. *Acta biomaterialia*. – 2019. – № 84. – P. 268-279. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.027>

270 Aswathy U., Sukumaran R.K., Devi G.L., Rajasree K., Singhanian R.R., Pandey A. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: an evaluation of enzymatic saccharification strategy // *Bioresour Technol*. – 2010. – № 101. – P. 925-930. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.019>

271 Axcelon Dermacare Inc (2020). Available online at: <https://www.axcelondc.com/> (accessed August 21, 2021).

Aydin YA, Aksoy ND (2009) Isolation of cellulose producing bacteria from wastes of vinegar fermentation. WCECS 2009: World congress on engineering and computer science, vols I and II. Int Assoc Engineers-Iaeng, Hong Kong.

272 Azeredo H., M. C., Barud H., Farinas C. S., Vasconcellos V. M. and Claro A. M. (2019). Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. *Front. Sustain. Food Syst.* 3:7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>

273 Azizi Samir, M. A., Alloin, F., Dufresne, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field // *Biomacromolecules*. – 2005. – Vol.6. – P. 612–626. <https://doi.org/10.1021/bm0493685>

274 Aydin Y. A., Aksoy N. D. Isolation and characterization of an efficient bacterial cellulose producer strain in agitated culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – 98. – P. 1065–1075. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5296-9>

275 Backdahl H., Helenius G., Bodin A., Nannmark U., Johansson B.R., Risberg B., Gatenholm P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27, No. 9. – P. 2141-2149. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.026>

276 Badger P. C. Ethanol from cellulose: a general review. *Trends in new crops and new uses*. – 2002. – 14. – P. 17-21.

277 Bae S., Shoda M. Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium // *Biotechnology Progress*. – 2004. – No. 20. – P. 1366-1371. <https://doi.org/10.1021/bp0498490>

278 Bae SO, Shoda M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2005. – Vol. 67(1). – P. 45-51. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1723-2>

279 Bae S., Shoda M. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnken design // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2005. – No. 90. – P. 20-28. <https://doi.org/10.1002/bit.20325>

280 Bai F., Anderson W., Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks // *Biotechnol.* – 2008. – Adv 26. – P. 89-105. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>

281 Bai Q., Xiong Q., Li C., Shen Y. & Uyama H. Hierarchical porous carbons from a sodium alginate/bacterial cellulose composite for high-performance supercapacitor electrodes // *Applied Surface Science.* – 2018. – Vol. 455. – P.795–807. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.05.006>.

282 Bai, Y., Liu, R., Li, E., Li, X., Liu, Y., & Yuan, G. Graphene/carbon nanotube/ bacterial cellulose assisted supporting for polypyrrole towards flexible supercapacitor applications // *Journal of Alloys and Compounds.* – 2019. – Vol. 777. – P. 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.10.376>.

283 Bajaj B.K., Pangotra H., Wani M.A., Sharma P., Sharma A. Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus* strain M-9 // *Indian J Chem Technol.* – (2009). – 16. – P. 382-387. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/6161>

284 Baker S., Volova T., Prudnikova S.V., Shumilova A.A., Perianova O.V., Zharkov S.M., Kuzmin A., Kondratenka O., Kiryukhin B., Shidlovskiy I.P., Potkina Z.K., Khohlova O.Y., Lobova T.I. Bio-hybridization of nanobactericides with cellulose films for effective treatment against members of ESKAPE multi-drug-resistant pathogens // *Appl Nanosci.* – 2018. – 8. – P. 1101–1110. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0717-9>

285 Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and management.* – 2011. 52(2). – P. 858-875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>

286 Ballesteros I., Ballesteros M., Cabañas A., et al. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* – 1991. – Vol. 28. – P. 307–315. <https://doi.org/10.1007/bf02922610>.

287 Banerjee D., Hassarajani S.A., Maity B., Narayan G., Bandyopadhyaya S.K., Chattopadhyay S. Comparative healing property of Kombucha tea and black tea against indomethacin induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action *Food Funct.*, 1. – 2010. - P. 284-293. <https://doi.org/10.1039/C0FO00025F>

288 Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., & Pandey, R. A. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy.* – 2010. – 4(1). – P. 77-93. <https://doi.org/10.1002/bbb.188>

289 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. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.011>.

- 290 Bancirova M. Comparison of the anti-oxidant capacity and the anti-microbial activity of black and green tea *Food Res. Int.* – 2010. – 43. – P. 1379-1382. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.020>
- 291 Banzaraktsaeva, S.P., Ovchinnikova, E.V., Danilova, G., Danilevich, V.V., Chumachenko, V.A., 2019. Ethanol-to-ethylene dehydration on acid-modified ring-shaped alumina catalyst in a tubular reactor. *Chem. Eng. J.* 374, 605–618. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.149>
- 292 Banzaraktsaeva, S.P., Surmina, M.A., Chumachenko, V.A., Ovchinnikova, E.V., 2020. Effect of the isopropanol impurity in the feed on catalytic dehydration of bioethanol to ethylene. *Russ. J. Appl. Chem.* 93(5), 721–728. <https://doi.org/10.1134/S1070427220050134>
- 293 Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and management.* – 2011. 52(2). – P. 858-875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- 294 Baldini M., da Borso F., Ferfua C., Zuliani F., & Danuso, F. Ensilage suitability and bio-methane yield of *Arundo donax* and *Miscanthus*× *giganteus*. *Industrial crops and products.* – 2017. – 95. – P. 264-275. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.031>
- 295 Ballesteros I., Ballesteros M., Manzanares P. [et al.] Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production // *Biochemical Engineering Journal.* – 2008. – Vol. 42. – № 1. – P. 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.001>
- 296 Banerjee S., Mudliar S., Sen R., Giri B., Satpute D., Chakrabarti T. & Pandey R. A. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy.* – 2010. – 4(1). – P. 77-93. <https://doi.org/10.1002/bbb.188>
- 297 Barbash V. A., Yashchenko O. V. & Vasylieva O. A. Preparation and application of nanocellulose from *Miscanthus*× *giganteus* to improve the quality of paper for bags. *SN Applied Sciences.* – 2020. – 2(4). – P. 1-12. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2529-2>
- 298 Barud H.G., Rosa da Silva R., Barud H.S., Tercjak A., Gutierrez J., Lustri W.R., et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose // *Carbohydrate Polymers.* – 2016. – Vol. 153. – P. 406-420. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.059>
- 299 Barsha J., Hibbert H. Structure of the cellulose synthesized by the action of *Acetobacter xylinus* on fructose and glycerol // *Can. J. Res.* – 1934. – 10. – P. 170-179. <https://doi.org/10.1139/cjr34-014>
- 300 Barud H. S., Barrios C., Regiane T., Marques R. F. C., Verelst M., Dexpert-Ghys J., et al. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. *Materials Science and Engineering: 2008.* – 28. – P. 515–518. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.05.001>
- 301 Bäckdahl H., Helenius G., Bodin A., Nannmark U., Johansson B. R., Risberg B., et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with

smooth muscle cells // *Biomaterials*. – 2006. – 27. – P. 2141–2149.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.026>

302 Bäckdahl, H., Esguerra, M., Delbro, D., Risberg, B., & Gatenholm, P. Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2008. – 2. – P. 320–330.
<https://doi.org/10.1002/term.97>

303 Bayazidi, P.; Almasi, H.; Asl, A.K. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – 107. – P. 2544-2551.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.137>

304 Ben-Bassat A., Bruner R., Shoemaker S., Aloni Y., Wong H., Johnson D.C., Neogi A.N. Method of producing reticulated cellulose having type II crystalline cellulose. Patent of USA, no. US5871978A, 1999.

305 Ben-Bassat A., Bruner R., Shoemaker S., Aloni Y., Wong H., Johnson D.C., Neogi A.N. Reticulated cellulose and methods of microorganisms for the production thereof. Patent of USA, no. US78899485A, 2001.

306 Benziman M., Haigler C.H., Brown R.M.Jr., White A.R., Cooper K.M. Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled process in *Acetobacter xylinum* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1980. – No. 77. – P. 6678-6682. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6678>

307 Belgacem M.N., Gandini A. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* // Amsterdam: Elsevier. – 2008. – 553 p.

308 Betlej I., Krajewski K. J. & Borysiuk P. An assessment of the susceptibility of bacterial cellulose films to fouling by mold fungi. *Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW Forestry and Wood Technology*. – 2020. – P. 110.

309 Berlioz S., Molina-Boisseau S., Nishiyama Y. & Heux L. Gas-phase surface esterification of cellulose microfibrils and whiskers // *Biomacromolecules*. – 2009. – 10(8). – P. 2144-2151. <https://doi.org/10.1021/bm900319k>

310 Bhattacharya S., Gachhui R., Sil P.C. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats *Food Chem // Toxicol.* – 2013. – 60. – P. 328-340.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.051>

311 Bhatia S.K. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges / Bhatia S.K., Jagtap S.S., Bedekar A.A. // *Bioresource Technology*. – 2020. – Vol. 300. – № 122724.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>

312 Bhatia S. K., Jagtap S. S., Bedekar A. A., Bhatia R. K., Patel A. K., Pant D., ... & Yang Y. H. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource technology*. – 2020. – 300, 122724.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>

313 Bielecki S., Krystynowicz A.; Czaja Wojciech, Kolodziejczyk M. A method for the production of bacterial cellulose. Patent of Poland, no. EP1660670A1, 2006.

314 Bikales N.M. and Segal L Cellulose and Cellulose Derivatives. Parts IV-V / Edited by Wiley. Interscience. – 1971. – 510 p.

315 Boakye-Boaten N.A., Kurkalova L., Xiu S., Shahbazi A. Techno-economic analysis for the biochemical conversion of *Miscanthus x giganteus* into bioethanol // Biomass and Bioenergy. – 2017. – Vol. 98. – P. 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.017>

316 Bodin A., Concaro S., Brittberg M., Gatenholm P. Bacterial cellulose as a potential meniscus implant // Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. – 2007. – No. 1 – C. 406-408. <https://doi.org/10.1002/term.51>

317 Bogolitsyn K., Parshina A., Aleshina L. Structural features of brown algae cellulose // Cellulose. – 2020. – 27. – P. 9787-9800. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03485-z>

318 Borzani W., Souza S.J. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media // Biotechnology Letters. – 1995. – Vol. 17, № 11. – P. 1271-1272. <https://doi.org/10.1007/BF00128400>

319 Botella C., Zhang K., Baugh A., Liang Y. & Sivakumar S. V. Reversible acid pretreatment scale up studies for the production of cellulosic ethanol from ensiled sweet sorghum // Biochemical Engineering Journal. – 2019. – 150. – 107266. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107266>

320 Brandes R., de Souza L., Vanin D.V.F., Carminatti C.A., Oliveira E.M., Antônio R.V., Recouvreux D.O.S. Influence of the Processing Parameters on the Characteristics of Spherical Bacterial Cellulose // Fibers and Polymers. – 2018. Vol.19, № 2. – P. 297-306. <https://doi.org/10.1007/s12221-018-7679-5>

321 Briggs GE, Haldane JB A note on the kinetics of enzyme action // Biochem J. – 1925. – 19(2). – P. 338–339. <https://doi.org/10.1042/bj0190338>

322 Brink, D. L. Two stage hydrolysis or depolymerization of polysaccharide material as cellulose, hemicellulose and lignocellulose to monosaccharides using nitric acid; Patent 5221357 US 1993.

323 Brink, D. L. Hydrolyzing lignocellulose; Patent 5536325 US 1996.

324 Brodeur G., Yau E., Badal K., et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review // Enzyme Research. – 2011. – Vol. 2011. – №. 787532. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>

325 Brosse N., Hage R.E., Sannigrahi P., Ragauskas A. Dilute sulphuric acid and ethanol organosolv pretreatment of *Miscanthus x Giganteus* // Cellul Chem Technol. – 2010. – 44. – P. 71-78. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03151509>

326 Brown A.J. The chemical action of pure cultivations of bacterium aceti // Journal of the Chemical Society, Transactions. – 1886. – No 49. – P. 172-177. <https://doi.org/10.1039/CT8864900172>

- 327 Brown A.J. On an acetic ferment which forms cellulose // *J. Chem. Soc. Trans.* – 1886. – 49. – P. 432–439. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1886/ct/ct8864900432>
- 328 Brown R.M.Jr. The biosynthesis of cellulose // *Food Hydrocolloid.* – 1987. – No. 1. – P. 345-351. <https://doi.org/10.1080/10601329608014912>
- 329 Brown R.M. Jr., Saxena I.M. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers // *Plant Physiology and Biochemistry.* – 2000. – No. 38. – P. 57-67. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00168-6)
- 330 Buah W., Cunliffe A., Williams P. Characterization of products from the pyrolysis of municipal solid waste // *Process Saf Environ Prot.* – 2007. – 85. – P. 450-457. <https://doi.org/10.1205/psep07024>
- 331 Budaeva V.V., Makarova E.I., Gismatulina Yu.A. Integrated Flowsheet for Conversion of Non-woody Biomass into Polyfunctional Materials // *Key Engineering Materials.* – 2016. – Vol. 670. – P. 202-206. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.670.202>
- 332 Budhiono A., Rosidi B., Taher H., Iguchi M. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system // *Carbohydr Polym.* – 1999. – 40. – P. 137-143. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00050-8)
- 333 Buldum G., Bismarck A. and Mantalaris A. Recombinant biosynthesis of bacterial cellulose in genetically modified *Escherichia coli* // *Bioprocess Biosyst. Eng.* – 2018. – 41. – P. 265–279. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1864-1>
- 334 Buranov A.U., Mazza G. Lignin in straw of herbaceous crops // *Industrial Crops and Products.* – 2008. – V. 28, Is. 3. – P. 237-259. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.008>
- 335 Bychkov A.L., Podgorbunskikh E.M., Lomovsky O.I., Ryabchikova E.I. The role of mechanical action in the process of the thermomechanical isolation of lignin // *Cellulose.* – 2018. – T. 25, № 1. – C. 1-5. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1536-y>
- 336 Bychkov E., Podgorbunskikh O., Lomovsky E. Bychkova. Current achievement in the mechanically activated processing of plant raw materials // *Biotechnol. Bioeng.* – 2019. – 116(5). – 1231–1244. <https://doi.org/10.1002/bit.26925>
- 337 Cacicedo ML, Castro MC, Servetas I, Bosnea L, Boura K, Tsafraquidou P, Castro GR Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications // *Bioresource Technol.* – 2016. – 213. – P. 172-180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.071>
- 338 Cai Z., Kim J. Bacterial cellulose/poly(ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility // *Cellulose.* – 2010. – Vol. 17, No. 1. – P. 83-91. <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-009-9362-5>
- 339 Camargo M. S. A., Cercal A. P., Silveira V. F., Mancinelli K. C. B., Gern R. M. M., Garcia M. C. F., ... & Pezzin, A. P. T. Evaluation of Wet Bacterial Cellulose Degradation in Different Environmental Conditions. In *Macromolecular*

Symposia. – 2020. – Vol. 394, No. 1. – P. 2000149.
<https://doi.org/10.1002/masy.202000149>

340 Campano C., Balea A., Blanco A., Negro C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review // Cellulose. – 2016. – Vol. 23. – P. 57-91. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0802-0>

341 Cannon R.E., Anderson S.M. Biogenesis of bacterial cellulose // Crit. Rev. Microbiol. – 1991. – 17(6) – P. 435-447.
<https://doi.org/10.3109/10408419109115207>

342 Cao Y., Lu S. and Yang Y. Production of bacterial cellulose from byproduct of citrus juice processing (citrus pulp) by *Gluconacetobacter hansenii* // Cellulose. – 2018. – 25. – P. 6977–6988. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2056-0>

343 Caro I., Blandino A., Díaz A.B., Marzo C. A kinetic model considering the heterogeneous nature of the enzyme hydrolysis of lignocellulosic materials // Biofuel. Bioprod. Bior. – 2019. – 13(4). – P. 1044–1056.
<https://doi.org/10.1002/bbb.1997>

344 Caro-Astorga J., Walker K. T., Herrera N., Lee K. Y., & Ellis T. Bacterial cellulose spheroids as building blocks for 3D and patterned living materials and for regeneration. Nature communications. – 2021. – 12(1). – P. 1-9.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-25350-8>

345 Carreira P., Mendes J.A.S., Trovatti E., Serafim L.S., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose // Bioresource technology. – 2011. – No. 102 (15). – P. 7354-7360. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.081>

346 Carvalho T., Armando J. D. Silvestre, Pedro M. C. Inácio, Ana L. G. Mestre, Henrique L. Gomes, Carmen S. R. Freire Bacterial cellulose on bioelectronics for the study and treatment of neurodegenerative disorders / The 3rd Symposium of Bacterial NanoCellulose: Abstracts, Fukuoka, Japan, October 16-17, 2017. – P. 41.

347 Carvalho T., Guedes G., Sousa F. L., Freire C. S. R. and Santos H. A. Latest advances on bacterial cellulose-based materials for wound healing, delivery systems, and tissue engineering // Biotechnol. J. – 2019. – 14:e1900059.
<https://doi.org/10.1002/biot.201900059>

348 Cavka A., Guo X., Tang S., Winstrand S., Jönsson L.J., Hong F. Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fibers ludge // Biotechnol Biofuels. – 2013. – № 6. – P. 25-35. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-25>

349 Cavka L.J. Jönsson Detoxification of lignocellulosic hydrolysates using sodium borohydride // Bioresour Technol. – 2013. – 136. – P. 368-376.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.014>

350 Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., Chakraborty W., Bhattacharya D. & Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics // International journal of food microbiology. – 2016. – 220. – P. 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>

351 Chan E.W.C., Soh E.Y., Tie P.P., Law Y.P. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis* // Pharmacogn. Res. – 2011. – № 3. – P. 266-272. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.89748>

352 Chandel A.K., E. Chan, R. Rudravaram, M.L. Narasu, L.V. Rao, P. Ravindra Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal // Biotechnol Mol Biol Rev. – 2007. – № 2. – P. 14-32. <https://doi.org/10.5897/BMBR2007.0002>

353 Chandel A.K., Da Silva S.S., Singh O.V. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology // BioEnergy Res. – 2013. – № 6. – P. 388-401. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1419-210.1007/s12155-012-9241-z>

354 Chandrasekaran PT, Bari NK, Sinha S Enhanced bacterial cellulose production from *Gluconobacter xylinus* using super optimal broth // Cellulose. – 2017. – № 24(10). – P. 4367-4381. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1419-2>

355 Chang VS, Holtzaple MT. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. In: Proceedings of the twenty-first symposium on biotechnology for fuels and chemicals / Springer. – 2000. – P. 5–37. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1392-5_1

356 Chao Y.-P., Sugano Y., Kouda T., Yoshinaga F., Shoda M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* with an air-lift reactor // Biotechnology Techniques. – 1997. – 11 (11). – P. 829-832

357 Chao Y.-P., Ishida T., Sugano Y., Shoda M. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor // Biotechnology and Bioengineering. – 2000. – № 68. – P. 345-352. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000505\)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000505)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M)

358 Chao Y.-P., Sugano Y., Shoda M. Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2001. – 55. – P. 673-679. <https://doi.org/10.1007/s002530000503>

359 Chaud L.C.S., Silva D.D.V.d., Mattos R.T.d., Felipe M.d.G.d.A. Evaluation of oat hull hemicellulosic hydrolysate fermentability employing *Pichia stipites* // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2012. – Vol. 55, № 5. – P. 771–777. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000500017>

360 Chávarri M.; Maranon I.; Villaran M.C. Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. In Probiotics; Rigobelo, E.C., Eds.; InTech, London, UK, 2012. – P. 501–540. <https://doi.org/10.5772/50046>

361 Chawla P.R., Bajaj I.B., Survase S.A., Singhal R.S. Microbial cellulose: Fermentative production and applications // Food Technology and Biotechnology. – 2009. – No 47. – P. 107-124.

362 Chen C., Liu B.Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation // J. Appl. Microbiol. – 2000. – № 89. – P. 834-839/ <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>

- 363 Chen D., Milacic V., Chen M.S., Wan S.B., Lam W.H., Huo C., et al. Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets // *Histol. Histopathol.* – 2008. – 23. – P. 487-496. <https://doi.org/10.14670/чч-23.487>
- 364 Chen G, Chen L, Wang W, Hong FF Evaluation of six ionic liquids and application in pretreatment of sweet sorghum bagasse for bacterial nanocellulose production // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 2018. – 93(12). – P. 3452-3461. <https://doi.org/10.1002/jctb.5703>
- 365 Chen G., Wu G., Chen L., Wang W., Hong FF., Jönsson LJ. Performance of nanocellulose-producing bacterial strains in static and agitated cultures with different starting pH // *Carbohydrate Polymers.* – 2019. – 215. – P. 280-288. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.080>
- 366 Chen G., Wu G., Chen L., Wang W., Hong FF., Jönsson LJ. Comparison of productivity and quality of bacterial nanocellulose synthesized using culture media based on seven sugars from biomass // *Microbial Biotechnology.* – 2019 . – № 12(4). – P. 677-687. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13401>
- 367 Chen H.H., Chen L.C., Huang H.C. and Lin S.B. In situ modification of bacterial cellulose nanostructure by adding CMC during the growth of *Gluconacetobacter xylinus* // *Cellulose.* – 2011. – Vol.18. – P.1573–1583. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9594-z>
- 368 Chen H., & Fu X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* – 2016. – № 57. – P. 468-478. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.069>
- 369 Chen J., Chen C., Liang G., Xu X., Hao Q., & Sun D. In situ preparation of bacterial cellulose with antimicrobial properties from bioconversion of mulberry leaves // *Carbohydrate Polymers.* – 2019. – № 220. – 170-175. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.062>
- 370 Chen J., Zhang B., Luo L., Zhang F., Yi Y., Shan Y., ... & Lü X. A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* – 2021. – № 149. – P. 111370. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111370>
- 371 Chen L., Hong F., Yang XX., Han SF. Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism // *Bioresour Technol.* – 2013. – № 135. – P. 464–468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.029>
- 372 Chen L.; Zou M.; Hong F.F. Evaluation of fungal laccase immobilized on natural nanostructured bacterial cellulose // *Front. Microbiol.* – 2015. – 6. – P. 1245. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01245>
- 373 Chen L., Cao X., Gao J., He W., Liu J., Wang Y., ... & Tan D. Nitrated bacterial cellulose-based energetic nanocomposites as propellants and explosives for military applications // *ACS Applied Nano Materials.* – 2021. – 4(2) 1906-1915. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c03263>
- 374 Chen P., Cho S. Y., Jin H.-J. Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science // *Macromolecular Research.* – 2010. – 18. P. 309–320. <https://doi.org/10.1007/s13233-010-0404-5>

375 Chen S-Q., Mikkelsen D., Lopez-Sanchez P., Wang D., Martinez-Sanz M., Gilbert EP., Flanagan BM., Gidley MJ. Characterisation of bacterial cellulose from diverse *Komagataeibacter* strains and their application to construct plant cell wall analogues // Cellulose. – 2017. – № 24(3). – P. 1211-1226. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1203-3>

376 Chen S. Q., Lopez-Sanchez P., Wang D., Mikkelsen D. & Gidley M. J. Mechanical properties of bacterial cellulose synthesised by diverse strains of the genus *Komagataeibacter* // Food Hydrocolloids. – 2018. – 81. – 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.031>

377 Chen W. S., Yu H. P., Lee S. Y., Wei T., Li J., Fan Z. J. Nanocellulose: a promising nanomaterial for advanced electrochemical energy storage // Chem. Soc. Rev. – 2018. – Vol. 47. – P. 2837–2872. <https://doi.org/10.1039/c7cs00790f>

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

379 Chen X., Xu X., Cui J., Chen C., Zhu X., Sun D. & Qian J. Visible-light driven degradation of tetracycline hydrochloride and 2, 4-dichlorophenol by film-like N-carbon@ N-ZnO catalyst with three-dimensional interconnected nanofibrous structure // Journal of hazardous materials. – 2020. – № 392. – 122331. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122331>

380 Cheng H.N., Takai M., Ekong E.A. Rheology of carboxymethylcellulose made from bacterial cellulose // Macromolecular Symposia. – 1999. – Vol. 140. – P. 145-153. <https://doi.org/10.1002/masy.19991400116>

381 Cheng K-C., Catchmark M., Demirci A. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis // J Biol Eng. – 2009. – № 3. – P. 12. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-12>

382 Cheng K.-C., J.-M. Catchmark, A. Demirci Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in biofilm reactor and its paper sheets analysis // Biomacromolecules. – 2011. – № 12. – P. 730-736. <https://doi.org/10.1021/bm101363t>

383 Cheng S., Yu H., Hu M., Wu Y., Cheng L., Cai Q., ... & Peng L. Miscanthus accessions distinctively accumulate cadmium for largely enhanced biomass enzymatic saccharification by increasing hemicellulose and pectin and reducing cellulose CrI and DP // Bioresource technology. – 2018. – № 263. – P. 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.031>

384 Cheng Z., Yang RD., Liu X. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* through utilizing acetic acid hydrolysate of bagasse as low-carbon source // Bioresources. – 2016. – № 12(1). – P. 1190-1200. <https://doi.org/10.15376/biores.12.1.1190-1200>

385 Cheng Z., Yang R., Liu X., Liu X., Chen H. Green synthesis of bacterial cellulose via acetic acid pre-hydrolysis liquor of agricultural corn stalk

used as carbon source // *Bioresource Technol.* – 2017. – № 234. – P. 8-14.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.131>

386 Chiramonti D., Rizzo AM., Prussi M., Tedeschi S., Zimbardi F., Braccio G., Viola E., Pardelli PT. 2nd generation lignocellulosic bioethanol: is torrefaction a possible approach to biomass pretreatment // *Biomass Conv Bioref.* – 2011. – № 1(1). – P. 9-15. <https://doi.org/10.1007/s13399-010-0001-z>

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

388 Choi K. R., Jiao S., Lee S. Y. Metabolic engineering strategies toward production of biofuels // *Current Opinion in Chemical Biology.* – 2020. – Vol. 59. – P. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.02.009>

389 Chopda R., Ferreira J. A. & Taherzadeh M. J. Biorefining oat husks into high-quality lignin and enzymatically digestible cellulose with acid-catalyzed ethanol organosolv pretreatment // *Processes.* – 2020. – № 8(4). – P. 435.
<https://doi.org/10.3390/pr8040435>

390 Chu S.C., Chen C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of *Kombucha* // *Food Chem.* – 2006. – 98. – P. 502-507.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.080>

391 Chuang C.L., Fan M., Xu M., et al. Adsorption of arsenic (V) by activated carbon prepared from oat hulls // *Chemosphere.* – 2005. – Vol. 61. – P. 478–483. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.012>

392 Coban E.P., Biyik H. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis HBB5* // *African Journal of Biotechnology.* – 2011. – Vol. 10, No. 27. – P. 5346-5354.
<https://doi.org/10.5897/AJB10.1693>

393 Coban E.P., Biyik H. Evaluation of different pH and temperatures for bacterial cellulose production in HS (Hestrin-Scharmm) medium and beet molasses medium // *African Journal of Microbiology Research.* – 2011, a. – № 5. – P. 1037-1045. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.008>

394 Cortivo P.R.D., Hickert L.R., Hector R., Ayub M.A.Z. Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments // *Industrial Crops and Products.* – 2018. – Vol. 113. – P. 10–18.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.010>

395 Costa A. F., Almeida F. C., Vinhas G. M., Sarubbo L. A. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources // *Frontiers in microbiology.* – 2017. – Vol. 8. – P. 2027.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02027>

396 CPKelco Inc. Available online at: <https://www.cpkelco.com/products/fermentation-derived-cellulose-fdc/> (accessed August 20, 2020).

- 397 Cunha J. T., Soares P. O., Baptista S. L., Costa C. E. & Domingues L. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* for lignocellulosic valorization: A review and perspectives on bioethanol production // *Bioengineered*. – 2020. – № 11(1). – 883-903. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1801178>
- 398 Curvello R., Raghuwanshi V. S. and Garnier G. Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2019. – Vol. 267. – P. 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.03.002>
- 399 Czaja W., Romanovicz D., Brown RM. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture // *Cellulose*. – 2004. – Vol. 11(3-4). – P. 403-411. <https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046412.11983.61>
- 400 Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S. & Brown Jr R. M. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27(2). – P. 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>
- 401 Czaja W. K., Young D. J., Kawecki M. and Brown R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications // *Biomacromolecules*. – 2007. – № 8. – P. 1–12. <https://doi.org/10.1021/bm060620>
- 402 Das N., Jena P. K., Padhi D., Kumar Mohanty M. & Sahoo G. A comprehensive review of characterization, pretreatment and its applications on different lignocellulosic biomass for bioethanol production // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – 2021. – P. 1-25. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01294-3>
- 403 Dayal M.S., Catchmark J.M. Mechanical and structural property analysis of bacterial cellulose composites // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – Vol. 144. – P. 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.055>
- 404 da Silva C. J. G., de Medeiros A. D. L. M., de Amorim J. D. P., do Nascimento H. A., Converti A., Costa A. F. S., & Sarubbo L. A. Bacterial cellulose biotextiles for the future of sustainable fashion: a review // *Environmental Chemistry Letters*. – 2021. – Vol. 19. – P. 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01214-x>
- 405 Debiagi F., Madeira T.B., Nixdorf S.L., Mali S. 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 // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 190. – P. 166–181. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03092-0>
- 406 Deinema M.H., Zevenhuizen L.P. Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation // *Arch Mikrobiol* 1971. – 78(1). – P. 42–51.
- 407 De Iannino N.I., Couso R.O., Dankert M.A. Lipid-linked intermediates and the synthesis of acetan in *Acetobacter xylinum* // *Journal of general microbiology*. – 1988. – No. 134. – P. 1731-1736. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-6-1731>
- 408 Delmer DP, Benziman M, Padan E Requirement for a membrane potential for cellulose synthesis in intact cells of *Acetobacter xylinum* // *Proc Natl*

- Acad Sci USA. – 1982. – 79(17). – P. 5282–5286.
<https://doi.org/10.1073/pnas.79.17.5282>
- 409 Delmer D.P., Amor Y. Cellulose biosynthesis // *Plant Cell*. – 1995. – No. 7. – P. 987-1000. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.987>
- 410 Delmer DP Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. – 1999. – № 50. – P. 245–276. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.245>
- 411 Demchenko A.G., Lyundup A.V., Sedyakina N.E., Gromovykh T.I., Feldman N.B., Lutsenko S.V., Sadykova V.S., Ananyan M.A Antimicrobial and cytotoxic activity of silver nanoparticles stabilized by natural biopolymer arabinogalactan // *International Journal of Nanoscience*. – 2020. – T. 19, № 4. – C. 1950029. <https://doi.org/10.1142/S0219581X19500297>
- 412 Demirel Y. 1.22 Biofuels // In: Dincer, I. (ed.) *Comprehensive Energy Systems*. – Oxford: Elsevier, 2018. – P. 875–908. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809597-3.00125-5>
- 413 Demirel F., Germec M., Coban H.B., Turhan I. Optimization of dilute acid pretreatment of barley husk and oat husk and determination of their chemical composition // *Cellulose*. – 2018. – Vol. 25. – P. 6377–6393. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2022-x>
- 414 de Oliveira Barud H. G., da Silva R. R., da Silva Barud H., Tercjak A., Gutierrez J., Lustri W. R., ... & Ribeiro S. J. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – Vol. 153. – P. 406-420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.059>
- 415 de Souza C.J.A., Costa D.A., Rodrigues M.Q.R.B. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse // *Bioresource Technology*. – 2012. – Vol. 109. – C. 63–69 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.024>
- 416 Devi A., Bajar S., Kour H., Kothari R., Pant D., & Singh A. Lignocellulosic Biomass Valorization for Bioethanol Production: a Circular Bioeconomy Approach // *Bioenergy Research*. – 2022. – P. 1-22. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10401-9>
- 417 Dey N., Kumar G., Vickram A. S., Mohan M., Singhania R. R., Patel A. K., ... & Ponnusamy V. K. Nanotechnology-assisted production of value-added biopotent energy-yielding products from lignocellulosic biomass refinery—A review // *Bioresource Technology*. – 2022. – 344, 126171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126171>
- 418 Dey P., Pal P., Kevin J. D. & Das D. B. Lignocellulosic bioethanol production: prospects of emerging membrane technologies to improve the process—a critical review // *Reviews in Chemical Engineering*. – 2020. – 36(3). – P. 333-367. <https://doi.org/10.1515/revce-2018-0014>
- 419 B. Dien, M. Cotta, T. Jeffries Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2003. – № 63. – P. 258-266. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1444-y>

420 Dimos K., Paschos T., Louloudi A., et al. Effect of Various Pretreatment Methods on Bioethanol Production from Cotton Stalks // Fermentation. – 2019. – Vol. 5. – № 5. <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation5010005>

421 Dome K., Podgorbunskikh E., Bychkov A., Lomovsky O. Changes in the crystallinity degree of starch having different types of crystal structure after mechanical pretreatment // Polymers. – 2020. – T. 12, № 3. – C. 641. <https://doi.org/10.3390/polym12030641>

422 Donini Í. A. N., Salvi D. T. B. D., Fukumoto F. K., Lustrri W. R., Barud H. S., Marchetto R., et al. Biossntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana // Eclética Química. – 2010. – № 35. – P. 165–178. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>

423 Dorogina O.V., Vasilyeva O.Yu., Nuzhdina N.S., Buglova L.V., Zhmud E.V., Zueva G.A., Komina O.V., Kuban I.S., Gusar A.S., Dudkin R.V. The formation and study of the collection of gene pool of resource species of the genus *Miscanthus* Anderss, in conditions of forest-steppe of Western Siberia // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2019. – 23 (7). – P. 553-559. <http://dx.doi.org/10.18699/VJ18.394>

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

425 Dotsenko A. S., Denisenko Y. A., Rozhkova A. M., Zorov I. N., Korotkova O. G. & Sinitsyn A. P. Enhancement of thermostability of GH10 xylanase E *Penicillium canescens* directed by $\Delta\Delta G$ calculations and structure analysis // Enzyme and Microbial Technology. – 2021. – 152, 109938. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109938>

426 Dourado F., Fontão A., Leal M., Cristina Rodrigues A. and Gama M. «Chapter 12 - Process modeling and techno-economic evaluation of an industrial bacterial nanocellulose fermentation process», in Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bio-economy, eds M. Gama, F. Dourado, and S. Bielecki (Amsterdam: Elsevier), 2016 a. – P. 199–214. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-16061-8>

427 Dourado F., Leal M., Martins D., Fontão A., Cristina Rodrigues A., and Gama M. «Chapter 7 - Celluloses as food ingredients/additives: is there a room for BNC?» in Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bioeconomy, eds M. Gama, F. Dourado, and S. Bielecki (Amsterdam: Elsevier), 2016 b. – P. 123–133. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-16061-8>

428 Draushuk A. T., Choy C. O., Kumar S., McReynolds J. H., Olson J. R. Modulation of cytochrome P450 by 5,5'-bis-trifluoromethyl-2,2'-dichlorobiphenyl, a unique environmental contaminant // Toxicology. – 1997. – Vol. 120. – P. 197–205. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(97\)00056-5](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(97)00056-5)

429 Du C., Li Y., Zhao X., et al. The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and

Spathaspora passalidarum ATCC MYA-4345 // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2019. – Vol. 103. – P. 2845–2855. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09625-1>

430 Dubey S, Singh J, Singh RP Biotransformation of sweet lime pulp waste into high-quality nanocellulose with an excellent productivity using *Komagataeibacter europaeus* SGP37 under static intermittent fed-batch cultivation // Bioresour Technol. – 2018. – Vol. 247. – P. 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.089>

431 Dubis B., Katarzyna K., Lewandowska M., Szemplin'ski W., Jankowski K.J., Idz'kowski J., Kordala N., Szyman'ska K. Effect of different nitrogen fertilizer treatments on the conversion of *Miscanthus giganteus* to ethanol // Bioresource Technology. – 2017. – Vol. 243. – P. 731–737. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.005>

432 Dufresne C., Farnworth E. Tea, kombucha, and health: a review // Food Res Int 2000. – 33. – P. 409–21. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)

433 Dutta D., R. Gachhui Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from *Kombucha* tea // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – Vol. 57. – P. 353-357. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64638-0>

434 Efimenko T.A., Efremenkova O.V., Vasilyeva B.F., Shanenko E.F., Mukhamedzhanova T.G., Grishin A.G., Serykh I.N., Nikolayev Y.A., Filippova S.N., El-Registan G.I., Bilanenko E.N., Gernet M.V., Shevelev S.V. *Eurotium cristatum* postfermentation of fireweed and apple tree leaf herbal teas // International Journal of Food Science. – 2021. – T. 2021. – P. 6691428. <https://doi.org/10.1155/2021/6691428>

435 Efremenko E. N., Stepanov N. A., Nikolskaya A. B., Senko O. V., Spiricheva O. V. & Varfolomeev S. D. Biocatalysts based on immobilized cells of microorganisms in the production of bioethanol and biobutanol // Catalysis in industry. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 41-46. <http://dx.doi.org/10.1134/S207005041101003X>

436 Efremenko E. N., Nikolskaya A. B., Lyagi I. V., Senko O. V., Makhlis T. A., Stepanov N. A., ... & Varfolomeev S. D. Production of biofuels from pretreated microalgae biomass by anaerobic fermentation with immobilized *Clostridium acetobutylicum* cells // Bioresource technology. – 2012. – № 114. – P. 342-348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.049>

437 Esa F., Tasirin S. M., Abd Rahman N. Overview of bacterial cellulose production and application // Agriculture and Agricultural Science Procedia. – 2014. – Vol. 2. – P. 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>

438 Ethanol Industry Outlook 2020. Renewable Fuels Association (2/2020). Дата обращения: 3 января 2021.

439 Ettayebi K., F. Errachidi, L. Jamai, M.A. Tahri-Jouti, K. Sendide, M. Ettayebi Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under

metabolic induction // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – № 223. – P. 215-219.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00380-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00380-X)

440 Fan X., Gao Y., He W., Hu H., Tian M., Wang K., Pan S. Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus* // Carbohydr Polym. – 2016. – № 151 . – P. 1068–1072. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.062>

441 Fan Z., South C., Lyford K., et al. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2003. – № 26. – P. 93–101. <https://doi.org/10.1007/s00449-003-0337-x>

442 Fang J., Kawano S., Tajima K., Kondo T. In vivo curdlan/cellulose bionanocomposite synthesis by genetically modified *Gluconacetobacter xylinus*. // Biomacromol. – 2015. – № 16. – P. 3154-3160. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01075>

443 Farah L. F. X. Process for the preparation of cellulose film, cellulose film produced thereby artificial skin graft and its use. Bio fill produtos biotecnológicos (Brasil). US 4912049, 30 Sept. 1990, 10 June 1986.

444 Faria-Tischer P.C.S., Tischer C.A., Heux L., Le Denmat S., Picart C., Sierakowski M.-R. & Putaux J.-L. Preparation of cellulose II and III films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles // Materials Science and Engineering. – 2015. – № 51. – P. 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.025>

445 Fariás-Sánchez J. C., Velázquez-Valadez U., Pineda-Pimentel M. G., López-Miranda J., Castro-Montoya A. J., Carrillo-Parra A., ... & Rutiaga-Quiñones J. G. Simultaneous saccharification and fermentation of pine sawdust (*Pinus pseudostrobus* L.) pretreated with nitric acid and sodium hydroxide for bioethanol production // BioResources. – 2017. – № 12(1). – P. 1052-1063.

446 Feng X., Ullah N., Wang X., Sun X., Li C., Bai Y., ... & Li Z. Characterization of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 // Journal of food science. – 2015. – 80(10). – E2217-E2227. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13010>

447 Festucci-Buselli R. A., Otoni W. C. & Joshi C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants // Brazilian Journal of Plant Physiology. – 2007. – № 19. – P. 1-13. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000100001>

448 Ferraz F.M., Yuan Q. Performance of oat hulls activated carbon for COD and color removal from landfill leachate // Journal of Water Process Engineering. – 2020. – Vol. 33. – № 101040. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101040>

449 Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components // Science. – 1998. – Vol. 281. P. 237-240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>

- 450 Figueiredo A. R., Figueiredo A. G., Silva N. H., Barros-Timmons A., Almeida A., Silvestre A. J. & Freire C. S. Antimicrobial bacterial cellulose nanocomposites prepared by in situ polymerization of 2-aminoethyl methacrylate // Carbohydrate polymers. – 2015. – № 123. – P. 443-453. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.063>
- 451 Fijałkowski K.; Peitler D.; Rakoczy R.; Zywicka A. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution // LWT-Food Sci. Technol. – 2016. – № 68. – P. 322-328. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.038>
- 452 Fink H., Faxalv L., Molnar G.F., Drotz K., Risberg B., Lindahl T.L., Sellborn A. Real-time measurements of coagulation on bacterial cellulose and conventional vascular graft materials // Acta Biomaterialia. – 2010. – Vol. 6, No. 3. – P. 1125-1130. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.019>
- 453 Fish W.W., Bruton B.D, Russo V.M. Water melon juice: a promising feed stock supplement, diluent, and nitrogen supplement for ethanol biofuel production // Biotechnology for Biofuels. – 2009. – Vol. 2. – № 18. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-2-18>
- 454 Florea M., et al. Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose-producing strain // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2016. – 113. – E3431–E3440 <https://doi.org/10.1073/pnas.1522985113>
- 455 Fontana J. D., De Souza, A. M. Fontana, C. K. Torriani, I. L. Moreschi J. C., Gallotti B. J., ... & Farah L. F. X. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute // Applied biochemistry and biotechnology . – 1990. – № 24(1). – 253-264.
- 456 Fontana JD, Franco VC, de Souza SJ, Lyra IN, de Souza AM Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* (“tea fungus”) biofilm used in skin therapy // Appl Biochem Biotechnol. – 1991. – № 28/29. – 341-351. <https://doi.org/10.1007/BF02922613>
- 457 Forte, A., Dourado, F., Mota, A., Neto, B., Gama, M., & Ferreira, E. C. Life cycle assessment of bacterial cellulose production // The International Journal of Life Cycle Assessment, 2021. – P. 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11367-021-01904-2>
- 458 French A.D Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs // Cellulose. – 2014. – № 21(2). – P. 885-896. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0030-4>
- 459 French AD Increment in evolution of cellulose crystallinity analysis // Cellulose. –2020. – № 27(10). – P. 5445-5448. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03172-z>
- 460 Fu L., Zhang Y., Li C., Wu Z., Zhuo Q., Huang X., ... & Yang G. Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method // Journal of Materials Chemistry. – 2012. – № 22(24). – P. 12349-12357. <https://doi.org/10.1039/C2JM00134A>

- 461 Fu L., Zhang J. & Yang G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair // Carbohydrate polymers. – 2013. – № 92(2). – P. 1432-1442. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.071>
- 462 Galbe M., Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood // Appl Microbiol Biotechnol. – 2002. – 59. – P. 618-628. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1058-9>
- 463 Gama M., Gatenholm P., Klemm D. Bacterial nanocellulose: a sophisticated multifunctional material. – 2013. – 306 p.
- 464 Gama M., Dourado F., & Bielecki S. (Eds.). – 2016. – Bacterial nanocellulose: from biotechnology to bio-economy. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-16061-8>
- 465 Ganguly A., Chatterjee P.K., Dey A. Studies on ethanol production from water hyacinth – A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2012. – 16(1). – P. 966-972. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.018>
- 466 Gao J., Li Z., Dong M. Thermodynamic analysis of ethanol synthesis from hydration of ethylene coupled with a sequential reaction // Frontiers of Chemical Science and Engineering. – 2019. – Vol. 14. – P. 847–856. <http://dx.doi.org/10.1007/s11705-019-1848-6>
- 467 Gao W.-H., Chen K.-F., Yang R.-D., Yang F., Han. W.-J. Properties of bacterial cellulose and its influence on the physical properties of paper // BioResources. – 2011. – No. 6. – C. 144-153.
- 468 Gardner D. J., Oporto G. S., Mills R. & Samir M. A. S. A. Adhesion and surface issues in cellulose and nanocellulose // Journal of adhesion science and technology . – 2008. – № 22(5-6). – 545-567. <https://doi.org/10.1163/156856108X295509>
- 469 Gaurav N., Sivasankari S., Kiran G.S., Ninawe A. & Selvin J. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: a review, Renew // Renewable & Sustainable Energy Reviews. – 2017. – № 73. – P. 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.070>
- 470 Gaurav G.K., Mehmood T., Cheng L., Klemeš JiříJaromí, Shrivastava D.K. Water hyacinth as a biomass: A review // Journal of Cleaner Production. – 2020. – № 122214. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122214.3>
- 471 Gavrilova K., Bychkov A., Bychkova E., Akimenko Z., Chernonosov A., Kalambet Yu., Lomovskii O. Mechanically activated hydrolysis of plant-derived proteins in food industry // Foods and Raw Materials. –2019. –T. 7, № 2. – P. 255-263. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-255-263>
- 472 Geissdoerfer M., Savaget P., Bocken N.M.P., Hultink E.J. The circular economy – a new sustainability paradigm? // J. Clean. Prod. – 2017. –Vol. 43. – P. 757–768. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.048>
- 473 George J., Kumar R., Sajeevkumar V. A., Ramana K. V., Rajamanickam R., Abhishek V. & Nadanasabapathy S. Hybrid HPMC nanocomposites containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles // Carbohydrate polymers. – 2014. – № 105. – P. 285-292. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.057>

- 474 Germec M., Demirel F., Tas N., et al. Microwave-assisted dilute acid pretreatment of different agricultural bioresources for fermentable sugar production // *Cellulose*. – 2017. – Vol. 24. – P. 4337–4353. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1408-5>
- 475 Gernet M.V., Sevostyanova E.M., Soboleva O.A., Kovaleva I.L., Gribkova I.N. Methodological approaches to evaluating beer and non-alcoholic products shelf life // *Food systems*. – 2019. – Т. 2, № 3. – С. 13-16. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2019-2-3-13-16>
- 476 Gernet M.V., Gribkova I.N., Kobelev K.V., Nurmukhanbetova D.E., Assembayeva E.K. Biotechnological aspects of fermented drinks production on vegetable raw materials // *Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия геологии и технических наук*. – 2019. – Т. 1, № 433. – С. 223-230. <http://www.geolog-technical.kz/images/pdf/g20191/223-230.pdf>
- 477 Gernet M.V., Zakharov M.A., Gribkova I.N. The antioxidant compounds determination of various brewer's spent grain extracts // *Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. – 2020. – Т. 21, № 2. – С. 263-270.
- 478 Ghose TK Measurement of cellulose activities // *Pure Appl Chem*. – 1987. – № 59. – P. 257-268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- 479 Gilbert C. & Ellis, T. Biological engineered living materials: growing functional materials with genetically programmable properties // *ACS Synth. Biol*. – 2019. – 8. – P. 1–15 <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00423>
- 480 Gilbert C. et al. Living materials with programmable functionalities grown from engineered microbial co-cultures // *Nat. Mater*. – 2021. – № 20. – P. 671-700. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00857-5>
- 481 Gírio F., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L., Marques S., Bogel-Łukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review // *Bioresour Technol*. – 2010. – 101. – P. 4775-4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- 482 Gismatulina Y.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V., Veprev S.G., Shumny V.K. Cellulose from various parts of soranovskii miscanthus // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. – 2015. – Т. 5, No. 1. – С. 60-68. <https://doi.org/10.1134/S2079059715010049>
- 483 Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V. Chemical composition of five *Miscanthus sinensis* harvests and nitric-acid cellulose therefrom // *Industrial Crops and Products*. – 2017. – Vol. 109. – P. 227–232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.026>.
- 484 Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Nitrocellulose Synthesis from *Miscanthus* Cellulose. *Propellants Explos. Pyrotech*. – 2018. – 43. – P. 96–100. <https://10.1002/prop.201700210>
- 485 Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V., Vasilyeva O.Yu., Zueva G.A., Gusar A.S., & Dorogina O.V. Features of the resource species *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. when introduced in West Siberia // *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*=*Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2019. – 23. – P. 933-940. <https://doi.org/10.18699/VJ19.569>

- 486 Gladchenko M.A., Gaydamaka S.N., Murygina V.P., Varfolomeev S.D. Anaerobic conversion of lignocellulose to materials for biofuel production: volatile fatty acids and ethanol // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2019. – T. 55. – № 7. – C. 756-764. <https://doi.org/10.1134/S0003683819070020>
- 487 Goelzer FDE, Faria-Tischer PCS, Vitorino JC, Sierakowski MR, Tischer CA Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark // *Mat Sci Eng A-Struct.* – 2009. – № 29(2). – P. 546-551. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.013>
- 488 Goh W.N., Rosma A., Kaur B., Fazilah A., Karim A.A., Rajeev B. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose // *International Food Research Journal* . – 2012. – № 19(1). – P. 109-117.
- 489 Goh W.N., Rosma A., Kaur B., Fazilah A., Karim A.A., Rajeev B. Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (kombucha). II. // *International Food Research Journal*. – 2012. – Vol. 19 (1). – P. 153-158.
- 490 Gomes FP, Silva NH, Trovatti E, Serafim LS, Duarte MF, Silvestre AJ, Freire CS Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue // *Biomass Bioenerg.* – 2013. – № 55. – P. 205-211. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.004>
- 491 Gomes N. O., Carrilho E., Machado S. A. S., & Sgobbi L. F. Bacterial cellulose-based electrochemical sensing platform: a smart material for miniaturized biosensors // *Electrochimica Acta*. – 2020. – № 349. – P. 136341. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136341>.
- 492 Gonzalez R.W., T. Treasure, R.B. Phillips, H. Jameel, D. Saloni Economics of cellulosic ethanol production: Green liquor pretreatment for softwood and hardwood, greenfield and repurpose scenarios // *Bioresources*. – 2011. – № 6. – P. 2551-2567.
- 493 Goncalves S.; Rodrigues I.P.; Padrão J.; Silva J.P.; Sencadas V.; Lanceros-Mendez S.; Girão H.; Gama F.M.; Dourado F.; Rodrigues L.R. Acetylated bacterial cellulose coated with urinary bladder matrix as a substrate for retinal pigment epithelium // *Colloids Surf.B-Bioin terfaces* . – 2016. – 139. – P. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.051>
- 494 Gorgieva S., Trček J. Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications // *Nanomaterials*. – 2019. – Vol. 9. – № 10. – P. 1352. <https://doi.org/10.3390/nano9101352>
- 495 Gorgieva S. Bacterial cellulose as a versatile platform for research and development of biomedical materials // *Processes*. – 2020. – Vol. 8. – № 5. – P. 624. <https://doi.org/10.3390/pr8050624>
- 496 Gouvea B., Torres C., Franca A., Oliveira L., Oliveira E. Feasibility of ethanol production from coffee husks // *Biotechnol Lett.* – 2009. – № 31. – P. 1315-1319. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0023-4>
- 497 Greca L. G., Lehtonen J., Tardy B. L., Guo J. & Rojas O. J. Biofabrication of multifunctional nanocellulosic 3D structures: a facile and

customizable route // Mater. Horiz. – 2018. – 5. – P. 408–415.
<https://doi.org/10.1039/C7MH01139C>

498 Gregory D.A., Tripathi L., Fricker A.T.R., Asare E., Orlando I., Raghavendran V., Roy I. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications // Materials Science and Engineering: R: Reports. – 2021. – Vol.145, No. 100623. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100623>

499 Gromet Z., Schramm M., Hestrin S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 4. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells // Biochemical Journal. – 1957. – Vol. 67. – №. 4. – P. 679. <https://doi.org/10.1042/bj0670679>

500 Gromovykh T.I., Feldman N.B., Lutsenko S.V., Vasil'kov A.Yu., Butenko I.E., Sadykova V.S., Demchenko A.G., Lyundup A.V. Creation of composites of bacterial cellulose and silver nanoparticles: evaluation of antimicrobial activity and cytotoxicity // International Journal of Nanotechnology. – 2019. – T. 16. – № 6-10. – C. 408-420.

501 Gromovykh, T.I., Pigaleva, M.A., Gallyamov, M.O., Ivanenko, I.P., Ozerova, K.E., Kharitonova, E.P., Bahman, M., Feldman, N.B., Lutsenko, S.V., & Kiselyova, O.I. Structural organization of bacterial cellulose: The origin of anisotropy and layered structures // Carbohydrate Polymers. – 2020. – 237. – 116140. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116140>

502 Gros M, Cruz-Morato C, Marco-Urrea E, Longre´e P, Singer H, Sarra´ M, Hollender J, Vicent T, Rodriguez-Mozaz S, Barcelo´ D Biodegradation of the X-ray contrast agent iopromide and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin by the white rot fungus *Trametes versicolor* in hospital wastewaters and identification of degradation products // Water Res. – 2014. – № 60. – P. 228-241. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.042>

503 Gümüşkaya E., Usta M., & Kirci H. The effects of various pulping conditions on crystalline structure of cellulose in cotton linters // Polymer degradation and stability. – 2003. – 81(3). – 559-564. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00157-5)

504 Guo X., Cavka A., Jönsson L.J., Hong F. Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production // Microb Cell Fact. – 2013. – № 12. – P. 1-14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-93>

505 Guo X., Chen L., Tang J., Jönsson L.J., Hong F.F. Production of bacterial nanocellulose and enzyme from [AMIM] Cl pretreated waste cotton fabrics: effects of dyes on enzymatic saccharification and nanocellulose production // J Chem Technol Biotechnol. – 2016. – № 91(5). – P. 1413–1421. <https://doi.org/10.1002/jctb.4738>

506 Gusakov A.V., Kondratyeva E.G., Sinitsyn A.P. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities // International Journal of Analytical Chemistry. – 2011. – V. 2011. – P. 1-4.

507 Gutierrez J., Tercjak A., Algar I., Retegi A., Mondragon I. Conductive properties of TiO₂/bacterial cellulose hybrid fibres // Journal of Colloid and

Interface Science. – 2012b. – Vol. 337. – № 1. – P. 88 – 93.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.03.075>

508 Gutierrez E., Burdiles P. A., Quero F., Palma P., Olate-Moya F. & Palza H. 3D Printing of antimicrobial alginate/bacterial-cellulose composite hydrogels by incorporating copper nanostructures // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2019. – № 5(11). – P. 6290-6299.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01048>

509 Ha J.H., Shehzad O., Khan S., Lee S.Y., Park J.W., Khan T., Park J.K. Production of bacterial cellulose by a static cultivation using the waste from beer culture broth // Korean J Chem Eng. – 2008. – № 25. – P. 812–815.

510 Hadar Y. Sources for lignocellulosic raw materials for the production of ethanol / Lignocellulose Conversion, Springer, Berlin Heidelberg, Germany. – 2013. – P. 21-38.

511 Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.-F., Lidén G., Zacchi G. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today // Trends Biotechnol. – 2006. – № 24. – P. 549-556.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>

512 Hainan Yeguo Foods Co., Ltd. Available online at:
<http://www.yeguo.com> (accessed August 20, 2020).

513 Hallac BB, Ragauskas AJ Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. – 2011. – № 5(2). – P. 215–225. <https://doi.org/10.1002/bbb.269>

514 Hamelinck C.N., Van Hooijdonk G., Faaij A.P. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term // Biomass Bioenergy. – 2005. – № 28. – P. 384-410.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.09.002>

515 Hassan E.A., Abdelhady H.M., El-Salam S.S.A., Abdullah S.M. The characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* and *Komagataeibacter saccharovorans* under optimized fermentation conditions // British Microbiology Research Journal. – 2015. – Vol. 9, № 3. – P. 1-13.
<https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/18223>

516 Hastie T., Tibshirani R., Friedman J. The Elements of Statistical Learning: data mining, inference, and prediction. – Springer, New York, 2009. – 745 p.

517 Hayes D.J. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges // Catal Today. – 2009. – 145. – P. 138-151.
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.04.017>

518 He B., Zhu X., Zhao C., et al. Sequential co-immobilization of β -glucosidase and yeast cells on single polymer support for bioethanol production // Science China Chemistry. – 2018. – Vol. 61. – P. 1600–1608.
<https://doi.org/10.1007/s11426-018-9319-1>

519 Helenius G., Backdahl H., Bodin A., Nannmark U., Gatenholm P., Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose // Journal of Biomedical

Materials Research Part A. – 2006. – Vol. 76 A, No. 2. – P. 431-438.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30570>

520 Hesseltine C.W. A millenium of fungi. Food and fermentation // Mycologia. – 1965. – № 57. – P. 148-167.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1965.12018201>

521 Hestrin S., Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // Journal of Biochemistry. –1954. – Vol. 58, N 2. – P. 345-352.
<https://doi.org/10.1042/bj0580345>

522 Hirai A., Tsuji M., Horii F. Culture conditions producing structure entities composed of cellulose I and II in bacterial cellulose // Cellulose. – 1997. – No. 4. – P. 239-245.

523 Hirai A., Tsuji M. & Horii F. TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4 C // Cellulose. – 2002. – № 9(2). – P. 105-113.

524 Hong F, Qiu KY An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacteraceti subsp. xylinus* ATCC 23770 // Carbohyd Polym. – 2008. – № 72(3). – P. 545-549. <https://doi.org/10.1002/jctb.2567>

525 Hong F., Zhu X.Y., Yang G., Yang X.X. Wheat straw acid hydrolysate as a potential cost-effective feedstock for production of bacterial cellulose // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 2011. – № 86(5). – P. 675-680. <https://doi.org/10.1002/jctb.2567>

526 Hong F., Guo X., Zhang S., Han S., Yang G., Jonsson L.J. Bacterial cellulose production from cotton based waste textiles: enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment // Bioresource Technol. – 2012. – № 104. – P. 503-508. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.028>

527 Hornung M., Ludwig M., Gerrard A.M. & Schmauder H.-P. Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Substrate Mass Transfer Influences on the Bioreaction (Part 1) // Engineering in Life Sciences. – 2006 a. – № 6(6). – 537-545.
<https://doi.org/10.1002/elsc.200620162>

528 Hornung M., Ludwig M., Gerrard A.M. & Schmauder, H.-P. Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Product Movement Influences on the Bioreaction (Part 2) // Engineering in Life Sciences. –2006 b. – № 6(6). – P. 546-551.
<https://doi.org/10.1002/elsc.200620163>

529 Hornung M., Ludwig M. & Schmauder H.-P. Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: A Novel Aerosol Bioreactor Working on a Fed Batch Principle (Part 3) // Engineering in Life Sciences. – 2007. – № 7(1). – P. 35-41. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620164>

530 Hosseini H., Teymouri M., Saboor S., Khalili A., Goodarzi V., Poudineh Hajipoor F., et al. Challenge between sequence presences of conductive additives on flexibility, dielectric and supercapacitance behaviors of nanofibrillated

template of bacterial cellulose aerogels // European Polymer Journal. – 2019. – Vol. 115. – P.335–345. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.03.033>

531 Howard R., Abotsi E., Van Rensburg E.J., Howard S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production // Afr J Biotechnol. – 2004. – № 2 . – P. 602-619.

532 Hsieh Y. C., Yano H., Nogi M. & Eichhorn S. J. An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments // Cellulose. – 2008. – № 15(4). – P. 507-513.

533 Hu F., Ragauskas A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry // Bioenergy Research. – 2012. – № 5. – № P. 1043–1066. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9208-0>

534 Hu Y., Catchmark J.M. In vitro biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases // Acta Biomaterialia. – 2011 a. – Vol. 7, No. 7. – P. 2835-2845. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.028>

535 Hu Y., Catchmark J.M. Integration of cellulases into bacterial cellulose: toward bioabsorbable cellulose composites // Journal of Biomedical Materials Research Part B. – 2011 b. – Vol. 97B. – № 1. – P. 114–123. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31792>

536 Hu Y., Catchmark J.M., Vogler E.A. Factors impacting the formation of sphere-like bacterial cellulose particles and their biocompatibility for human osteoblast growth // Biomacromolecules. – 2013. – № 14. – P. 3444–3452. <https://doi.org/10.1021/bm400744a>

537 Huang C., Yang X.Y., Xiong L., Guo H.J., Luo J., Wang B., Zhang H.R., Lin X.Q., Chen X.D. Utilization of Corncob Acid Hydrolysate for Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus* // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2015. – Vol. 175, № 3. – P. 1678-1688. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1407-z>

538 Huang Y., Qin X., Luo X. M., Nong Q., Yang Q., Zhang Z., ... & Feng, J. X. Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulase from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5 // Biomass and Bioenergy. – 2015. – 77. – P.53-63. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.020>

539 Huang C., H.J. Guo, L. Xiong, B. Wang, S.L. Shi, X.F. Chen, X.Q. Lin, C. Wang, J. Luo, X.D. Chen, Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* // Carbohydr. Polym. – 2016. – № 136. – P. 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.043>

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

541 Huang L., Du X., Fan S., Yang G., Shao H., Li D., Cao C., Zhu Y., Zhu M., Zhang Y. // Carbohydr. Polym. – 2019. – № 221. – P. 146–156.

542 Huang L., Du X., Fan S., Yang G., Shao H., Li D., ... & Zhang Y. Bacterial cellulose nanofibers promote stress and fidelity of 3D-printed silk based hydrogel scaffold with hierarchical pores // Carbohydrate polymers. – 2019. – № 221. – P. 146-156. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.080>

543 Huang Q., Niu C.H., Dalai A. K. Production of anhydrous biobutanol using a biosorbent developed from oat hulls // Chemical Engineering Journal. – 2019. – Vol. 356. – P. 830–838. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.09.067>

544 Huang Y., Zhu C., Yang J., Nie Y., Chen C. & Sun D. Recent advances in bacterial cellulose // Cellulose. – 2014. – № 21(1). – P. 1-30. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z>

545 Hugenholtz P., Goebel B. M., Pace N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity // Journal of bacteriology. – 1998. – T. 180. – №. 18. – C. 4765-4774. <https://doi.org/10.1128/JB.180.18.4765-4774.1998>

546 Humbird D., Mohagheghi A., Dowe N., Schell D.J. Economic impact of total solids loading on enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated corn stover // Biotechnol Prog. – 2010. – № 26. – P. 1245-1251. <https://doi.org/10.1002/btpr.441>

547 Hungund B.S., Gupta S.G. Strain improvement of *Gluconacetobacter xylinus* NCIM 2526 for bacterial cellulose production // Afr. J. Biotechnol. – 2010. – 9 (32). – P. 5170-5172.

548 Hussain Z., Sajjad W., Khan T., Wahid F. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review // Cellulose. – 2019. – Vol. 26. – №. 5. – P. 2895-2911. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02307-1>

549 Hwang J.W., Yang Y.K., Hwang J.K., Pyun Y.R., Kim Y.S. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture // Journal Of Bioscience And Bioengineering. – 1999. – № 88. – P. 183-188. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80199-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80199-6)

550 Iguchi M., Yamanaka S., Budhiono A. Bacterial cellulose – a masterpiece of nature's arts // Journal of Materials Science. – 2000. – Vol. 35, No. 2. – P. 261-270. <https://doi.org/10.1023/A:1004775229149>

551 Inagaki and Phillips, 1989 H. Inagaki, G.-O. Phillips Cellulosics utilization-research and rewards in cellulosic Elsevier Science Publishers Ltd., England. – 1989. – P. 175-181.

552 Ince G. Bayramoglu, Karagoz B., Altintas B., Bicak N., Arica M.Y. A method for fabrication of polyaniline coated polymer microspheres and its application for cellulase immobilization // Chem Eng J. – 2012. – № 189. – P. 404-412. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.02.048>

553 Inoue B. S., Streit S., dos Santos Schneider A. L. & Meier M. M. Bioactive bacterial cellulose membrane with prolonged release of chlorhexidine for dental medical application // International journal of biological macromolecules. – 2020. – 148. – P. 1098-1108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.036>

- 554 Ioelovich M., Leykin A., Figorsky O. Study of cellulose paracrystallinity // *BioResourses*. – 2010. – № 5(3). – P. 1393-1407. <https://doi.org/10.15376/biores.5.3.1393-1407>
- 555 Ioelovich M. Study of Enzymatic Hydrolysis of Bacterial Nanocellulose // *American Journal of BioScience*. Special Issue: Chemical Biology. – 2014. – Vol. 2, Issue 6-1. – P. 13-16. <https://doi.org/10.11648/j.ajbio.s.2014020601.13>
- 556 Ioelovich M. Study of kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose materials // *ChemXpress*. – 2015. – Vol. 8. – P. 231–239. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3185.6806>
- 557 Iqbal Y. & Lewandowski I. Inter-annual variation in biomass combustion quality traits over five years in fifteen *Miscanthus* genotypes in south Germany // *Fuel Processing Technology*. – 2014. – № 121. – P. 47-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.01.003>
- 558 Ishida T., Sugano Y., Nakai T., Shoda M. Effects of acetan on production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* // *Biosci Biotechnol Biochem*. – 2002. – № 66. – P. 1677–1681. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1677>
- 559 Isikgor F. H. & Becer C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers // *Polymer Chemistry*. – 2015. – № 6 (25). – P. 4497-4559. <https://doi.org/10.1039/c5py00263j>
- 560 Islam M. U., Ullah M. W., Khan S., Shah N. & Park J. K. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose // *International journal of biological macromolecules*. – 2017. – № 102. – P. 1166-1173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.110>
- 561 Iulianelli A., Palma V., Bagnato D., Ruocco C., Huang Y., Veziroglu, T. N. & Basile A. Obtaining bioethanol and its use in the production of high-quality hydrogen in the process of steam reforming on a Co-Pt catalyst in a Pd-based membrane reactor // *International Scientific Journal Alternative Energy and Ecology*. – 2020. – (1-6). – P. 60-76. <https://doi.org/10.15518/isjaee.2020.01-06.060-076>
- 562 Jagannath A., Kalaiselvan A., Manjunatha S. S., Raju P. S. & Bawa A. S. The effect of pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by *Acetobacter xylinum* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – 24(11). – P. 2593-2599. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9781-8>
- 563 Jahan F., Kumar V., Saxena RK. Distillery effluent as a potential medium for bacterial cellulose production: A biopolymer of great commercial importance // *Bioresource Technol*. – 2017. – № 250. – P. 922-926. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.094>
- 564 Jahn C.E., Selimi D.A., Barak J.D., Charkowski A.O. The *Dickeya dadantii* biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis

operon // Microbiology. – 2011. – № 157(10). – P. 2733–2744.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.0510>

565 Jamal S. H., Roslan N. J., Shah N. A., et al. Preparation and characterization of nitrocellulose from bacterial cellulose for propellant uses // Materials Today: Proceedings. – 2020. – № 29. – P. 185–189.
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.540>

566 Jamal S. H., Jori Roslan N., Ahmad Shah N. A., Mohd Noor S. A., Khim O. K. & Wan Yunus W. M. Z. Conversion of Bacterial Cellulose to Cellulose Nitrate with High Nitrogen Content as Propellant Ingredient. In Solid State Phenomena Trans Tech Publications Ltd. – 2021. – Vol. 317. – P. 305-311.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.317.305>.

567 Jang W. D., Hwang J. H., Kim H. U., Ryu J. Y. & Lee S. Y. Bacterial cellulose as an example product for sustainable production and consumption // Microbial Biotechnology. – 2017. – № 10(5). – P. 1181.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12744>

568 Jarrell J., Cal T., Bennett J.W. The *Kombucha* consortia of yeasts and bacteria // Mycologist. – 2000. – 14. – P. 166-170. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(00\)80034-8](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(00)80034-8)

569 Jayabalan R., Marimuthu S., Sathishkumar M., Swaminathan K. Changes in free-radical scavenging ability of *Kombucha* tea during fermentation // Food Chem. – 2008. – № 109. – P. – 227-234.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.037>

570 Jayabalan R., Chen P.N., Hsieh Y.S., Prabhakaran K., Pitchai P., Marimuthu S., Thangaraj P., Swaminathan K., Yun S.E. Effect of solvent fractions of *Kombucha* tea on viability and invasiveness of cancer cells—characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin // Indian J. Biotechnol. – 2011. – № 10. – P. 75-82.
<http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/10955>

571 Jayabalan R., Malbaša R.V., Lončar E.S., Vitas J.S., Sathishkumar M. A review on *Kombucha* tea – microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus Compr // Rev. Food Sci. Food Saf. – 2014. – 13. – P. 538-550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

572 Ji A., Jia L., Kumar D. & Yoo C. G. Recent advancements in biological conversion of industrial hemp for biofuel and value-added products // Fermentation. – 2021. – № 7(1). – P. 6.
<https://doi.org/10.3390/fermentation7010006>

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

574 Jonas R., Farah L. F. Production and application of microbial cellulose // Polymer degradation and stability. – 1998. – Vol. 59. – №. 1-3. – P. 101-106.
[https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00197-3)

575 Jönsson L.J., Alriksson B., Nilvebrant N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification // *Biotechnol Biofuels*. – 2013. – № 6. – P. 16-26. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>

576 Jönsson L.J., Martín C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects // *Bioresource Technology*. – 2016. – 199. – P. 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>

577 Jordan D.B., Bowman M.J., Braker J.D., Dien B.S., Hector R.E., Lee C.C., Mertens J.A., Wagschal K. Plant cell walls to ethanol // *Biochem J*. – 2012. – 442(2). – P. 241-252. <https://doi.org/10.1042/BJ20111922>

578 Jordan D.B., Bowman M.J., Braker J.D., Dien B.S., Hector R.E., Lee C.C., Mertens J.A., Wagschal K. Plant cell walls to ethanol // *Biochem J*. – 2012. – 442(2). – P. 241-252. <https://doi.org/10.1042/BJ20111922>

579 Jorfi M., & Foster E. J. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications // *Journal Applied Polymer Science*. – 2015. – № 132. – P. 41719/1–41719/19. <https://doi.org/10.1002/app.41719>

580 Jori Roslan N., Jamal S. H., Ong K. K. & Wan Yunus W. M. Z. Preliminary Study on the Effect of Sulphuric Acid to Nitric Acid Mixture Composition, Temperature and Time on Nitrocellulose Synthesis Based Nata de Coco // *In Solid State Phenomena*. – 2021. – Vol. 317. – P. 312-319. Trans Tech Publications Ltd. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.317.312>.

581 Joshi B., Joshi J., Bhattarai T., Sreerama L. Currently Used Microbes and Advantages of Using Genetically Modified Microbes for Ethanol Production // *In: Bioethanol Production from Food Crops* // Elsevier Inc. – 2019. – P. 293–316. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813766-6.00015-1>

582 Jozala A.F., Pértile R.A.N., dos Santos C.A., Bacterial V., Seckler M.M., Gama F.M., Pessoa A. Jr. Cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media de Carvalho Santos-Ebinuma // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – No. 99. – P. 1181-1190. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3>

583 Jozala A. F., de Lencastre-Novae L. C., Lopes A. M., de Carvalho Santos Ebinuma V., Mazzola P. G., Pessoa A., et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2016. – Vol. 100. – №. 5. – P. 2063-2072. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7243-4>

584 Julia A., Andrea C., Cláudio G., Gloria V., Emilia S. and Leonie S. Bacterial cellulose production using industrial fruit residues as substrate to industrial application // *Chem. Eng. Trans.* – 2019. – 74. – P. 1165–1170. <https://doi.org/10.3303/CET1974195>

585 Jung J.Y., Park J.K., Chang H.N. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells // *Enzyme Microb Technol.* – 2005. – 37. – P. 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.019>

- 586 Kadhum H.J., Mahapatra D.M., Murthy G.S. 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 // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 283. – P. 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.060>
- 587 Kallel L., Desseaux V., Hamdi M., Stocker P., Ajandouz E.H. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion // *Food Res.* – 2012. – Int., 49. – P. 226-232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>
- 588 Kallioinen A., Uusitalo J., Pahkala K., Kontturi M., Viikari L., von Weymarn N., et al. Reed canary grass as a feedstock for 2nd generation bioethanol production // *Bioresour Technol.* – 2012. – 123. – P. 669-672. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.023>
- 589 Kamzon M.A., Abderafi S., Bounahmidi T. Promising bioethanol processes for developing a biorefinery in the Moroccan sugar industry // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2016. – Vol. 41(45). – P. 20880–20896. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.035>
- 590 Kang K.E., Jeong J.-S., Kim Y., Min J., Moon S.-K. Development and economic analysis of bioethanol production facilities using lignocellulosic biomass // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. –2019. –Vol. 128, № 4. – P. 475-479. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.04.004>
- 591 Karimi K., Shafiei M., Kumar R. Progress in physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass, in: V.K. Gupta, M.G. Tuohy (Eds.), *Biofuel Technologies*, Springer Science Publisher, Germany. – 2013. – P. 53–96.
- 592 Karimi K. & Taherzadeh M. J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity // *Bioresource technology*. – 2016. – № 200. – P. 1008-1018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022>
- 593 Karpenko D.V., Gernet M.V. Effect of nanopreparations on development of the populations of *Saccharomyces* brewers yeasts // *Microbiology (Mikrobiologiya)*. – 2017. – Vol. 86, № 5. – C. 596-601. <https://doi.org/10.1134/S0026261717050113>
- 594 Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pretreatments of Non-Woody Cellulosic Feedstocks for Bacterial Cellulose Synthesis // *Polymers*. – 2019. – 11(10). – P. 1645. <http://dx.doi.org/10.3390/polym11101645>
- 595 Kim G. China Biofuels Annual 2018; Global Agricultural Information Network (GAIN) Report Number: CH18041; US Department of Agriculture (USDA) Foreign Agricultural Service: Washington, DC, USA, 2018.
- 596 Kim J.-H., Block D.E., Mills D.A. Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2010. – № 88. – P. 1077-1085. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2839-1>

- 597 Kim J. S., Lee Y. Y. & Kim T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass // *Bioresource technology*. – 2016. – 199. – P. 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- 598 Kim J., Tremaine M., Grass J. A., et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* improves co-conversion of lignocellulose-derived sugars // *Biotechnology Journal*. – 2019. – Vol 14. – № 1800441. <https://doi.org/10.1002/biot.201800441>
- 599 Kim M., Day D.F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills // *J Ind Microbiol Biotechnol*. – 2011. – № 38. – P. 803-807. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0812-8>
- 600 Kim S., Dale B.E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues // *Biomass Bioenergy*. – 2004. – № 26. – P. 361-375. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.002>
- 601 Kim S.R., Ha S.-J., Wei N., Oh E.J., Jin Y.-S. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol // *Trends Biotechnol*. – 2012. – № 30. – P. 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.005>
- 602 Kim T.H. Pretreatment of lignocellulosic biomass, in: S.T. Yang, H.A. El-Enshasy, N. Thongchul, Y. Martin (Eds.) / *Bioprocessing Technologies in Integrated Biorefinery for Production of Biofuels, Biochemicals, and Biopolymers from Biomass*, Wiley, New York. – 2013. – P. 91–109.
- 603 Kim S., Li H., Oh I., Kee C., Kim M. Effect of viscosity inducing factors on oxygen transfer in production culture of bacterial cellulose // *Korean Journal of Chemical Engineering*. – 2012. – Vol. 29, No. 6. – P. 792-797. <https://doi.org/10.1007/s11814-011-0245-8>
- 604 Kim Y.J., Kim J.N., Wee Y.J., Park D.H., Ryu H.W., Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter sp.* RKY5 in a rotary biofilm contactor// *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2007. – P. 529–537. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9077-8>
- 605 Keshav P. K., Shaik N., Koti S., Linga V. R. Bioconversion of alkali delignified cotton stalk using two-stage dilute acid hydrolysis and fermentation of detoxified hydrolysate into ethanol // *Industrial Crops and Products*. – 2016. – Vol. 91. – P. 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.031>
- 606 Keshk S., Sameshima K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production // *African Journal of Biotechnology*. – 2005. – Vol. 4, No. 6 – P. 478-482. <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3087>
- 607 Keshk S.M.A.S., Sameshima K. Influence of liginosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture // *Enzym. Microb. Technol.* –2006. – № 40. – P. 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.037>
- 608 Keshk S., Razek T.M.A., Sameshima K. Bacterial cellulose production from beet molasses // *African Journal of Biotechnology*. – 2006. – No. 5 (17). – P. 1519-1523.

- 609 Keshk SMAS Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications // Journal of Bioprocessing & Biotechniques. – 2014. – № 4. – P. 150-160. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000150>
- 610 Khairul A.Z., Norhayati P., Ida I.M. Monitoring the Effect of pH on Bacterial Cellulose Production and *Acetobacter xylinum* 0416 Growth in a Rotary Discs Reactor // Arabian Journal for Science and Engineering. – 2015. – Vol. 40, No. 7. – P. 1881–1885. <https://doi.org/10.1007/s13369-015-1712-z>
- 611 Khan M.I., Shin J.H., Kim J.D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products // Microbial Cell Factories. – 2018. – Vol. 17, № 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- 612 Khan H., Kadam A., & Dutt D. Studies on bacterial cellulose produced by a novel strain of *Lactobacillus* genus // Carbohydrate Polymers. – 2020. – № 229. – 115513. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115513>
- 613 Khandelwal M., Windle A.H. & Hessler N. *In situ* tunability of bacteria produced cellulose by additives in the culture media // Journal of Materials Science. – 2016. – № 51. – P. 4839-4844. <https://doi.org/10.1007/s10853-016-9783-0>
- 614 Khokhlachev N.S., Kalenov S.V., Zanina O.S., Tyupa D.V., Baurina M.M., Kuznetsov A.Ye. The role of stress agents as operating factors in formation and functioning of granular aerobic activated sludge at model domestic wastewater treatment // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2014. – 37(9). – P. 1771-1779. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1149-x>
- 615 Khol'kin Yu.I. Tekhnologiya Gidroliznykh Proizvodstv (Technology of Wood-Hydrolysis Industries), Lesnaya Promyshlennost (Forest Industry Press), Moscow, 1989. – 496 p.
- 616 Khorasani A.C.; Shojaosadati S.A. Bacterial nanocellulose-pectin bionanocomposites as prebiotics against drying and gastrointestinal condition // Int. J. Biol. Macromol. – 2016. – № 83. – P. 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.041>
- 617 Kimura S., Chen H. P., Saxena I. M., Brown R. M., Itoh T. Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum* // Journal of Bacteriology. – 2001. – Vol. 183. – №. 19. – P. 5668-5674. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5668-5674.2001>
- 618 Kiziltas E.E., Kiziltas A., Gardner D.J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars // Carbohydr Polym. – 2015. – № 124. – P. 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.036>
- 619 Klemm D., Schumann D., Udhardt U. & Marsch S. Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery // Progress in polymer science. – 2001. – 26(9). – P. 1561-1603. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00021-1)
- 620 Klemm D., Heublein B., Fink H. P. & Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material // Angewandte chemie international

- edition. – 2005. – № 44(22). – P. 3358-3393.
<https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- 621 Klemm D., Schumann D., Kramer F., Heßler N., Hornung M., Schmauder H. P. & Marsch S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application // Polysaccharides II. – 2006. – P. 49-96.
https://doi.org/10.1007/12_097
- 622 Klemm D., Kramer F., Moritz S., Lindström T., Ankerfors M., Gray D. & Dorris A. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2011. – № 50 (24). – P. 5438-5466.
<https://doi.org/10.1002/anie.201001273>
- 623 Klemm D., Cranston E.D., Fischer D., Gama M., Kedzior S.A., Kralisch D., Rauchfuss F. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state // *Materials Today*. – 2018. – 21(7). – P. 720-748. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2018.02.001>
- 624 Klemm D., Petzold-Welcke K., Kramer F., Richter T., Raddatz V., Fried W., Fischer. Biotech nanocellulose: A review on progress in product design and today's state of technical and medical applications // *Carbohydrate Polymers*. – 2020. – Vol. 254. – P. 117313. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117313>
- 625 Kohli K., Prajapati R., Sharma B.K. Bio-Based Chemicals from Renewable Biomass for Integrated Biorefineries // *Energies*. – 2019. – Vol. 12(2). – № 233. <https://doi.org/10.3390/en12020233>
- 626 Kongruang S. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2008. – № 148. – P. 45–256. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8119-6>
- 627 Konovalov I.N, Semenova M.N., Fiziologii K. «Cajnogo Griba». *Bot Zurnal (Moscow)*. – 1955. – № 40. – P. 567–570.
- 628 Konovalov I.N., Litvinov M.A., Zakman L.M. Izmenenie prirody I fiziologiceskih osobennostej cajnogo griba (*Medusomyces gisevii* Lindau) v zavisnosti ot uslovij kul'tivirovanija. *Bot Zurnal (Moscow)*. – 1959. – № 44. – P. 346–349.
- 629 Kontturi K. S., Biegaj K., Mautner A., Woodward R. T., Wilson B. P., Johansson, L. S., ... & Kontturi E. Noncovalent surface modification of cellulose nanopapers by adsorption of polymers from aprotic solvents // *Langmuir*. – 2017. – T. 33. – №. 23. – C. 5707-5712. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01236>
- 630 Koppram R., Tomás-Pejó E., Xiros C., Olsson L. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives // *Trends Biotechnol.* – 2014. – № 32. – P. 46-53.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.10.003>
- 631 Korchagina A.A., Budaeva V.V., Kukhlenko A.A. Esterification of oat-hull cellulose // *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. – 2019. – Vol. 68. – No. 6. – P. 1282–1288. (Published in Russian in *Izvestiya Akademii Nauk. Seriya Khimicheskaya*, No. 6, pp. 1282–1288, June, 2019).
<https://doi.org/10.1007/s11172-019-2554-8>

632 Korchagina A.A., Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Zolotukhin V.N., Bychin N.V., Sakovich G.V. *Miscanthus × giganteus* var. KAMIS as a new feedstock for cellulose nitrates // J. Sib. Fed. Univ. Chem. – 2020. – Vol. 13(4). – P. 565–577. <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0206>

633 Kose R. et al. «Nanocellulose» as a single nanofiber prepared from pellicle secreted by *Gluconacetobacter xylinus* using aqueous counter collision // Biomacromolecules. – 2011. – Vol. 12. – №. 3. – P. 716-720. <https://doi.org/10.1021/bm1013469>

634 Kouda T., Yano H., Yoshinaga F., Kaminoyama M., Kamiwano M. Characterization of non-Newtonian behavior in the mixing of bacterial cellulose in a bioreactor // J. Ferment Bioeng. – 1996. – № 82. – P. 382-386. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89155-0](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89155-0)

635 Kouda T., Naritomi T., Yano H., Yoshinaga F. Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 1997. – No. 84. – P. 124-137. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82540-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82540-8)

636 Kouda T., Yano H., Yoshinaga F. Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1997. – № 83 (4). – P. 371-376. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)80144-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)80144-4)

637 Kouda T., Naritomi H., Yano F. Yoshinaga, 2000. Patent of USA, US6017740A. Process for the production of bacterial cellulose.

638 Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I.M., Marchant R., Koutinas A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review // Food Microbiol. – 2004. – № 21. – P. 377-397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>

639 Kowalska-Ludwicka K., Cala J., Grobelski B., Sygut D., Jesionek-Kupnicka D., Kolodziejczyk M., et al. Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves // Archives of Medical Science. – 2013. – № 9. – P. 527–534. <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.33433>

640 Kozaki M., Koizumi A., Kitahara K. Microorganisms of zoogloal mats formed in tea decoction // J Food Hyg Soc (Jpn). – 1972. – № 13. – P. 89–96. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.13.89>

641 Krasteva P. V., Bernal-Bayard J., Travier L., Martin F. A., Kaminski P. A., Karimova G., et al. Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system // Nat. Commun. – 2017. – Vol. 8. – P. 65. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01523-2>

642 Kreith F., Krumdieck S. Principles of sustainable energy systems / CRC Press, Florida, USA. – 2013.

643 Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jeziarska A., Goncalves-Miskiewicz M., Turkiewicz M., Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2002. – № 29(4). – P. 189-195. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303>.

644 Kucinska-Lipka J., Gubanska I. & Janik H. Bacterial cellulose in the field of wound healing and regenerative medicine of skin: Recent trends and future perspectives // Polymer Bulletin. – 2015. – T. 72, №. 9. – C. 2399-2419. <https://doi.org/110.5114/aoms.2013.33433>

645 Kuhad R.C., Singh A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects // Crit Rev Biotechnol. – 1993. – № 13. – P. 151-172. <https://doi.org/10.3109/07388559309040630>

646 Kulicke W.M., Kull A.H., Kull W., Thielking H., Engelhardt J., Pannek J.B. Characterization of aqueous carboxymethylcellulose solution in terms of their molecular structure and its influence on rheological behavior // Polymer. – 1996. – Vol. 37. – P. 2723-2731. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(96\)87634-8](https://doi.org/10.1016/0032-3861(96)87634-8)

647 Kumar A., Singh L., Ghosh S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipites* // Bioresour Technol. – 2009. – № 100. – P. 3293-3297. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.023>

648 Kumar G., Bakonyi P., Periyasamy S., Kim S., Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K. Lignocellulose biohydrogen: practical challenges and recent progress // Renew Sustain Energy Rev. – 2015. – № 44. – P. 728-737. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.042>

649 Kumar R., Tabatabaei M., Karimi K., Sárvári Horváth I. Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol – A review // Biofuel Res. J. 2016. – № 9. – P. 347–356. <https://doi.org/10.18331/BRJ2016.3.1.4>

650 Kumar S.R., Firdaus J. – 2014. Patent of India, № 2014080184. Novel isolated bacterial strain of *Gluconacetobacter oboediens* and an optimized economic process for microbial cellulose production therefrom. **Нет дои**

651 Kuo C.H., Huang C.Y., Shieh C.J., Wang HMD, Tseng C.Y. Hydrolysis of orange peel with cellulase and pectinase to produce bacterial cellulose using *Gluconacetobacter xylinus* // Waste Biomass Valorization. – 2017. – № 10. – P. 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0034-7>

652 Kurosumi A., Sasaki C., Yamashita Y., Nakamura Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693 // Carbohydr Polym. – 2009. – № 76(2). – P. 333-335. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.009>

653 Kurschner K., Hoffer A. Cellulose and cellulose derivative // Fresenius J Anal Chem. – 1993. – № 92(3). – P. 145-154.

654 Kusano Sakko Inc. – 2020. Available online at: <https://www.kusanosk.co.jp/lab/2016> (accessed August 21, 2021).

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

656 Kutysenko V.P., Yurkevich D.I. Influence of heavy water on the metabolism of a symbiotic organism // *Biophysics*. – 2003. – V. 48, № 4. – P. 648-656.

657 Kuure-Kinsey M., Weber D., Bungay H.-R., Plawsky J.-L., Bequette B.-Y. June 8-10, Portland, ThC13.5 Modeling and Predictive Control of a Rotating Disk Bioreactor. American Control Conference. – 2005. – P. 3259-3264.

658 Lamichhane G., Acharya A., Poudel D. K., Aryal B., Gyawali N., Niraula P., ... & Parajuli N. Recent advances in bioethanol production from Lignocellulosic biomass // *International Journal of Green Energy*. – 2021. – № 18(7). – P. 731-744. <https://doi.org/10.1080/15435075.2021.1880910>

659 Laromaine A., et al. Free-standing three-dimensional hollow bacterial cellulose structures with controlled geometry via patterned superhydrophobic-hydrophilic surfaces // *Soft Matter*. – 2018. – № 14. – P. 3955–3962.

660 Larsen J., Østergaard M., Petersen L., Thirup H., Wen Li F. Krogh Iversen The IBUS process–lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality // *Chem Eng Technol*. – 2008. – № 31. – P. 765-772. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800048>

661 Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N.-O., Jönsson L.J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce // *Appl Biochem Biotechnol*. – 1999. – № 77. – P. 91-103.

662 Lawford H.G., Rousseau J.D., Tolan J.S. Comparative ethanol productivities of different *Zymomonas* recombinants fermenting oat hull // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2001. – Vol. 91. – P. 133–146. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:133>

663 Lay C.-H., Sen B., Chen C.-C., Lin C.-Y. Continuous anaerobic hydrogen and methane production using water hyacinth feedstock // *Arab J Sci Eng*. – 2016. – P. 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13369-016-2035-4>

664 Lee K. Y., Buldum G., Mantalaris A. & Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites // *Macromolecular Bioscience*. – 2014. – No 6. – P. 10-32. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300298>

665 Lee S. Biocouture—launch. <https://www.launch.org/innovators/suzanne-lee/>. Accessed 17 Jan 2021.

666 Lewandowski J.M., Scurlock E., Lindvall M. Christou The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe // *Biomass Bioenergy*. – 2003. – № 25. – P. 335-361. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(03\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(03)00030-8)

667 Li H., Kim S.-J., Lee Y.-W., Kee C., Oh I. Determination of the stoichiometry and critical oxygen tension in the production culture of bacterial cellulose using saccharified food wastes // *Korean Journal of Chemical Engineering*. – 2011. – Vol. 28, No. 11. – P. 2306-2311. <https://doi.org/10.1007/s11814-011-0111-8>

- 668 Li S., Zhang X., Andresen J.M. Production of fermentable sugars from enzymatic hydrolysis of pretreated municipal solid waste after autoclave process // *Fuel*. – 2012. – № 92. – P. 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.07.012>
- 669 Li W., Zhang S., Zhang T., Shen Y., Han L., Peng Z., Xie Z., Zhong C., Jia S. Bacterial cellulose production from ethylenediamine pretreated *Caragana korshinskii* // *Kom. Ind. Crop. Prod.* – 2021. – P. 164. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113340>
- 670 Li Y., Tian C., Tian H., Zhang J., He X., Ping W. & Lei H. Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2012. – № 96(6). – P. 1479-1487. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4242-6>
- 671 Li Y., Tian J., Tian H., Chen X., Ping W., Tian C., et al. Mutationbased selection and analysis of *Komagataeibacter hansenii* HDM1-3 for improvement in bacterial cellulose production // *J. Appl. Microbiol.* – 2016. – № 121. – P. 1323–1334. <https://doi.org/10.1111/jam.13244>
- 672 Li Z., Wang L., Hua J., Jia S., Zhang J., Liu H. Production of nanobacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum* // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – No. 120. – P. 115-119. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.061>
- 673 Lieth H.: Primary production of the major vegetation units of the world, pp. 203-215, in: Lieth, H. and Whittaker, R. H. (Eds.), *Primary production of the biosphere*. – Springer-Verlag, Berlin, 1975. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80913-2_10
- 674 Liiskina E., Revin V., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M. Cost-effective production of bacterial cellulose using food industry by-products // *Journal of Biotechnology*. – 2015. – Vol. 208. – P. S117. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.369>
- 675 Limayem A., Ricke S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects // *Prog Energy Combust Sci.* – 2012. – 38. – P. 449-467. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
- 676 Lin D., Liu Z., Shen R., Chen S. & Yang X. Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects // *International journal of biological macromolecules*. – 2020. – № 158. – P. 1007-1019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.230>
- 677 Lin S.-P., Calvar I.L., Catchmark J.M., Liu J.-R., Demirci A., Cheng K.-C. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose // *Cellulose*. – 2013. – No 20. – P. 2191-2219 <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9994-3>
- 678 Lin S-P, Hsieh S-C, Chen K-I, Demirci A, Cheng K-C Semi-continuous bacterial cellulose production in a rotatingdisk bioreactor and its materials properties analysis // *Cellulose*. – 2014. – 21(1). – P. 835-844. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0136-8>

- 679 Liu C.G., Xiao Y., Xia X.X. Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions // *Biotechnology Advances*. – 2019. – Vol. 37, № 3. – P. 491–504. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.002>
- 680 Liu C.H., Hsu W.H., Lee F.L., Liao C.C. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation // *Food Microbiol.* – 1996. – № 13. – P. 407-415. <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0047>
- 681 Liu W., Du H. S., Zhang M. M., Liu K., Liu H. Y., Xie H. X., et al. Bacterial cellulose-based composite scaffolds for biomedical applications: a review // *ACS Sustain.Chem. Eng.* – 2020. – Vol. 8. – P. 7536–7562. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00125>
- 682 Liu Y., Xu J., Zhang Y., et al. Sequential bioethanol and biogas production from sugarcane bagasse based on high solids fed-batch SSF // *Energy*. – 2015. – Vol. 90. – P. 1199–1205. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.06.066>
- 683 Liu Z., Wan X., Wang Q., Tian D., Hu J., Huang M., ... & Zeng Y. Performances of a multi-product strategy for bioethanol, lignin, and ultra-high surface area carbon from lignocellulose by PHP (phosphoric acid plus hydrogen peroxide) pretreatment platform // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2021. – P. 111503. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111503>
- 684 Lomakin S.M., Khvatov A.V., Sakharov P.A., Koverzanova E.V., Usachev S.V., Shilkina N.G., Varfolomeev S.D. Study of the mechanism of fire-retardant action of bio flame retardant based on oxidized compounds of cellulose-containing biomass // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2020. T. 14. № 6. C. 1028-1035. <https://doi.org/10.1134/S199079312006010X>
- 685 Lomovskiy I., Bychkov A., Lomovsky O., Skripkina T. Mechanochemical and size reduction machines for biorefining // *Molecules*. – 2020. – T. 25, № 22. – P. 5345 <https://doi.org/10.3390/molecules25225345>
- 686 Lomovskiy I., Podgorbunskikh E., Lomovsky O. Effect of ultra-fine grinding on the structure of plant raw materials and the kinetics of melanin extraction // *Processes*. – 2021. – T. 9, № 12. – P. 2236. <https://doi.org/10.3390/pr9122236>
- 687 Loncar E.S., Petrovic S.E., Malbasa R.V., Verac R.M. Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus *Food Nahrung*. – 2000. – № 44. – P. 138-139. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(20000301\)44:2<138::AID-FOOD138>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(20000301)44:2<138::AID-FOOD138>3.0.CO;2-#)
- 688 Lopes M. L., Paulillo S. C. D. L., Godoy A., Cherubin R. A., Lorenzi M. S., Giometti F. H. C., ... & Amorim H. V. D. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry // *Brazilian journal of microbiology*. – 2016. – P. 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>
- 689 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. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.024>

690 Lu H.-M., X.-L. Jiang Structure and properties of bacterial cellulose produced using a trickling bed reactor // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2014. – 172. – P. 3844-3861. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0795-4>

691 Ludueña L., Fasce D., Alvarez V.A., Stefani P.M. Nanocellulose from rice husk following alkaline treatment to remove silica // *Bioresources*. – 2011. – № 6. – P. 1440-1453.

692 Lugovoy Y., Chalov K., Stepacheva A., Kosivtsov Y., Sidorov A., Sulman M. Pyrolytical processing of flax shive and it derivatives // *Chemical Engineering Transactions*. – 2021. – T. 86. –P. 79-84. <https://doi.org/10.3303/CET2186014>

693 H., Klein I. M., Jiang Y., Zhu H., Liu B., Kenttämaa H. I. & Abu-Omar M. M. Total utilization of Miscanthus biomass, lignin and carbohydrates, using earth abundant nickel catalyst // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2016. – № 4(4). – P. 2316-2322. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01776>

694 Luo M.T., Zhao C., Huang C., Chen X.F., Huang Q.L., Qi G.X., Chen X.D. Efficient using durian shell hydrolysate as low-cost substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* // *Indian J Med Microbiol*. – 2017. – № 57 (4). – P. 393-399. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0681-1>

695 Lupașcu R. E., Ghica M. V., Dinu-Pîrvu C. E., Popa L., Velescu B. Ș. & Arsene A. L. An Overview Regarding Microbial Aspects of Production and Applications of Bacterial Cellulose // *Materials*. – 2022. – № 15(2). – P. 676. <https://doi.org/10.3390/ma15020676>

696 Lutsenko S.V., Gromovykh T.I., Feldman N.B., Phan M.H., Le Thi T.N. Films of bacterial cellulose with lipid nanoparticles of sanguinarine as a basis for creating antimicrobial coating materials // *International Journal of Nanotechnology*. – 2019. – T. 16. – № 6-10. – C. 436-446.

697 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).

698 Lv P., Zhou H., Mensah A., Feng Q., Wang D., Hu X. ... & Wei Q. A highly flexible self-powered biosensor for glucose detection by epitaxial deposition of gold nanoparticles on conductive bacterial cellulose // *Chemical Engineering Journal*. – 2018. – № 351. – P. 177-188. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.06.098>.

699 Makarov I.S., Golova L.K., Vinogradov M.I., Levin I.S., Kulichikhin V.G., Gromovykh T.I., Arkharova N.A. Cellulose fibers from solutions of bacterial cellulose in n-methylmorpholine n-oxide // *Fibre Chemistry*. – 2019. – T. 51. – № 3. – C. 175-181. <https://doi.org/10.1007/s10692-019-10069-6>

700 Makarov I.S., Golova L.K., Vinogradov M.I., Levin I.S., Kulichikhin V.G., Gromovykh T.I., Arkharova N.A. Cellulose fibers from solutions of bacterial cellulose in n-methylmorpholine n-oxide // *Fibre Chemistry*. – 2019. – T. 51. – № 3. C. 175-181. <https://doi.org/10.1007/s10692-019-10069-6>

701 Makarov I.S., Vinogradov M.I., Zatonskih P.V., Kulichikhin V.G., Shambilova G.K., Gromovykh T.I., Lutsenko S.V., Arkharova N.A. Films of bacterial cellulose prepared from solutions in n-methylmorpholine-n-oxide:

structure and properties // Processes. – 2020. – T. 8, № 2. – C. 171.
<https://doi.org/10.3390/pr8020171>

702 Makarova E.I. Results of Miscanthus cellulose fermentation in the acetate buffer and in water medium // Chemistry for Sustainable Development. – 2013. – № 2. – P. 209-214.

703 Makarova E.I., Budaeva V.V., Kukhlenko A.A., Orlov S.E. Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis of miscanthus and oat hulls // 3Biotech. – 2017. – № 7. – P. 317. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0964-6>

704 Malbaša R.V., Lončar E.S., Vitas J.S., Čanadanović-Brunet J.M. Influence of starter cultures on the anti-oxidant activity of Kombucha beverage // Food Chem. – 2011. – № 127. – P. 1727-1731.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>

705 Mankar A. R., Pandey A., Modak A. & Pant K. K. Pre-treatment of Lignocellulosic Biomass: A Review on Recent Advances // Bioresource Technology. – 2021. – 125235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125235>

706 Mariani V. et al. Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction // The Journal of Immunology. – 2007. – T. 178, №. 12. – C. 7623-7631.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7623>

707 Marsh A.J., O'Sullivan O., Hill C., Ross R.P., Cotter P.D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal Compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples // Food Microbiol. – 2014. – № 38. – P. 171-178.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>

708 Martins D., Estevinho B., Rocha F., Dourado F., Gama M. A dry and fully dispersible bacterial cellulose formulation as a stabilizer for oil-in-water emulsions // Carbohydrate Polymers. – 2020. – № 230. – P. 115657.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115657>

709 Marzioletti T., Valenzuela-Olarte M.B., Sievers C., Hoskins T.J.C., Agrawal P.K., Jones Ch.W. Dilute acid hydrolysis of loblolly pine: a comprehensive approach // Ind. Eng. Chem. Res. – 2008. – № 47. – P. 7131–7140.
<https://doi.org/10.1021/ie800455f>

710 Masaoka S., Ohe T., Sakota N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum* // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1993. – Vol. 7, No. 1 – P. 18-22. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90171-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90171-4)

711 Maslova O., Stepanov N., Senko O. & Efremenko E. Production of various organic acids from different renewable sources by immobilized cells in the regimes of separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SFF) // Bioresource technology. – 2019. – № 272. – P. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.143>

712 Matsuoka M., Tsuchida T., Matsushita K., Adachi O., Yoshinaga F. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum subsp. SuCrofermentans* // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 1996. – Vol. 60, No. 4. – P. 575-579. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.575>

713 Mayo B., Rachid C.T.C.C., Alegría A., Leite A.M.O., Peixoto R.S., Delgado S. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology // *Curr. Genet.* – 2014. – № 15. – P. 293-309.

714 Mbituyimana B., Liu L., Ye W., Boni B. O. O., Zhang K., Chen J Thomas S., Revin V. V., Shi Z., Yang G. Bacterial cellulose-based composites for biomedical and cosmetic applications: Research progress and existing products // *Carbohydrate Polymers.* – 2021. – № 273. – 118565. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118565>.

715 McKendry P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass // *Bioresour Technol.* – 2002. – № 83. – P. 37-46. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00118-3)

716 McKenna B.A., Mikkelsen D., Wehr J.B., Gidley M.J., Menzies N.W. Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524 // *Cellulose.* – 2009. – № 16(6). – P. 1047-1055 <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9340-y>

717 McMillan J.D., Jennings E.W., Mohagheghi A., Zuccarello M. Comparative performance of precommercial cellulases hydrolyzing pretreated corn stover // *Biotechnol. Biofuels.* – 2011. – № 4. – P. 29-46. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-29>

718 Meftahi A., Khajavi R., Rashidi A., Sattari M., Yazdanshenas M.E., Torabi M. The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose // *Cellulose.* – 2010. – No. 17. – P. 199-204. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9377-y>

719 Mendes P.N., Rahal S.C., Pereira-Junior O.C., Fabris V.E., Lenharo S.L., de Lima-Neto J.F., da Cruz Landim-Alvarenga F. *In vivo* and *in vitro* evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair // *Acta Veterinaria Scandinavica.* – 2009. – No. 51. – P. 12. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-12>

720 Mensah A., Chen Y., Christopher N. & Wei Q. Membrane Technological Pathways and Inherent Structure of Bacterial Cellulose Composites for Drug Delivery // *Bioengineering.* – 2022. – № 9(1). – P. 3. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9010003>

721 Mesa L., González E., Romero I., et al. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse // *Chemical Engineering Journal.* – 2011. – Vol. 175. – P. 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.092>

722 Mikkelsen D., Flanagan B.M., Dykes G.A., Gidley M.J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524 // *Journal of Applied Microbiology.* – 2009. – Vol. 107, No. 2. – P. 576-583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x>

723 Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Anal Chem.* – 1959. – Vol. 31(3). – P. 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

724 Mishra A., Ghosh S. Bioethanol production from various lignocellulosic feedstocks by a novel «fractional hydrolysis» technique with

different inorganic acids and co-culture fermentation // Fuel. – 2019. – Vol. 236. – P. 544–553. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.09.024>

725 Modenbach A.A., Nokes S.E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings—a review // Biomass Bioenergy. – 2013. – № 56. – P. 526–544. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.031>

726 Mohammadkazemia F., Azinb M., Ashoric A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media // Carbohydr Polym. – 2015. – № 117. – P. 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.008>

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

728 Mohammadkazemi F., Doosthoseini K., Azin M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* (PTCC 1734) // Cellulose chemistry and technology. – 2015. – Vol. 49, № 5-6. – P. 455–462.

729 Mohammed Y. A., Raun W., Kakani G., Zhang H., Taylor R., Desta K. G., ... & Reinert M. Nutrient sources and harvesting frequency on quality biomass production of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for biofuel // Biomass and Bioenergy. – 2015. – № 81. – P. 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.06.027>

730 Mohite B.V., Koli S.H., Patil S.V. Bacterial Cellulose-Based Hydrogels: Synthesis, Properties, and Applications. In: Mondal M. (eds) Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels / Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series. Springer, Cham. – 2019. – P. 1255–1276. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3_2

731 Molina-Ramírez C., Castro C., Zuluaga R., Gañán P. Physical Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter medellinensis* Using Food Supply Chain Waste and Agricultural By-Products as Alternative Low-Cost Feedstocks // J. Polym Environ. – 2018. – № 26(2). – P. 830–837. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-0993-6>

732 Molina-Ramírez C., Cañas-Gutiérrez A., Castro C., Zuluaga R. & Gañán P. Effect of production process scale-up on the characteristics and properties of bacterial nanocellulose obtained from overripe Banana culture medium // Carbohydrate Polymers. – 2020. – № 240. – P. 116341. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116341>

733 Moniri M., Moghaddam A.B., Azizi S., Rahim R.A., Ariff A.B., Saad W.Z., Navaderi M., & Mohamad R. Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering // Nanomaterials. – 2017. – № 7. – P. 257. <https://doi.org/10.3390/nano7090257>

734 Mood S. H., Golfeshan A. H., Tabatabaei M., Jouzani G. S., Najafi G. H., Gholami M. & Ardjmand M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment // Renewable and Sustainable

- Energy Reviews. – 2013. – № 27. – P. 77-93.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- 735 Moon R.J., Martini A., Nairn J., Youngblood J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites // Chem. Soc. Rev. – 2011. – V. 40. – P. 3941-3994. <https://doi.org/10.1039/c0cs00108b>
- 736 Moon S.H., Park J.M., Chun H.Y., Kim S.J. Comparisons of physical properties of bacterial celluloses produced in different culture conditions using saccharified food wastes // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2006. – No. 11. – P. 26-31. <https://doi.org/10.1007/BF02931864>
- 737 Moosavi-Nasab M., Yousefi A.R. Investigation of physicochemical properties of the bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* from date syrup // World Academy of Science, Engineering and Technology. – 2010. – Vol. 4, No. 8. – P. 613-618.
- 738 Moosavi-Nasab M., Yousefi A.R., Askari H., Bakhtiyari M. Fermentative Production and Characterization of Carboxymethyl Bacterial Cellulose Using Date Syrup // World Academy of Science, Engineering and Technology. – 2010. – Vol. 4, No. 8. – P. 635-639.
- 739 Moradi M., Tajik H., Almasi H., Forough M., Ezati P. A novel pH-sensing indicator based on bacterial cellulose nanofibers and black carrot anthocyanins for monitoring fish freshness // Carbohydrate Polymers. – 2019. – Vol. 222. – P.115030. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115030>
- 740 Morgan J.L., Strumillo J., Zimmer J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation // Nature. – 2013. – № 493 (7431). – P. 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature117>
- 741 Moreno, A. D., Ibarra, D., Alvira, P., Tomás-Pejó, E., & Ballesteros, M. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production // Critical Reviews in Biotechnology. – 2015. – № 35(3). – P. 342-354. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.878896>
- 742 Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y., Holtzapple M., et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass // Bioresour Technol. – 2005. – № 96. – P. 673-686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- 743 Moyer C.L., Dobbs F.C., Karl D.M. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi seamount, Hawaii // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – 60. – P. 871-879. <https://doi.org/10.1128/aem.60.3.871-879.1994>
- 744 Müller A. et al. Bacterial nanocellulose with a shape-memory effect as potential drug delivery system // Rsc Advances. – 2014. – Vol. 4, №. 100. – P. 57173-57184. <https://doi.org/10.1039/C4RA09898F>
- 745 Murnen H.K., Balan V., Sh P.S. Chundawat Optimization of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus x*

giganteus to fermentable sugars // Biotechnology Progress. – 2007. – № 23. – P. 846–850. <https://doi.org/10.1021/bp070098m>

746 Mussatto S.I., Robert I.C. Alternatives for detoxification of diluted acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review // Bioresour Technol. – 2004. – 93(1). – P. 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.005>

747 Mussatto S.I., Dragone G., Guimaraes P.M.R., Silva J.P.A., Carneiro L.M., Roberto I.C., Vicente A., Domingues L., Teixeira J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production // Biotechnol Adv. – 2010. – № 28(6). – P. 817-830. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>

748 Najafpour G., Younesi H., Ismail K.S.K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae* // Bioresour Technol. – 2004. – № 92. – P. 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.09.009>

749 Nakai T., Sugano Y., Shoda M., Sakakibara H., Oiwa K., Tuzi S., Imai T., Sugiyama J., Takeuchi M., Yamauchi D. Formation of highly twisted ribbons in a carboxymethylcellulase gene-disrupted strain of a cellulose-producing bacterium // J Bacteriol. – 2013. – № 195. – P. 958–964. <https://doi.org/10.1128/JB.01473-12>

750 Nanollose Ltd. Available online at: <https://nanollose.com> (accessed August 20, 2020).

751 Naoyuki O. Lignocellulose pretreatment method and ethanol production method // Patent of Japan. – 2010. – No 4522797.

752 Naritomi T., Kouda T., Yano H., Yoshinaga F., Shigematsu T., Moriumura S., Kida K. Influence of broth exchange ratio on bacterial cellulose production by repeated-batch culture // Process Biochem. – 2002. – № 38. – P. 41–47. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00046-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00046-8)

753 Nassar H. N., El-Azab W. I. & El-Gendy N. S. Sustainable ecofriendly recruitment of bioethanol fermentation lignocellulosic spent waste biomass for the safe reuse and discharge of petroleum production produced water via biosorption and solid biofuel production // Journal of Hazardous Materials. – 2022. – № 422. – P. 126845. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126845>

754 Negro C., Garcia-Ochoa F., Tanguy P., Ferreira G., Thibault J., Yamamoto S., Gani R. 2018. Barcelona declaration – 10th world congress of chemical engineering, 1–5 October 2017. Chem. Eng. Res. Des. 129. A1–A2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2017.12.035>

755 Netravali A.N., Qiu K. Bacterial cellulose based 'green' composites. Patent of USA, no. US9499686B2, 2014.

756 Nguyen D.N., Ton N.M.N., Le V.V.M. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bacterial cellulose by 'adsorption-incubation' method // Int. Food Res. J. – 2009. – № 16. – P. 59–64.

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

758 Nguyen H. T., Saha N., Ngwabebhoh F. A., Zandraa O., Saha T. & Saha P. Kombucha-derived bacterial cellulose from diverse wastes: a prudent leather alternative // *Cellulose*. – 2021. – P. 1-19. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04100-5>

759 Nigam J. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast // *J Biotechnol*. – 2002. – № 97. – P. 107-116. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00013-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00013-5)

760 Nikolaev Y.A., Plakunov V.K. Biofilm—«City of Microbes» or an analogue of multicellular organisms *Microbiology*. – 2007. – 76. – P. 125-138. <https://doi.org/10.1134/S0026261707020014>

761 Nikolić S., Mojović L., Pejin D., Rakin M., Vukašinović M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* // *Biomass Bioenergy*. – 2010. – № 34. – P. 1449-1456. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.04.008>

762 Nishi Y. et al. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose // *Journal of Materials Science*. – 1990. – Vol. 25, №. 6. – P. 2997-3001. <https://doi.org/10.1007/BF01139032>

763 Nishiyama Y., Langan P., Chanzy H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction // *J. Am Chem Soc*. – 2002. – № 124. – P. 9074-9082. <https://doi.org/10.1021/ja0257319>

764 Nishiyama Y., et al. Neutron crystallography, molecular dynamics, and quantum mechanics studies of the nature of hydrogen bonding in cellulose I β // *Biomacromolecules*. – 2008. – Vol. 9, №. 11. – P. 3133-3140. <https://doi.org/10.1021/bm800726v>

765 Niyazbekova Z.T.; Nagmetova G.; Kurmanbayev A. An Overview of Bacterial Cellulose Applications // *Biotechnology Theory and Practice*. – 2018. – № 2. – P. 139648317.

766 Nogi M., Abe K., Handa K., Nakatsubo F., Ifuku S. & Yano H. Property enhancement of optically transparent bionanofiber composites by acetylation // *Applied physics letters*. – 2006. – № 89(23). – P. 233123. <https://doi.org/10.1063/1.2403901>

767 Noro N., Sugano Y., Shoda M. Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – Vol. 64, No. 2. – P. 199-205. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1457-6>

768 Novaes A.B., Jr.; Novaes A.B. IMZ implants placed into extraction sockets in association with membrane therapy (Gengiflex) and porous hydroxyapatite: A case report // *Int. J. Oral Maxillofac. Implant*. – 1992. – № 7. – P. 536–540.

769 Novaes Jr A. B. & Novaes A. B. Soft tissue management for primary closure in guided bone regeneration: surgical technique and case report // *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. – 1997. – № 12(1).

770 Novikov I.V., Pigaleva M.A., Kharitonova E.P., Gallyamov M.O., Naumkin A.V., Badun G.A., Levin E.E., Gromovykh T.I. Green approach for fabrication of bacterial cellulose-chitosan composites in the solutions of carbonic acid under high pressure CO₂ // Carbohydrate Polymers. – 2021. – T. 258. – C. 117614. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117614>

771 Obolenskaya A.V., Yelnitskaya Z.P., Leonovich A.A. Laboratornye Raboty Po Khimii Drevesiny I Tsellyulozy (Laboratory Works on Wood and Cellulose Chemistry: Textbook for Higher Educational Institutions, Ecology Publisher, Moscow, in Russian. – 1991. Book can be downloaded free of charge from direct link (rus): <http://www.twirpx.com/file/190572.1991>.

772 Ocana M., Fornes V., Ser., Serna C.J. The Variability of the infrared powder spectrum of amorphous SiO₂ // Journal of non-crystalline solids. –1982. – V. 107. – P. 187–19. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(89\)90461-4](https://doi.org/10.1016/0022-3093(89)90461-4)

773 Ocana M., Fornes V., Garcia-ramos J.V., Serna C.J. Polarization effects in the infrared spectra of α -quartz and α -cristobalite // Physical chemical materials. – 1987. – V. 14. – P. 527–532. <https://doi.org/10.1007/BF00308288>

774 Octave S., Thomas D. Biorefinery: toward an industrial metabolism // Biochimie. – 2009. – No. 91. – P. 659-664. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.015>

775 O'Donnell N., Okkelman I.A., Papkovsky D.B., Dmitriev R.I., Timashev P., Gromovykh T.I. Cellulose-based scaffolds for fluorescence lifetime imaging-assisted tissue engineering // Acta Biomaterialia. – 2018. – T. 80. – C. 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.034>

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

777 Oliveira J.P., Bruni G.P., el Halal S.L.M., et al. Cellulose nanocrystals from rice and oat husks and their application in aerogels for food packaging // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 124. – P. 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.205>

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

779 Olsson L., Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production // Enzym Microb Technol. – 1996. – 18. – P. 312-331. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00157-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00157-3)

780 Orlovska I., Podolich O., Kukharenko O., Zaets I., Reva O., Khirunenko L., Zmejkoski D., Rogalsky S., Barh D., Tiwari S., Kumavath R., Góes-Neto A., Azevedo V., Brenig B., Ghosh P., Vera J-P., Kozyrovska N. Bacterial Cellulose Retains Robustness but Its Synthesis Declines After Exposure to a Mars-Like Environment Simulated Outside the International Space Station // Astrobiology. – 2021. <https://doi.org/10.1089/ast.2020.2332>

- 781 Öhgren K., Vehmaanperä J., Siika-Aho M., et al. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2007. – Vol. 40, № 4. – P. 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.05.014>
- 782 O'Sullivan A. C. Cellulose: the structure slowly unravels // *Cellulose*. – 1997. – Vol. 4, №. 3. – P. 173-207. <https://doi.org/10.1023/A:1018431705579>
- 783 Pacheco G., Nogueira C.R., Meneguín A.B., Trovatti E., Silva M.C.C., Machado R.T.A., Ribeiro S.J.L., Filho E.C.S., Barud H.S. Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source // *Industrial Crops and Products*. – 2017. – Vol. 107. – P. 13-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.026>
- 784 Pacheco G., de Mello, Chiari-Andreo C. V., Isaac B. G., Ribeiro V. L. B., Pecoraro S. J. L., et al. Bacterial cellulose skin masks-properties and sensory tests // *J. Cosmet. Dermatol.* – 2018. – № 17. – P. – 840–847. <https://doi.org/10.1111/jocd.12441>
- 785 Pa'e N., Rotary Discs Reactor for Enhanced Production of Microbial Cellulose, Master Degree Thesis Faculty of Chemical Engineering, Universiti Teknologi Malaysia, Skudai, Johor. –2009.
- 786 Panahi H. K. S., Dehghani M., Dehghani S., Guillemín G. J., Lam S. S., Aghbashlo M. & Tabatabaei M. Engineered bacteria for valorizing lignocellulosic biomass into bioethanol // *Bioresource Technology*. – 2022. – № 344. – P. 126212. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126212>
- 787 Pandey M., Amin Mohd, Ahmad M. C. I., N. & Abeer, Rapid M. M. Synthesis of superabsorbent smart-swelling bacterial cellulose/acrylamide-based hydrogels for drug delivery // *International Journal of Polymer Science*. – 2013. – T. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/905471>
- 788 Pang M. et al. Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering // *European Polymer Journal*. – 2020. – Vol. 122. – P. 109365. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109365>
- 789 Paramjeet S., Manasa P., Korrapati N. Biofuels: Production of fungal-mediated ligninolytic enzymes and the modes of bioprocesses utilizing agro-based residues // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2018. – Vol. 14. – P. 57–71 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.02.007>
- 790 Parisutham V., Kim T.H., Lee S.K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production // *Bioresour Technol.* – 2014. – 161. – P. 431-440. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.114>
- 791 Park J.K., Jung J.Y., Park Y.H. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol // *Biotechnology letters*. – 2003. – No 25. – P. 2055-2059. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000007065.63682.18>

792 Paschoala G.B., Muller C.M.O., Carvalho G.M., et al. Isolation and characterization of nanofibrillated cellulose from oat hulls // *Quimica Nova*. – 2015. – Vol. 38, № 4. – P. 478–482. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150029>

793 Patent of EP № EP2516621 A1. Thermophilic *Thermoanaerobacter italicus subsp marato* having high alcohol productivity / T. Kvist, M.J. Mikkelsen, R.L. Andersen. – 2012.

794 Patent of Japan, no. JP3615767B2. Method and hydrolysis reactor for rapid acid hydrolysis of lignocellulosic materials /Hilst A.G.P. 2005. DOI: Нет дои

795 Patent No: CN1066926C Chinese. Method for Edible Fiber Product by Fermentation of Coconut Juice / Zhong C. Haikou: China National Intellectual Property Administration. – 1996. DOI: нет дои

796 Patent No: CN101278737A Chinese. Compressed Coconut and Method of Preparing the Same / Zhong C. Haikou: China National Intellectual Property Administration. – 2008a. DOI: нет дои

797 Patent No: CN101265489A Chinese. Production of Edible Cellulose by Two-Step Method / Zhong C. Haikou: China National Intellectual Property Administration. – 2008b. DOI: нет дои

798 Patent No: CN101608167 Chinese. Gluconacetobacter oboediens Strain and Method for Breeding and Producing Bacteria cellulose Thereof / Zhong, C. Haikou: China National Intellectual Property Administration. – 2009. DOI: нет дои

799 Patent No: CN105349594 China, C12P19/04, C12R1/01. Method for preparing bacterial cellulose from soybean molasses / Xu Su; Cheng Jianjun; Yin yuan; Ma Jiage; Zhang Shan; Ge Xiaoyuan. – № CN20151990189; заявл. 25.12.2015; опубл. 24.02.2016. – 7 стр.

800 Patent No: CN105647988 China, C12P19/04, C12R1/01. Method of preparing nano level bacterial cellulose from waste food / Li Zheng; Wang Lifan; Zhang Jianfei; Gong Jixian; Jia Shiru. – № CN20141747437; заявл. 05.12.2014; опубл. 08.06.2016. – 6 стр.

801 Patent No: CN104611390 China, C12P19/04, C12R1/02. Method for preparing bacterial cellulose by using bean curd yellow serofluid / Xia Xiufang; Huang Li; Wang Yingnan; Wu Lei. – № CN20131539984; заявл. 05.11.2013; опубл. 13.05.2015. – 6 стр.

802 Patent No: CN104630311 China, C12P19/04, C12R1/02. Method for synchronously producing straw nano-cellulose and bacterial cellulose by using sweet sorghum / Tang Bo; Liu Wenyu. – № CN2015166078; заявл. 09.02.2015; опубл. 20.05.2015. – 8 стр.

803 Patent No: CN105063126 China, C12P19/04, C12R1/02. Method for preparing bacterial cellulose from peanut shells / Sun Dongping; Sun Bianjing; Zhang Heng; Zhu Chunlin; Yang Jiazhi. – № CN20151475356; заявл. 05.08.2015; опубл. 18.11.2015. – 8 стр.

804 Patent of Latvia 3121265, 2017. *Komagataeibacter rhaeticus* P 1463 producer of bacterial cellulose / Semjonovs P., Ruklisa M., Paegle L., Saka M., Treimane R., Patetko A., Linde R.

805 Patent of USA, no. US8658399B2. Novel *Gluconacetobacter* strain having cellulose producing activity / J.S. Kim, W.J. Lee, N.S. Roh, S.I. Kim, M.H. Yoon, Y.T. Song, T.J. Kang, S.H. Oh, S.J. Lee, H.J. Kim, J.J. Yu, D.H. Yu, Y.S. Yoon, J.H. Lee. – 2014. DOI: Нет дои

806 Patent of USA № US8673604 B1 *Clavispora spp.* strain / Z.L. Liu, S.A. Weber. – 2014. DOI: Нет дои

807 Patent of USA, no. US5962676A. Processes for the modification and utilization of bacterial cellulose / P. Tammarate. – 1999. DOI: Нет дои

808 Patent of USA, no. US6069136A. Bacterial cellulose concentrate and method for the treatment of the concentrate / N. Tahara, K. Watanabe, N. Hioki, Y. Morinaga, T. Hajouda, H. Miyashita, A. Shibata, H. Ougiya. – 2000. DOI: Нет дои

809 Patent No 2011/0059883 A1. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. U.S. Methods of Improve the Compatibility and Efficiency of Powdered Versions of Microbious Cellulose / Swazey J. M.A., Compton J. and Madison N. – 2010. DOI: Нет дои

810 Patent No US10292927 B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. U.S. Microfibrous Cellulose Composition Comprising Fermentation Media and Surfactant / Swazey J., Morrison N., Yang Z. F., Compton J. and Nolan T. – 2013. DOI: Нет дои

811 Patent No US8772359 B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. U.S. Surfactant Thickened Systems Comprising Microfibrous Cellulose and Methods of Making Same / Swazey J. M. – 2014. DOI: Нет дои

812 Patent № WO2012109578 A3, *Clostridium thermocellum* strains for enhanced ethanol production and method of their use / A. Guss, L.R. Lynd. – 2012. DOI: Нет дои

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

814 Paulova L., Patakova P., Branska B., Rychtera M., Melzoch K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency // Biotechnol Adv. – 2015. – № 33. – P. 1091-1107. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.002>

815 Paulová L., Patáková P., Rychtera M. & Melzoch K. High solid fed-batch SSF with delayed inoculation for improved production of bioethanol from wheat straw // Fuel. – (2014). – 122. – 294-300. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.020>

816 Pavlov I. N. A Setup for Studying the Biocatalytic Conversion of Products from the Processing of Nonwood Raw Materials // Catalysis in Industry.

- 2014. – Vol. 6, No. 4. – P. 355-360.
<https://doi.org/10.1134/S207005041404014X>
- 817 Penttila P.A., Sugiyama J., Imai T. Effects of reaction conditions on cellulose structures synthesized in vitro by bacterial cellulose synthases // Carbohydrate Polymers. – 2016. – No. 136. – P. 656-666.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.082>
- 818 Pérez J., Munoz-Dorado J., de la Rubia T., Martinez Biodegradation J. and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview // Int Microbiol. – 2002. – № 5. – P. 53-63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>
- 819 Petersen N., Gatenholm P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives // Applied microbiology and biotechnology. – 2011. – Vol. 91. – № 5. – P. 1277-1286.
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3432-y>
- 820 Picheth G.F., Pirich C.L., Sierakowski M.R., Woehl M.A., Sakakibara C.N., de Souza C.F., Martin A.A., da Silva R., & de Freitas R.A. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – № 104. – P. 97-106.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171>
- 821 Pigaleva M.A., Bulat M.V., Gallyamov M.O., Novikov I.V., Kiselyova O.I., Buyanovskaya A.G., Gromovykh T.I., Gavryushina I.A., Lutsenko S.V. A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: what happens to bacteria in supercritical media? // The Journal of Supercritical Fluids. – 2019. – T. 147. – C. 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.02.009>
- 822 Pillai M.M., Tran H.N., Sathishkumar G., Manimekalai K., Yoon J.H., Lim D.Y., Noh I., Bhattacharyya A. Symbiotic culture of nanocellulose pellicle: A potential matrix for 3D Bioprinting // Mat. Sci. Eng. C-Bio. – 2021. – S. 119.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111552>
- 823 Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition // Bioresour Technol. – 74. – 2000. – P. 25-33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- 824 Pircher N. et al. Reinforcement of bacterial cellulose aerogels with biocompatible polymers // Carbohydrate polymers. – 2014. – Vol. 111. – P. 505-513. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.029>.
- 825 Plyuta V., Zaitseva J., Khmel I., Lobakova E., Zagorskina N., Kuznetsov A. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by pseudomonas aeruginosa // Apmis. – 2013. – T. 121, № 11. – C. 1073-1081.
<https://doi.org/10.1111/apm.12083>
- 826 Podgorbunskikh E.M., Bychkov A.L., Lomovsky O.I. Determination of surface accessibility of the cellulose substrate according to enzyme sorption // Polymers. – 2019. – T. 11, № 7. – C. 1201. <https://doi.org/10.3390/polym11071201>
- 827 Podgorbunskikh E.M., Bychkov A.L., Lomovsky O.I., Ryabchikova E.I. The effect of thermomechanical pretreatment on the structure and properties of lignin-rich plant biomass // Molecules. – 2020. – T. 25, № 4. – C. 995.
<https://doi.org/10.3390/molecules25040995>

828 Podolich O., Zaets I., Kukharenko O., Orlovska I., Reva O., Khirunenko L., Sosnin M., Haidak A., Shpylova S., Rabbow E., Skoryk M., Kremenskoj M., Demets R., Kozyrovska N., de Vera J.-P. Kombucha Multimicrobial Community under Simulated Spaceflight and Martian Conditions // *Astrobiology*. – 2017. – № 17 (5). <https://doi.org/10.1089/ast.2016.1480>

829 Podolich O., Kukharenko O., Haidak A., Zaets I., Zaika L., Storozhuk O., Palchikovska L., Orlovska I., Reva O., Borisova T., Khirunenko L., Sosnin M., Rabbow E., Kravchenko V., Skoryk M., Kremenskoj M., Demets R., Olsson-Francis K., Kozyrovska N., de Vera J.-P.P. Multimicrobial Kombucha Culture Tolerates Mars-Like Conditions Simulated on Low-Earth Orbit // *Astrobiology*. – 2019. – № 19 (1). <https://doi.org/10.1089/ast.2017.1746>

830 Rodríguez-Chong A., Alberto Ramírez J., Garrote G. and Vázquez M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: A kinetic assessment // *J. Food Eng.* – 2004. – 61. – P. 143-152. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00080-3](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00080-3)

831 Pogorelova N. et al. Bacterial cellulose nanocomposites: Morphology and mechanical properties // *Materials*. – 2020. – Vol. 13, №. 12. – P. 2849. <https://doi.org/10.3390/ma13122849>

832 Portal O., Clark W. A. & Levinson D. J. Microbial cellulose wound dressing in the treatment of nonhealing lower extremity ulcers / *Wounds: a compendium of clinical research and practice*. – 2009. – № 21(1). – P. 1-3.

833 Portela R., Leal C. R., Almeida P. L. and Sobral R. G. Bacterial cellulose: A versatile biopolymer for wound dressing applications // *Microbial biotechnology*. – 2019. – Vol. 12, №. 4. – P. 586-610. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>

834 Pöttinger Y., Rabel M., Ahrem H., Thamm J., Klemm D. & Fischer D. Polyelectrolyte layer assembly of bacterial nanocellulose whiskers with plasmid DNA as biocompatible non-viral gene delivery system. *Cellulose*. – 2018. – № 25(3). – P. 1939-1960. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1664-z>

835 Pourramezan G.Z., Roayaei A.M., Qezelbash Q.R. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter sp. 4B-2* // *Biotechnology*. – 2009. – Vol. 8, No. 1. – P. 150-154.

836 Prasad S., Singh A., Joshi H. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues // *Resour Conserv Recycl.* – 2007. – № 50. – P. 1-39. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2006.05.007>

837 Prasad R. K., Chatterjee S., Mazumder P. B., Gupta S. K., Sharma S., Vairale M. G. ... & Gupta D. K. Bioethanol production from waste lignocelluloses: A review on microbial degradation potential // *Chemosphere*. – 2019. – № 231. – P. 588-606. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.142>

838 Provin A. P., dos Reis V. O., Hilesheim S. E., Bianchet R. T., de Aguiar Dutra A. R. & Cubas A. L. V Use of bacterial cellulose in the textile industry and the wettability challenge-a review // *Cellulose*. – 2021. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04059-3>

- 839 Putra A., Kakugo A., Furukawa H., Gong J. P. & Osada Y. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface // *Polymer*. – 2008. – 49. – P. 1885–1891. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.02.022>
- 840 Raj K., Krishnan C. Improved high solid loading enzymatic hydrolysis of low-temperature aqueous ammonia soaked sugarcane bagasse using laccase-mediator system and high concentration ethanol production // *Industrial Crops and Products*. – 2019. – Vol. 131. – P. 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.032>
- 841 Rajak R.C., Banerjee R. An innovative approach of mixed enzymatic venture for 2G ethanol production from lignocellulosic feedstock // *Energy Conversion and Management*. – 2020. – Vol. 207. – № 112504. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.112504>
- 842 Rajwade J. M., Paknikar K. M. and Kumbhar J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* // 2015. – № 99. – P. 2491–2511. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6426-3>
- 843 Ram M.S., Anju B., Pauline T., Prasad D., Kain A.K., Mongia S.S., Sharma S.K., Singh B., Singh R., Ilavazhagan G., Kumar D., Selvamurthy W. Effect of Kombucha tea on chromate(VI)-induced oxidative stress in albino rats // *J. Ethnopharmacol.* – 2000. – № 71. – P. e235-e240. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00161-6)
- 844 Ramachandran K.B., Hashim M.A. Simulation studies on simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol // *The Chemical Engineering Journal*. – 1990. – Vol. 45(2). – P. B27–B34. [https://doi.org/10.1016/0300-9467\(90\)80038-e](https://doi.org/10.1016/0300-9467(90)80038-e)
- 845 Ramírez J. A. Á., Suriano C. J., Cerrutti P. & Foresti M. L. Surface esterification of cellulose nanofibers by a simple organocatalytic methodology // *Carbohydrate polymers*. – 2014. – № 114. – P. 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.020>
- 846 Ramírez J. A. Á., Hoyos C. G., Arroyo S., Cerrutti P. & Foresti M. L. Acetylation of bacterial cellulose catalyzed by citric acid: Use of reaction conditions for tailoring the esterification extent // *Carbohydrate polymers*. – 2016. – P. 686-695. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.009>
- 847 Rangaswamy B.E., Vanitha K.P., Hungund B.S. Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit // *International Journal of Polymer Science*. – 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/280784>
- 848 Rani M.U., Navin K.R., Appaiah K.A.A. Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk extract--an agro-industry waste // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – No. 21. – P. 739-745. <https://doi.org/10.4014/jmb.1012.12026>
- 849 Rani V., Mohanram S., Tiwari R., et al. Beta-glucosidase: key enzyme in determining efficiency of cellulase and biomass hydrolysis // *Bioprocessing and*

Biotechniques. – 2014. – Vol. 5. – № 197. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000197>

850 Rao L. V., Goli J. K., Gentela J. & Koti S. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: an overview // Bioresource technology. – 2016. – № 213. – P. 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.092>

851 Ravindran R., Jaiswal A.K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities // Bioresour Technol. – 2016. – 199. – P. 92-102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106>

852 Reddy N., Yang Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications // Trends Biotechnol. – 2005. – № 23. – P. 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.002>

853 Rengsirikul K., Ishii Y., Kangvansaichol K., Sripichitt P., Punsuvon V., Vaithanomsat P., et al. Biomass yield, chemical composition and potential ethanol yields of 8 cultivars of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) harvested 3-monthly in central Thailand // J Sustain Bioenergy Syst. – 2013. – № 3. – P. 107. <https://doi.org/10.4236/jsbs.2013.32015>

854 ResearchMoz and QY Research. <https://www.marketresearch.com/QYResearch-Group-v3531/Global-Microbial-Bacterial-Cellulose-Research-10852443/>

855 Retegi A. et al. Sustainable optically transparent composites based on epoxidized soy-bean oil (ESO) matrix and high contents of bacterial cellulose (BC) // Cellulose. – 2012. – Vol. 19, №. 1. – P. 103-109. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9598-8>

856 Renewable Fuels Association. Available online: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546> (дата обращения: 15.07.2019).

857 Revin V.V., Klenova N.A., Belousova Z.P., Redkin N.A., Tukmakov K.N., Markova Yu.A., Sosova E.Yu. Production and studying properties of composites based on bacterial cellulose and poly-n, n-dimethyl-3,4-methylenpirrolidine chloride. Proceed-ings of Universities // Applied Chemistry and Biotechnology. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 103-111. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-103-111> (in Russian)

858 Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A. & Shchankin M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products // Brazilian journal of microbiology. – 2018. – № 49. – P. 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.012>.

859 Revin V. V., Pestov N. A., Shchankin M. V., Mishkin V. P., Platonov V. I. & Uglanov D. A. A study of the physical and mechanical properties of aerogels obtained from bacterial cellulose // Biomacromolecules. – 2019. – № 20(3). – P. 1401-1411. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01816>

860 Rezania S., Oryani B., Cho J., Talaiekhosani A., Sabbagh F., Hashemi B., ... & Mohammadi A. A. Different pretreatment technologies of lignocellulosic

biomass for bioethanol production: an overview // Energy. – 2020. – № 199. – P. 117457. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>

861 Rivas B., Moldes A. B., Dominguez J. M. and Parajo J. C. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* // Int. J. Food Microbiol. – 2004. – № 97. – P. 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.006>

862 Rol F., Sillard C., Bardet M., Yarava J. R., Emsley L., Gablin C., ... & Bras J. Cellulose phosphorylation comparison and analysis of phosphate position on cellulose fibers // Carbohydrate polymers. – 2020. – № 229. – P. 115294. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115294>

863 Roman M. Toxicity of cellulose nanocrystals: a review // Industrial Biotechnology. – 2015. – Vol. 11. – № 1. – P. 25-33. <https://doi.org/10.1089/ind.2014.0024>

864 Romaní A., Tomaz P.D., Garrote G., et al. Combined alkali and hydrothermal pretreatments for oat straw valorization within a biorefinery concept // Bioresource Technology. – 2016. – Vol. 220. – P. 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.077>

865 Römling U., Galperin M. Y., & Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2013. – № 77(1). – P. 1-52. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-1>

866 Römling U., Galperin M. Y. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions // Trends in microbiology. – 2015. – Vol. 23. – № 9. – P. 545-557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005>

867 Ross P., Aloni Y., Weinhouse C., Michaeli D., Weinberger-Ohana P., Meyer R., Benziman M. An unusual guanyl oligonucleotide regulates cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. FEBS Lett. – 1985. – № 186(2). – P. 191–196. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80706-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80706-7)

868 Ross P., Mayer R., Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria // Microbiological reviews. – 1991. – Vol. 55. – № 1. – P. 35-58. <https://doi.org/10.1128/mr.55.1.35-58.1991>

869 Roukas T. & Kotzekidou P. From food industry wastes to second generation bioethanol: a review // Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. – 2022. – 1-31. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09606-9>

870 Ruan C., Zhu Y., Zhou X., Abidi N., Hu Y. & Catchmark J. M. Effect of cellulose crystallinity on bacterial cellulose assembly // Cellulose. – 2016. – Vol. 23, № 6. – P. 3417-3427. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1065-0>

871 Rubina M.S., Naumkin A.V., Pigaleva M.A., Gromovykh T.I. Bacterial cellulose film produced by *Gluconacetobacter hansenii* as a source material for oxidized nanofibrillated cellulose // Doklady Physical Chemistry. – 2020. – T. 493, № 2. – C. 127-131. <https://doi.org/10.1134/S0012501620080023>

872 Ruka D. R., Simon G. P., Dean K. M. In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate //

Carbohydrate polymers. – 2013. – Vol. 92, № 2. – P. 1717-1723.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.007>

873 Ruka D.R., Simon G.P., Dean K.M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose // Carbohydrate Polymers. – 2012. – No 89. – P. 613-622.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.059>

874 Ruka D. R., Simon G. P., Dean K. Harvesting fibrils from bacterial cellulose pellicles and subsequent formation of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate nanocomposites // Cellulose. – 2014. – Vol. 21. – №. 6. – P. 4299-4308. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0415-z>

875 Ryabtseva S.A., Tabakova Yu.A., Khramtsov A.G., Anisimov G.S., Kravtsov V.A. Modelling formation and removal of biofilms in secondary dairy raw materials // Foods and Raw Materials. – 2021. – T. 9. – № 1. – C. 59-68.
<https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-1-59-68>

876 Saha B.C. Hemicellulose bioconversion // J Ind Microbiol Biotechnol. – 2003. – № 30. – P. 279-291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>

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

878 Saha B.C., Nichols N.N., Qureshi N., Kennedy G.J., Iten L.B., Cotta M.A. Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation // Bioresour. Technol. – 2015. – № 175. – P. 17–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.060>

879 Saha N., Zaandra O., Bandyopadhyay S. & Saha P. Bacterial Cellulose Based Hydrogel Film for Sustainable Food Packaging // In Advances in Sustainable Polymers. – 2019. – P. 237-245. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-32-9804-0_11

880 Saini J.K., R. Saini, L. Tewari Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments // 3 Biotech. – 2015. – № 5. – P. 337-353
<https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>

881 Sakovich G.V., Budaeva V.V., Korchagina A.A., et al. Oat-hull cellulose nitrates for explosive compositions // Doklady Chemistry. – 2019. – Vol. 487. – № 2. – P. 221–225. <https://doi.org/10.1134/S0012500819080020>

882 Sämfors S., Karlsson K., Sundberg J., Markstedt K. & Gatenholm P. Biofabrication of bacterial nanocellulose scaffolds with complex vascular structure // Biofabrication 1. – 2019. – № 1(4). – P. 045010. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab2b4f>

883 Sanchavanakit N., Sangrungraungroj W., Kaomongkolgit R., Banaprasert T., Pavasant P., Phisalaphong M. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film // Biotechnology Progress. – 2006. – Vol. 22, No. 4. – P. 1194-1199. <https://doi.org/10.1021/bp060035o>

- 884 Sanchez A., Sevilla-Güitron V., Magaña G. Parametric analysis of total costs and energy efficiency of 2G enzymatic ethanol production // *Fuel*. – 2013. – Vol. 113. – P. 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.05.034>
- 885 Sanchez N., Ruiz R. Y., Cifuentes B. & Cobo M. Controlling sugarcane press-mud fermentation to increase bioethanol steam reforming for hydrogen production // *Waste Management*. – 2019. – 98. – P. – 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.08.006>
- 886 Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi // *Biotechnol Adv.* – 2009. – № 27. – P. 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- 887 San-Ei Gen F.F.I., Inc. – 2020. Available online at: <https://www.saneigenffi.co.jp/closeup/san.html> (accessed August 20, 2021).
- 888 Sankaran R., Andres Parra Cruz R., Pakalapati H., et al. Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review // *Bioresource Technology*. – 2020. – Vol. 298. – № 122476. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122476>
- 889 Sani A. & Dahman Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2010. – № 85. – P. 151-164. <https://doi.org/10.1002/jctb.2300>
- 890 Sant'Anna L.M.M., Pereira N., Bitancur G.J.V., et al. Process for producing ethanol from a hydrolysate of the hemicellulose fraction of sugarcane bagasse in a press reactor Patent of USA № US20100273228 A1, 2010.
- 891 Santos S.M., Carbajo J.M., Gómez N., Ladero M., Villar J.C. Paper reinforcing by in situ growth of bacterial cellulose // *Journal of Materials Science*. 2017. – Vol. 52. – Issue 10. – P. 5882–5893. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0824-0>
- 892 Santos V. T., de Santos O., Siqueira G., Milagres A. M. F., A. Ferraz de O. Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids // *Industrial Crops and Products*. – 2018. – Vol. 111. – P. 722–730. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.053>
- 893 Santos J., Ouadi M., Jahangiri H, Hornung A. Thermochemical conversion of agricultural wastes applying different reforming temperatures // *Fuel Processing Technology*. 2020. – Vol. 203. – № 106402. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2020.106402>
- 894 Satcurada I., Ito T., Nakamae K. Elastic moduli of the crystal lattices of polymers // *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*. – New York: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. – 1967. – Vol. 15. – № 1. – P. 75-91. <https://doi.org/10.1002/polc.5070150107>
- 895 Sarkar N., S.K. Ghosh, S. Bannerjee, K. Aikat Bioethanol production from agricultural wastes: an overview // *Renew Energy*. – 2012. – № 37. – P. 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>

896 Sarris D., Papanikolaou S. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies // Eng Life Sci. – 2016. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400199>

897 Savitskaya I. S., Shokatayeva D. H., Kistaubayeva A. S., Ignatova L. V. & Digel I. E. Antimicrobial and wound healing properties of a bacterial cellulose based material containing *B. subtilis* cells. Heliyon. – 2019. – № 5(10). – P. e02592. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02592>

898 Saxena I. M., Brown Jr R. M. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts // Annals of botany. – 2005. – Vol. 96. – № 1. – P. 9-21. <https://doi.org/10.1093/aob/mci155>

899 Saxena R., Adhikari D., Goyal H. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review // Renew Sustain Energy Rev. – 2009. – № 13. – P. 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2007.07.011>

900 Schaffner M., Rühls P. A., Coulter F., Kilcher S. & Studart A. R. 3D printing of bacteria into functional complex materials // Science Advances. – 2017. – 3(12). – P. eaao6804. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao6804>

901 Schlufte K., Heinze T. Carboxymethylation of Bacterial Cellulose // Macromolecular Symposia. – 2010. – No. 294. – P. 117-124. <https://doi.org/10.1002/masy.200900054>

902 Schlufte K., Heinze T. Carboxymethylation of bacterial cellulose // Macromolecular symposia. – Weinheim : WILEY-VCH Verlag, 2010. – T. 294. – № 2. – C. 117-124.

903 Schmitt E., Bura R., Gustafson R., Cooper J., Vajzovic A. Converting lignocellulosic solid waste into ethanol for the State of Washington: an investigation of treatment technologies and environmental impacts // Bioresour Technol. – 2012. – № 104. – P. 400-409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.094>

904 Schumann D. A., Wippermann J., Klemm D. O., Kramer F., Koth D., Kosmehl H., et al. Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes // Cellulose. – 2009. – № 16. – P. 877–885. <https://doi.org/10.1007/s10570-008-9264-y>

905 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>. – 2020 (accessed April 20 2020).

906 Seifollahi M., Amiri H. Enzymatic post-hydrolysis of water-soluble cellulose oligomers released by chemical hydrolysis for cellulosic butanol production // Cellulose. – 2019. – Vol. 26. – P. 4479–4494. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02397-x>

907 Serafica G., Mormino R., Bungay H. Inclusion on of solid particle in bacterial cellulose // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002. – № 58. – P. 756-760. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0978-8>

908 Sewsynker-Sukai Y., Gueguim E.B. Kana Simultaneous saccharification and bioethanol production from corncobs: process optimization

and kinetic studies // *Bioresource Technology*. – 2018. – Vol. 262. – P. 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.056>

909 Shah N., Ha J. H. & Park J. K. Effect of reactor surface on production of bacterial cellulose and water soluble oligosaccharides by *Gluconacetobacter hansenii* PJK // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2010. – № 15. – P. 110–118. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-3064-6>

910 Shanenko E.F., Mukhamedzanova T.G., Efimenko T.A., Serykh I.N., Efremenkova O.V., Vasilyeva B.F., Nikolaev Y.A., Filippova S.N., El'-Registan G.I., Gernet M.V., Bilanenko E.N., Oleskin A.V., Shevelev S.S. Using the *Eurotium cristatum* fungus for preparing fermented herbal teas // *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*. – 2020. – T. 10, № 6. – C. 341-361.

911 Sharma A., Thakur M., Bhattacharya M., Mandal T. Goswami S. Commercial application of cellulose nano-composites—A review // *Biotechnol. Rep.* – 2019. – № 21. – P. e00316. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00316>

912 Sharma C., Bhardwaj N.K. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives // *Mater. Sci. Eng.* – 2019. – № 104. – P. 109963. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109963>

913 Sharma B., Larroche C., Dussap C.-G. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production // *Bioresource Technology*. – 2020. – Vol. 313, № 123630. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630>

914 Shi Q.S., Feng J., Li W. R., Zhou G., Chen A. M., Ouyang Y. S. & Chen Y. B. Effect of different conditions on the average degree of polymerization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter intermedius* BC-41 // *Cellulose Chemistry and Technology*. – 2013. – Vol. 47, №. 7-8. – P. 503-508.

915 Shi Z., Zhang Y., Phillips G. O. & Yang G. Utilization of bacterial cellulose in food // *Food hydrocolloids*. – 2014. – № 35. – P. 539-545. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012>

916 Shi Z., Shi X., Ullah M. W., Li S., Revin V. V. & Yang G. Fabrication of nanocomposites and hybrid materials using microbial biotemplates // *Advanced Composites and Hybrid Materials*. – 2018. – № 1(1). – P. 79-93. <https://doi.org/10.1007/s42114-017-0018-x>

917 Shidlovskiy I.P., Shumilova A.A., Shishatskaya E.I., Volova T.G. Properties of Bacterial Cellulose Composites with Silver Nanoparticles // *Biophysics*. – 2018. – Vol. 63, № 4. – P. 519-525. <https://doi.org/10.1134/S0006350918040188>

918 Shigematsu T., Takamine K., Kitazato M., Morita T., Naritomi T., Morimura S., Kida K. Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (gdh)-deficient mutant of *Gluconacetobacter xylinus* and its use for bioconversion of sweet potato pulp // *J. Biosci Bioeng.* – 2005. – № 99(4). – P. 415-422. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.415>

919 Shin S., Kwak H., Shin D. & Hyun J. Solid matrix-assisted printing for three-dimensional structuring of a viscoelastic medium surface // *Nature communications*. – 2019. – № 10 (1). – P. 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12585-9>

920 Shirai A., Takahashi M., Kaneko H., Nishimura S., Ogawa M., Nishi N., Tokura S. Biosynthesis of a novel polysaccharide by *Acetobacter xylinum* // International Journal of Biological Macromolecules. – 1994. – No. 15. – P. 297-300. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90059-0)

921 Shishonok M.V., Torgashov V.I., Gert E.V., Zubets O.V., Kaputskii F.N. Investigation of conditions for nitric acid delignification of rye straw // Cell. Chem. Technol. – 1997. – № 31. – P. 425–438.

922 Shoda M. & Sugano Y. Recent advances in bacterial cellulose production // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2005. – № 10(1). – P. 1-8.

923 Scionti G. Mechanical properties of bacterial cellulose implants // Giuseppe Scionti. – 2010. – 38 p.

924 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).

925 Searle S., Pavlenko N., El Takriti S., Bitnere K. Potential Greenhouse Gas Savings from a 2030 Greenhouse Gas Reduction Target with Indirect Emissions Accounting for the European Union; Working Paper 2017-05; International Council on Clean Transportation (ICCT): Washington, DC, USA, 2017.

926 Searle S. Sustainability Challenges of Lignocellulosic Bioenergy Crops; International Council on Clean Transportation (ICCT): Washington, DC, USA, 2018. <https://theicct.org/publication/sustainability-challenges-of-lignocellulosic-bioenergy-crops/>

927 Sievers M., C. Lanini, A. Weber, U. Schuler-Schmid, M. Teuber Microbiology and fermentation balance in a Kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation // Syst. Appl. Microbiol., 18 (1995), pp. 590-594. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80420-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80420-0)

928 Silveira M. H. L., Morais A. R. C., da Costa Lopes A.M., et al. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries // ChemSusChem. – 2015. – Vol. 8. – P. 3366–3390. <https://doi.org/10.1002/cssc.201500282>

929 Sims R.E., Mabee W., Saddler J.N., Taylor M. An overview of second generation biofuel technologies // Bioresour Technol. – 2010. – 101. – P. 1570-1580. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>

930 Singh A., Kumar P., Schügerl K. Bioconversion of cellulosic materials to ethanol by filamentous fungi // Enzymes and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells. – 1992. – P. 29–55. <https://doi.org/10.1007/BFb0008755>

931 Singh P., Pandit S., Garnæs J., Tunjic S., Mokkalapati V. R., Sultan A., ... & Mijakovic I. Green synthesis of gold and silver nanoparticles from Cannabis sativa (industrial hemp) and their capacity for biofilm inhibition // International journal of nanomedicine. – 2018. – № 13. – P. 3571. <https://doi.org/10.2147/IJN.S157958>

- 932 Singh Y. D. & Satapathy K. B. Conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol: an overview with a focus on pretreatment // Int J Eng Technol. – 2018. – № 15. – P. 17-43. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/IJET.15.17>
- 933 Singhsa P., Narain R., Manuspiya H. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions // Cellulose. – 2018. – № 25(3). – P. 1571-1581. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1699-1>
- 934 Sjulander N. & Kikas T. Origin, impact and control of lignocellulosic inhibitors in bioethanol production—A review // Energies. – 2020. – № 13(18). – P. 4751. <https://doi.org/10.3390/en13184751>
- 935 Skočaj M. Bacterial nanocellulose in papermaking // Cellulose. – 2019. – Vol. 26. – P. 6477–6488. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02566-y>
- 936 Skoog K., Hahn-Hägerdal B. Xylose fermentation // Enzym Microb Technol. – 1988. – № 10. – P. 66-80. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90001-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90001-4)
- 937 Skvortsova Z.N., Grachev V.S., Traskin V.Y., Gromovykh T.I. Physicochemical mechanics of bacterial cellulose // Colloid Journal. – 2019. – Vol 81, № 4. – P. 366-376. <https://doi.org/10.1134/S0023291219040165>
- 938 Skvortsova Z.N., Grachev V.S., Traskin V.Y., Gromovykh T.I. Physicochemical mechanics of bacterial cellulose // Cellulose. – 2019. – T. 81, № 4. – C. 366. <https://doi.org/10.1134/S1061933X19040161>
- 939 Smichi N., Messaoudi Y., Allaf K., Gargouri M. Steam explosion (SE) and instant controlled pressure drop (DIC) as thermo-hydro-mechanical pretreatment methods for bioethanol production // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2020. – Vol. 43. – P. 945–957. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02297-6>
- 940 Sokolnicki A.M., Fisher R.J., Harrah T.P. et al. Permeability of bacterial cellulose membranes // J. Membr. Sci. – 2006. – Vol. 272. – P. 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.06.065>
- 941 Somerville C., Youngs H., Taylor C., Davis S.C., Long S.P. Feedstocks for lignocellulosic biofuels // Science. – 2010. – № 329 (5993). – P. 790-792. <https://doi.org/10.1126/science.1189268>
- 942 Son H.J., Son M.S., Heo Y.G., Kim S.J Lee Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2001. – Vol. 33, No. 1. – P. 1-5. <https://doi.org/10.1042/BA20000065>
- 943 Son H.J., Kim H.G., Kim K.K., Kim H.S., Kim Y.G., Lee S.J. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter sp. V6* in synthetic media under shaking culture conditions // Bioresource technology. – 2003. – Vol. 86, No. 3. – P. 215-219. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00176-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00176-1)
- 944 Song H.-J., Li H., Seo J.-H., Kim M.-J., Kim S.-J. Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes // Korean Journal of Chemical Engineering. – 2009. – Vol. 26, No. 1. – P. 141-146. <https://doi.org/10.1007/s11814-009-0022-0>

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

946 Stanescu P.-O., Radu I.-C., Leu Alexa R., Ghitman J., Stoian O., Zaharia C., Hudita A., Galateanu B., Tanasa E., Tsatsakis A., Gingham O., Shtilman M., Mezhuev Y. Novel chitosan and bacterial cellulose biocomposites tailored with polymeric nanoparticles for modern wound dressing development // Drug Delivery // Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents. – 2021. – T. 28. – № 1. – C. 1932-1950. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1977423>

947 Steensels J., Snoek T., Meersman E., et al. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity // FEMS Microbiology Reviews. – 2014. – Vol. 38. – № 5. – P. 947–995. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12073>

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

949 Stepanov N., Efremenko E. «Deceived» Concentrated Immobilized Cells as Biocatalyst for Intensive Bacterial Cellulose Production from Various Sources // Catalysts. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 33. <https://doi.org/10.3390/catal8010033>

950 Stoumpou V., Novakovic J., Kontogianni N., et al. Assessing straw digestate as feedstock for bioethanol production // Renewable Energy. – 2020. – Vol. 153. – P. 261–269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.021>

951 Stratford M. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast (Chichester, England). – 1989. – 5. – S441-5. <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/annotations?reference=2665372>

952 Stroescu M., Isopencu G., Busuioc C., Stoica-Guzun A. Antimicrobial food pads containing bacterial cellulose and polysaccharides. In M. I. H. Mondal (Ed.) // Polymers and polymeric composites: A reference series. Cellulose-based superabsorbent hydrogels. – 2020. – P. 1–36. <http://dx.doi.org/10.1109/RadarConf2043947.2020.9266686>

953 Stumpf T. R., Yang X., Zhang J. & Cao X. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering // Materials Science and Engineering. – 2018. – C. – 82. – 372-383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.121>

954 Suhartini S., Rohma N. A., Mardawati E., Hidayat N. & Melville L. Biorefining of oil palm empty fruit bunches for bioethanol and xylitol production in Indonesia: A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2022. – № 154. – P. 111817. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111817>

955 Sulaeva I., Henniges U., Rosenau T. & Potthast A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. //

Biotechnology Advances. – 2015. – No. 33. – P. 1547-1571.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.009>

956 Sun D.-P., Ma B., Zhu C.-L., Liu C.-S., Yang J.-Z. Novel nitrocellulose made from bacterial cellulose // Journal of Energetic Materials. – 2010. – No. 28. – P. 85-97. <https://doi.org/10.1080/07370650903222551>

957 Sun D., Yang Q., Wang Y., Gao H., He M., Lin X., ... & Peng L. Distinct mechanisms of enzymatic saccharification and bioethanol conversion enhancement by three surfactants under steam explosion and mild chemical pretreatments in bioenergy Miscanthus // Industrial Crops and Products. – 2020. – No.153. – P. 112559. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112559>

958 Sun R.C. Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels: monography / Elsevier. First edition. – 2010. – 292 p.

959 Sun S., Cao X. & Sun R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials // Bioresource technology. – 2016. – 199. – P. 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>

960 Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review // Bioresour Technol. – 2002. – № 83. – P. 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)

961 Suresh S. Biosynthesis and Assemblage of Extracellular Cellulose by Bacteria / In: Hussain C. (eds) Handbook of Environmental Materials Management: Springer, Cham. – 2018. – P. 1-43. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3_71-1

962 Surma-Ślusarska B., Presler S., Danielewicz D. Characteristics of bacterial cellulose obtained from *Acetobacter xylinum* culture for application in papermaking // Fibres & Textiles in Eastern Europe. – 2008. – Vol. 16, №. 4. – P 108-111.

963 Sutarlie L., Yang K.-L. Hybrid cellulase aggregate with a silica core for hydrolysis of cellulose and biomass // J Colloid Interface Sci. – 2013. – № 411. – P. 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.09.005>

964 Svensson A., Nicklasson E., Harrah T., Panilaitis B., Kaplan D. L., Brittberg M. & Gatenholm P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage // Biomaterials. – 2005. – № 26(4). – P. 419-431. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.049>

965 Swain M.R., Krishnan C. Improved conversion of rice straw to ethanol and xylitol by combination of moderate temperature ammonia pretreatment and sequential fermentation using *Candida tropicalis* // Ind Crops Prod. – 2015. – 77. – P. 1039-1046. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.013>

966 Szczodrak J., Fiedurek J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol // Biomass Bioenergy. – 1996. – № 10. – P. 367-375. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(95\)00114-X](https://doi.org/10.1016/0961-9534(95)00114-X)

967 Szymanska-Chargot M., Cybulska J., Zdunek A. Sensing the Structural Differences in Celluloses from Apple and Bacterial Cell Wall Materials by Raman and FT-IR // Sensors. – 2011. – Vol. 11. – P. 5543-5560. <https://doi.org/10.3390/s110605543>

968 Tabatabaee R. S., Golmohammadi H. & Ahmadi S. H. Easy diagnosis of jaundice: a smartphone-based nanosensor bioplatfrom using photoluminescent bacterial nanopaper for point-of-care diagnosis of hyperbilirubinemia // ACS sensors. – 2019. – № 4(4) . – P. 1063-1071. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00275>.

969 Tabuchi M., Watanabe K., Morinaga Y., Yoshinaga F. Acetylation of bacterial cellulose: preparation of cellulose acetate having a high degree of polymerization // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1998. – Vol. 62. – P. 1451–1454. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1451>

970 Taha M., Foda M., Shahsavari E., Aburto-Medina A., Adetutu E., Ball A. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges // Curr Opin Biotechnol. – 2016. – № 38. – P. 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.012>

971 Tahara N., Tabuchi M., Watanabe K., Yano H., Morinaga Y., Yoshinaga F. Degree of polymerization of cellulose from *Acetobacter xylinum* BPR2001 decreased by cellulase produced by the strain // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1997. – Vol. 61. – P. 1862–1865. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1862>

972 Taherzadeh M.J. Bioengineering to tackle environmental challenges, climate changes and resource recovery // Bioengineered. – 2019. – № 10. – P. 698-699. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1705065>

973 Taniguchi M., Itaya T., Tohma T., Fujii M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by a novel co-culture system with two fermentors and two microfiltration modules // J Ferment Bioeng. – 1997. – 84. – P. 59-64. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)80143-2](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)80143-2)

974 Tajima K., Kusumoto R., Kose R., Kono H., Matsushima T., Isono T., et al. One-step production of amphiphilic nanofibrillated cellulose using a cellulose-producing bacterium // Biomacromolecules. – 2017. – № 18. – P. 3432–3438. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01100>

975 Tam T. T. M. & Huong N. T. Optimization of *Corynebacterium glutamicum* immobilization process on bacterial cellulose carrier and its application for lysine fermentation // Optimization. – 2014. – № 4(07). – P. 33-38.

976 Tamanini C., Oliveira A.S.d., Felipe M.d.G.d.A., et al. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xylitol // Acta Scientiarum Technology. – 2004. – Vol. 26, № 2. – P. 117–125. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v26i2.1509>

977 Tan L., Zhong J., Jin Y.-L., et al. Production of bioethanol from unwashed-pretreated rapeseed straw at high solid loading // Bioresource Technology. – 2020. – Vol. 303. – P. 122949. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122949>

978 Tang C., Shan J., Chen Y., et al. Organic amine catalytic organosolv pretreatment of corn stover for enzymatic saccharification and high-quality lignin // Bioresource Technology. – 2017. – Vol. 232. – P. 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.041>

- 979 Tanga R., Alam N., Li M., Xie M., Ni Y. Dissolvable sugar barriers to enhance the sensitivity of nitrocellulose membrane lateral flow assay for COVID-19 nucleic acid // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – Volume 268. – P. 118259. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118259>
- 980 Tanskul S., Amornthatree K., Jaturonlak N., A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: screening and optimization of culture conditions // *Carbohydr. Polym.* – 2013. – № 92. – P. 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.017>
- 981 Tantratian S., Tammarate P., Krusong W., Bhattarakosol P., A Phunsri Effect of dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter* sp. // *Journal Sciences Research Chula University*. – 2005. – No. 30. – P. 179-186.
- 982 TAPPI method T222 om-83. Acid-insoluble lignin in wood and pulp [Text]. – In: *Test methods 1998–1999*. – Atlanta. – TAPPI Press, 1999.
- 983 TAPPI method T211 om-85. Ash in wood, pulp, paper, and paperboard. – In: *Test methods*. – Atlanta. – TAPPI Press, 1985.
- 984 Tayyab M., Noman A., Islam W., Waheed S., Arafat Y., Ali F., ... & Lin W. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by environment-friendly pretreatment methods: A review. *Appl. Ecol. Environ. Res.* – 2018. – 16(1). – P. 225-249. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1601_225249
- 985 Tekin K., Hao N., Karagoz S., Ragauskas A.J. Ethanol: A Promising Green Solvent for the Deconstruction of Lignocellulose // *ChemSusChem*. – 2018. – Vol. 11. – P. 3559–3575. <https://doi.org/10.1002/cssc.201801291>
- 986 Teoh A.L., Heard G., Cox J. Yeast ecology of Kombucha fermentation // *Int. J. Food Microbiol.* – 2004. – № 95. – P. 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- 987 Terinte N., Ibbett R. & Schuster K.C. Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD): Comparison between measurement techniques // *Lenzinger Berichte*. – 2011. – № 89. – P. 118-131.
- 988 Thaveemas P., Chuenchom L., Kaowphong S., Techasakul S., Saparpakorn P., Dechtrirat D. Magnetic carbon nanofiber composite adsorbent through green in-situ conversion of bacterial cellulose for highly efficient removal of bisphenol A // *Bioresource Technol.* – 2021. – № 333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125184>
- 989 Thomas S. A review of the physical, biological and clinical properties of a bacterial cellulose wound dressing // *J. Wound Care*. – 2008. – № 17. – P. 349–352. <https://doi.org/10.12968/jowc.2008.17.8.30798>
- 990 Teoh A.L., Heard G., Cox J. Yeast ecology of Kombucha fermentation // *Int. J. Food Microbiol.* – 2004. – № 95. – P. 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- 991 Tian S., Zang J., Pan Y., Liu J., Yuan Z., Yan Y., et al. Construction of a recombinant yeast strain converting xylose and glucose to ethanol // *Front Biol China*. – 2008. – № 3. – P. 165-169. <https://doi.org/10.1007/s11515-008-0015-0>

992 Tokoh C., Takabe K., Fujita M., Saiki H. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan // *Cellulose*. – 1998. – Vol.5. – P. 249–261. <https://doi.org/10.1023/A:1009211927183>

993 Tonouchi N., Tsuchida T., Yoshinaga F., Beppu T., Horinouchi S. Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in *Acetobacter xylinum* // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 1996. – № 60. – P. 1377-1379. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.1377>

994 Torlopov M.A., Mikhaylov V.I., Udoratina E.V., Aleshina L.A., Prusskii A.I., Tsvetkov N.V., Krivoshapkin P.V. Cellulose nanocrystals with different length-to-diameter ratios extracted from various plants using novel system acetic acid/phosphotungstic acid/octanol-1 // *Cellulose*. – 2018. – № 25 (2). – P. 1031-1046. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1624-z>

995 Torres F. G., Commeaux S., Troncoso O. P. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials // *J. Funct. Biomater.* – 2012. – Vol. 3. – P. 864–878. <https://doi.org/10.3390/jfb3040864>

996 Toyosaki et al., Toyosaki H., Kojima Y., Tsuchida T., Hoshino K., Yamada Y., Yoshinaga F. The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation cultures: The proposal of *Acetobacter Xylinum* subsp. *Sucrofermentans* subsp. *NOV* // *Journal of General and Applied Microbiology*. – 1995. – № 41b. – P. 307-314. <https://doi.org/10.2323/jgam.41.307>

997 Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandala I., Papanikolaou S., Paloukis F., Alves V., Koutinas A. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16, № 7. – P. 14832-14849. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>

998 Tsuchida T., N. Tonouchi, A. Seto, Y. Kojima, M. Matsuoka, F. Yoshinaga. Patent of USA, no. US5962278A. Cellulose-producing bacteria. 1999.

999 Tyupa D.V., Kalenov S.V., Baurina M.M., Panfilov V.I., Kuznetsov A.Ye., Skladnev D.A. A facile method for formation of synthetic activated sludge granules with enhanced tolerance to metal ion toxicity // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2016. – V. 91. – № 2. – P. 532-538. <https://doi.org/10.1002/jctb.4609>

1000 Ul-Islam M., Khan T. & Park, J. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – № 88. – P. 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006>

1001 Ul-Islam M., Khan T., Khattak W. A. & Park J. K. Bacterial cellulose-MMTs nanoreinforced composite films: Novel wound dressing material with antibacterial properties // *Cellulose*. – 2013. – № 20. – P. 589–596. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9849-3>

1002 Ul-Islam M., Khan S., Ullah M. W. and Park. J. K. Comparative study of plant and bacterial cellulose pellicles regenerated from dissolved states // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – № 137. – P. 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.232>

1003 Ul-Islam M., Ullah M. W., Khan S. and Park J. K. Production of bacterial cellulose from alternative cheap and waste resources: a step for cost reduction with positive environmental aspects // Korean J. Chem. Eng. – 2020. – № 37. – P. 925–937. <https://doi.org/10.1007/s11814-020-0524-3>

1004 Ullah M.W., Ul-Islam M., Khan S., Kim Y., Park J.K. Innovative production of bio cellulose using a cell-free system derived from a single cell line // Carbohydr. Polym. – 2015. – № 132. – P. 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.037>

1005 Ullah H., Wahid F., Santos H. A. & Khan T. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites // Carbohydrate polymers. – 2016. – № 150. – P. 330-352. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.029>

1006 Ullah M.W., Ul-Islam M., Khan S., Kim Y., Park J.K. Structural and physico-mechanical characterization of bio-cellulose produced by a cell-free system // Carbohydr. Polym. – 2016. – № 136. – P. 908–916. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.010>

1007 Ullah M.W., M.U. Islam, S. Khan, N. Shah, J.K. Park, Recent advancements in bioreactions of cellular and cell-free systems: a study of bacterial cellulose as a model, Korean J. Chem. Eng. (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11814-017-0121-2>

1008 Um I.C., Ki C.S., Kweon H.Y., Lee K.G., Ihm D.W., Park Y.H. Wet spinning of silk polymer II. Effect of drawing on the structure characteristics and properties of filament // Int. J. Biol Macromol. – 2004. – № 34 (1-2). – P. 107-119. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.03.011>

1009 United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Office of Global Analysis. – 2019. URL: <https://www.fas.usda.gov/> (дата обращения: 21.03.2021).

1010 Unrean P., Khajeeram S., Laoteng K. Systematic optimization of fed-batch simultaneous saccharification and fermentation at high-solid loading based on enzymatic hydrolysis and dynamic metabolic modeling of *Saccharomyces cerevisiae* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2016. – № 100. – C. 2459–2470. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7173-1>

1011 Urbina L., Hernández-Arriaga A.M., Eceiza A., Gabilondo N., Corcuera M.A., Prieto M.A., Retegi A. By-products of the cider production: an alternative source of nutrients to produce bacterial cellulose // Cellulose. – 2017. – № 24(5). – P. 2071-2082. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1263-4>

1012 Urbina L., Corcuera M. A., Gabilondo N., Eceiza A. & Retegi A. A review of bacterial cellulose: sustainable production from agricultural waste and applications in various fields // Cellulose. – 2021. – № 28 (13). – P. 8229-8253. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04020-4>

1013 Valdebenito F., Pereira M., Ciudad G., et al. On the nanofibrillation of corn husks and oat hulls fibres // Industrial Crops and Products. – 2017. – Vol. 95. – P. 528–534. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.006>

1014 Valin H., Peters D., van den Berg M., Frank S., Havlik P., Forsell N., Hamelinck C. The Land use Change Impact of Biofuels Consumed in the EU. Quantification of Area and Greenhouse Gas Impacts, 2015; A Cooperation of Ecofys, IIASA and E4tech. European Commission, Project number: BIENL13120; ECOFYS Netherlands: Utrecht, Netherlands, 2015. <https://ec.europa.eu/energy/sites/ener/files/docum...>

1015 Valla S., Coucheron D. H., Fjaervik E., Kjosbakken J., Weinhouse H., Ross P., Amikam D., Benziman M. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Complementation of cellulose-negative mutant by the UDPG pyrophosphorylase structural gene // Molecular and General Genetics. – 1989. – № 217. – P. 26-30.

1016 Valls C., Pastor F.I.J., Roncero M.B., Vidal T., Diaz P., Martínez J., Valenzuela S.V. Assessing the enzymatic effects of cellulases and LPMO in improving mechanical fibrillation of cotton linters // Biotechnology for Biofuels.– 2019. – Vol.12. – P. 161. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1502-z>

1017 Van der Hart, D. L., Atalla R. Studies of microstructure in native celluloses using solid-state carbon-13 NMR // Macromolecules. – 1984. – Vol. 17. – P. 1465–1472. <https://doi.org/10.1021/ma00138a009>

1018 Van der Weijde T., Kamei C.L.A., Torres A.F., Vermerris W., Dolstra O., Visser R.G., et al. The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production // Front Plant Sci. – 2013. – P. 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00107>

1019 Van Walsum G.P., Allen S.G., Spencer M.J., Laser M.S., Antal M.J. Jr, Lynd L.R. Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol // Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Springer. – 1996. – P. 157-170. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0223-3_14

1020 Van Zyl E. M. & Coburn J. M. Hierarchical structure of bacterial-derived cellulose and its impact on biomedical applications // Current Opinion in Chemical Engineering. – 2019. – № 24. – 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.04.005>

1021 Vaniushenkova A.A., Kalenov S.V., Markvichev N.S., Belov A.A., Ivanova S.N. The hydrolytic destruction of modified cellulosic materials in conditions simulating a purulent wound // Biointerface Research in Applied Chemistry. 2020. – T. 10. – № 6. – C. 7265-7277. <https://doi.org/10.33263/BRIAC106.72657277>

1022 Varfolomeev S.D., Tsybenova S.B., Bykov V.I., Goldberg V.M. Thermocycle and evolutionary combinatorics in the genesis and evolution of protobiopolymers. basic kinetic principles // Doklady Physical Chemistry. – 2018. – T. 481. – № 2. – C. 117-120. <https://doi.org/10.1134/S0012501618080043>

1023 Varfolomeev S.D., Vol'eva V.B., Komissarova N.L., Kurkovskaya L.N., Malkova A.V., Ovsyannikova M.N., Gumerov F.M., Usmanov R.A. New possibilities in the synthesis of fuel oxygenates from renewable sources Russian Chemical Bulletin. – 2019. – T. 68. – № 4. – C. 717-724. <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2478-3>

1024 Varfolomeev S.D., Gachok I.V. Thermocycle and evolutionary combinatorics of macromolecules: the basis of primary processes of the origin of life // *Geochemistry International*. 2021. T. 59. № 11. C. 1083-1089. <https://doi.org/10.1134/S0023158421050037>

1025 Vasconcellos V.M., Farinas C.S., Ximenes E., Slininger P., Ladisch M. Adaptive laboratory evolution of nanocellulose-producing bacterium // *Biotechnol. Bioeng.* – 2019. – Vol. 116. – Issue 8. – P. 1923-1933. <https://doi.org/10.1002/bit.26997>

1026 Vazquez A., Foresti M.L., Cerrutti P., Galvagno M. Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus* // *J. Polym Environ.* – 2013. – № 21. – P. 545-554. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3>

1027 Velásquez-Riaño M., Bojacá V. Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates // *Cellulose.* – 2017. – Vol. 24. – P. 2677-2698. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1309-7>

1028 Verma M.L., Chaudhary R., Tsuzuki T., Barrow C.J., Puri M. Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: application in cellobiose hydrolysis // *Bioresour Technol.* – 2013. – № 135. – P. 2-6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.047>

1029 Villaverde J.J., Domingues R.M.A., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Pascoal Neto C., Ligeró P., Vega A. *Miscanthus* × *Giganteus* extractives: a source of valuable phenolic compounds and sterols // *J. Agric Food Chem.* – 2009. – № 57. – P. 3626–3631. <https://doi.org/10.1021/jf900071t>

1030 Vitta S., Thiruvengadam V. Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites // *Curr Sci.* – 2012. – № 102. – P. 1398–1405. <https://www.jstor.org/stable/24107797>

1031 Vogelnest L. J. Skin as a marker of general feline health: cutaneous manifestations of systemic disease // *J. Feline Med. Surg.* – 2017. – № 19. – P. 948–960. <https://doi.org/10.1177/1098612X17723246>

1032 Volova T.G., Shumilova A.A., Shidlovskiy I.P., Nikolaeva E.D., Sukovaty A.G., Vasiliev A.D., Shishatskaya E.I. Antibacterial properties of films of cellulose composites with silver nanoparticles and antibiotics // *Polymer Testing.* – 2018. – № 65. – P. 54-68. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.10.023>

1033 Volova T.G., Shumilova A.A., Nikolaeva E.D., Kirichenko A.K., Shishatskaya E.I. Biotechnological wound dressings based on bacterial cellulose and degradable copolymer P(3HB/4HB) // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – № 131. – P. 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.068>

1034 Volova T.G., Prudnikova S.V., Kiselev E.G., Nemtsev I.V., Vasiliev A.D., Kuzmin A.P., Shishatskaya E.I. Bacterial Cellulose (BC) and BC Composites: Production and Properties // *Nanomaterials.* – 2022. – № 12. – P. 192. <https://doi.org/10.3390/nano12020192>

1035 Von Sivers M., Zacchi G. Ethanol from lignocellulosics: a review of the economy // *Bioresour Technol.* – 1996. – № 56. – P. 131-140. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00018-1](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00018-1)

1036 Wahid R., Nielsen S. F., Hernandez V. M., Ward A. J., Gislum R., Jørgensen U. & Møller H. B. Methane production potential from *Miscanthus* sp.: Effect of harvesting time, genotypes and plant fractions // *Biosystems Engineering.* – 2015. – № 133. – P. 71-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2015.03.005>

1037 Wang H., Pu Y., Ragauskas A., Yang B. From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects // *Bioresource Technology.* – 2019. – Vol. 271. – P. 449–461. doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.072. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.10.024>

1038 Wang J., Tavakoli J. Tang Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review // *Carbohydrate Polymers.* – 2019. – Vol. 219. – P. 63-67. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.008>

1039 Wang R., Unrean P., Franzén C.J. Model-based optimization and scale-up of multi-feed simultaneous saccharification and co-fermentation of steam pre-treated lignocellulose enables high gravity ethanol production // *Biotechnol Biofuels.* – 2016. – № 9. – P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0500-7>

1040 Wang S., Li T., Chen C., Kong W., Zhu S., Dai J., ... & Hu L. Transparent, anisotropic biofilm with aligned bacterial cellulose nanofibers // *Advanced Functional Materials.* – 2018. – № 28(24). – P. 1707491. <https://doi.org/10.1002/adfm.201707491>

1041 Wang W., Li H., Zhang D., Jiang J., Cui Y., Qiu S., Zhou Y., Zhang X. Fabrication of biozymatic glucose biosensor based on novel gold nanoparticles-bacteria cellulose nanofibers nanocomposite // *Electroanalysis.* – 2010. – № 22. – P. 2543–2550. <https://doi.org/10.1002/elan.201000235>

1042 Wang W., Martin J. C., Huang R., et al. Synthesis of silicon complexes from rice husk derived silica nanoparticles // *Royal Society of Chemistry Advances.* – 2012. – V. 2. – P. 9036–9041. <https://doi.org/10.1039/C2RA20986A>

1043 Wang Y., Jiang L., Dong J., Li B., Shen J., Chen L., ... & He W. Three-dimensional network structure nitramine gun propellant with nitrated bacterial cellulose // *Journal of Materials Research and Technology.* – 2020. – № 9 (6). – 15094-15101. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.10.097>

1044 Wanichapichart P., Kaewnopparat S., Buaking K., Puthai W. Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xylinum* // *Journal of Vacuum Science and Technology.* – 2002. – No. 24. – P. 855-862.

1045 Watanabe, K. A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. A new bacterial cellulose substrate / K. Watanabe, Y. Eto, S. Takano, S. Nakamori, H. Shibai, S. Yamanaka // *Cytotechnology.* – 1993. – Vol. 13, No. 2. – P. 107-114.

1046 Watanabe K, Tabuchi M, Morinaga Y, Yoshinaga F. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. // Cellulose. – 1998. – Vol. 5. – P. 187-200. <https://doi.org/10.1023/A:1009272904582>

1047 Watanabe A., Morita S., Ozaki Y. Temperature-dependent changes in hydrogen bonds in cellulose I α studied by infrared spectroscopy in combination with perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy: comparison with cellulose I β // Biomacromolecules. – 2007. – Vol. 8. – P. 2969–2975. <https://doi.org/10.1021/bm700678u>

1048 Wattanasiriwech S., Wattanasiriwech D., Svasti J. Production of amorphous silica nanoparticles from rice straw with microbial hydrolysis pretreatment // Journal of Non-Crystalline Solids. – 2010. – V. 356. – P. 1228–1232. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2010.04.032>

1049 Wei J., Wang B., Li Z., Wu Z., Zhang M., Sheng N., ... & Chen S. A 3D-printable TEMPO-oxidized bacterial cellulose/alginate hydrogel with enhanced stability via nanoclay incorporation // Carbohydrate polymers. – 2020. – № 238. – P. 116207. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116207>

1050 Williams W. S., Cannon R. E. Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – № 55(10). – P. 2448-2452. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2448-2452.1989>

1051 Winter M. & Brodd R. J. What are batteries, fuel cells, and supercapacitors? // Chemical Reviews. – 2004. – Vol. 104(10). – P. 4245–4269. <https://doi.org/10.1021/cr020730k>.

1052 Wippermann J., Schumann D., Klemm D., Kosmehl H., Satehi-Gelani S. & Wahlers T. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose // European Journal of Vascular & Endovascular Surgery. – 2009. – № 37. – P. 592–596. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2009.01.007>

1053 Wood J. Bioinspiration in fashion—a review // Biomimetics. – 2019. – № 4(1). – P. 16–24. <https://doi.org/10.3390/biomimetics4010016>

1054 Wong H.C., Fear A.L., Calhoon R.D., Eichinger G.H., Mayer R., Amikam D., Benziman M., Gelfand D.H., Meade J.H., Emerick A.W., Bruner R., Ben-Bassat A., Tal R. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1990. – No. 87. – P. 8130-8134. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.8130>

1055 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).

1056 Wouk A. F. P. F., Diniz J. M., Círio S. M., Santos H., Baltazar E. L., & Acco A. Membrana biológica Biofill-estudo comparativo com outros agentes promotores da cicatrização da pele em suínos: Aspectos clínicos,

histopatológicos e morfológicos // Archives of Veterinary Science. – 1998. – № 3. – P. 31–37.

1057 Wu J.M., Liu R.H. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* // Carbohydrate Polymers. – 2012. – No. 90. – P. 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.003>

1058 Wu J. M. and Liu R. H. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater // J. Biosci. Bioeng. – 2013. – № 115. – P. 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.09.014>

1059 Wu R.Q., Li Z.X., Yang J.P., Xing X.H., Shao D.Y., Xing K.L. Mutagenesis induced by high hydrostatic pressure treatment: a useful method to improve the bacterial cellulose yield of a *Gluconoacetobacter xylinus* strain // Cellulose. – 2010. – № 17 (2). – P. 399-405. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9388-8>

1060 Wu S.C., Lia Y.K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization // Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic. – 2008. – Vol. 54, No. 3-4. – P. 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.12.021>

1061 Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies // Bioresour Technol. – 2005. – № 96. – P. 1959-1966. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.010>

1062 Xue S., Lewandowski I., Wang X. & Yi Z. Assessment of the production potentials of *Miscanthus* on marginal land in China // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2016. – № 54. – P. 932-943. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.040>

1063 Yamada Y., Hoshino K., Ishikawa T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level Biosci // Biotechnol. Biochem. – 1997. – № 61. – P. 1244-1251. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1244>

1064 Yamada Y., Yukphan P., Lan Vu H. T., Muramatsu Y., Ochaikul D., Tanasupawat S., et al. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*) // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2012. – Vol. 58. – P. 397–404. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.397>

1065 Yamamoto H., Horn F. In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation celluloses I α and I β as revealed by cross polarization/magicangle spinning (CP/MAS)13C NMR spectroscopy // Cellulose. – 1994. – Vol. 1. – P. 57–66. <https://doi.org/10.1007/BF00818798>

1066 Yamanaka S., Watanabe K., Kitamura N., Iguchi M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y., Uryu, M. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose // Journal of materials science. – 1989. – Vol. 24(9). – 3141-3145.

1067 Yamanaka S., Sugiyama J. Structural modification of bacterial cellulose // Cellulose. – 2000. – Vol. 7. – P. 213–225. <https://doi.org/10.1023/A:1009208022957>

1068 Yan X., Cheng J.-R., Wang Y.-T., Zhu M.-J. Enhanced lignin removal and enzymolysis efficiency of grass waste by hydrogen peroxide synergized dilute alkali pretreatment // Bioresource Technology. – 2020. – Vol. 301. – P. 122756. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122756>

1069 Yan Z., Chen S., Wang H., Wang B., Jiang J., Biosynthesis of bacterial cellulose/ multi-walled carbon nanotubes in agitated culture // Carbohydr. Polym. – 2008. – 74. – P. 659–665. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.028>

1070 Yang F., Afzal W., Cheng K., Liu N., Pauly M., Bell A. T., ... & Prausnitz J. M. Nitric-acid hydrolysis of Miscanthus giganteus to sugars fermented to bioethanol // Biotechnology and bioprocess engineering. – 2015. – № 20(2). – P. 304-314. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-014-0658-4>

1071 Yang H., Zhang Y., Kato R. & Rowan S. J. Preparation of cellulose nanofibers from *Miscanthus x. Giganteus* by ammonium persulfate oxidation // Carbohydrate polymers. – 2019. – № 212. – P. 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.008>

1072 Yang X.Y., Huang C., Guo H.J., Xiong L., Li Y.Y., Zhang H.R., Chen X.D. Bioconversion of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) acid hydrolysate to bacterial cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* // Journal of Applied Microbiology. – 2013. – Vol. 115, № 4. – P. 995-1002. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12255>

1073 Yang Y., Jia J., Xing J., Chen J. and Lu S. Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* CIs26 // Carbohydr. Polym. – 2013. – № 92. – P. 2012–2017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.065>

1074 Yang H., Zhu C.-L., Yang J.-Z., Nie Y., Chen C.-T. & Sun D.-P. Recent advances in bacterial cellulose // Cellulose. – 2014. – 21(1). – P. 1–30. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z>

1075 Yang Z.W., Ji B.P., Zhou F., Li B., Luo Y., Yang L., Li T. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice // J. Sci. Food Agric. – 2009. – № 89. – P. 150-156. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3422>

1076 Yin X., Yu C., Zhang X., Yang J., Lin Q., Wang J., Zhu Q. Comparison of succinylation methods for bacterial cellulose and adsorption capacities of bacterial cellulose derivatives for Cu²⁺ ion // Polymer Bulletin. – 2011. – № 67(3). – P. 401-412. <https://doi.org/10.1007/s00289-010-0388-5>

1077 Yordshahi A. S., Moradi M., Tajik H., Molaei R. Design and preparation of antimicrobial meat wrapping nanopaper with bacterial cellulose and postbiotics of lactic acid bacteria // International Journal of Food Microbiology. – 2020. – № 321. – Article 108561. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108561>.

1078 Younesi M., Wu X., Akkus O. Controlled mercerization of bacterial cellulose provides tunability of modulus and ductility over two orders of magnitude // *J. Mech Behav Biomed.* – 2019. – № 90. – P. 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.11.005>

1079 Yu Z., Jameel H., Chang H., et al. Evaluation of the factors affecting avicel reactivity using multi-stage enzymatic hydrolysis // *Biotechnology and Bioengineering.* – 2011. – Vol. 109. – № 5. – P. 1131–1139. <https://doi.org/10.1002/bit.24386>

1080 Yuan H., Chen L., Hong F. F. Zhu M. Evaluation of nanocellulose carriers produced by four different bacterial strains for laccase immobilization // *Carbohydr. Polym.* – 2018. – Vol. 196. – P. 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.055>

1081 Yuan H. W., Tan L., Kida K., Morimura S., Sun Z. Y. & Tang Y. Q. Potential for reduced water consumption in biorefining of lignocellulosic biomass to bioethanol and biogas // *Journal of bioscience and bioengineering.* – 2021. – № 131 (5). – P. 461-468. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.12.015>

1082 Yunoki S., Osada Y., Kono H. & Takai M. Role of ethanol in improvement of bacterial cellulose production: analysis using ¹³C-labeled carbon sources // *Food science and technology research.* – 2007. – № 10 (3). – P. 307-313. <https://doi.org/10.3136/fstr.10.307>

1083 Yurkevich D.I., Kutysenko V.P. *Medusomyces* (Tea Fungus): A scientific history, composition, features of physiology and metabolism // *Biophysics.* – 2002. – № 47. – P. 1116-1129.

1084 Zaar K. Visualization of pores (export sites) correlated with cellulose production in the envelope of the Gram-negative bacterium *Acetobacter xylinum* // *The Journal of Cell Biology.* – 1979. – No. 80. – P. 773-777. <https://doi.org/10.1083/jcb.80.3.773>

1085 Zabed H., Faruq G., Sahu J.N., Azirun M.S., Hashim R., Nasrulhaq A. Boyce Bioethanol production from fermentable sugar juice // *Sci World J.* – 2014. – P. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/957102>

1086 Zabed H., Sahu J.N., Boyce A.N. & Faruq G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches // *Renewable & Sustainable Energy Reviews.* – 2016. – № 66. – P. 751-774. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>

1087 Zabed H., Faruq G., Sahu J., Boyce A., Ganesan P. A comparative study on normal and high sugary corn genotypes for evaluating enzyme consumption during dry-grind ethanol production // *Chem Eng J.* – 2016, a. – № 287. – P. 691-703. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.11.082>

1088 Zabed H.M., Akter S., Yun J., et al. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* – 2019. – Vol. 105. – P. 105–128. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.048>

1089 Zahan K.A., Azizul N.M., Mustapha M., Tong W.Y., Rahman M.S.A., & Sahuri I.S. Application of bacterial cellulose film as a biodegradable and

antimicrobial packaging material // *Materials Today: Proceedings.* – 2020. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.201>

1090 Zhang S., Winstrand S., Guo X., Chen L., Hong F. & Jönsson L. J. Effects of aromatic compounds on the production of bacterial nanocellulose by *Gluconacetobacter xylinus* // *Microbial cell factories.* – 2014. – № 13(1). – P. 1-11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-62>

1091 Zhang Y., Oates L.G., Serate J., Xie D., Pohlmann E., Bukhman Y.V., Karlen S.D., Young M.K., Higbee A., Eilert D., Sanford G.R., Piotrowski J.S., Cavalier D., Ralph J., Coon J.J., Sato T.K., Ong R.G. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits // *GCB Bioenergy.* – 2018. – P. 1-16. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12533>

1092 Zhao X., Zhang L., Liu D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose // *Biofuels Bioprod Bioref.* – 2012. – № 6. – P. 465-482. <https://doi.org/10.1002/bbb.1331>

1093 Zeng X., Liu J., Chen J., Wang Q., Li Z., Wang H. Screening of the common culture conditions affecting crystallinity of bacterial cellulose // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* – 2011. – Vol. 38, No. 12. – P. 1993-1999. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0989-5>

1094 Zeng X., Small D.P., Wan W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup // *Carbohydrate Polymers.* – 2011. – No. 85. – P. 506-513. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.034>

1095 Zheng Y., Pan Z. & Zhang R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production // *International journal of agricultural and biological engineering.* – 2009. – 2(3). – P. 51-68.

1096 Zeng Y., Himmel M.E., Ding S.-Y. Visualizing chemical functionality in plant cell walls // *Biotechnol. Biofuels.* – 2017. – № 10 (1). – P. 263. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0953-3>

1097 Zhang C., Cao J., Zhao S., et al. Biocompatibility evaluation of bacterial cellulose as a scaffold material for tissue-engineered corneal stroma // *Cellulose.* – 2020. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-02979-0>

1098 Zhang H., Lopez P.C., Holland C., et al. The multi-feedstock biorefinery – Assessing the compatibility of alternative feedstocks in a 2G wheat straw biorefinery process // *GCB Bioenergy.* – 2018. – Vol. 10, № 12. – P. 946–959. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12557>

1099 Zhang S., Winstrand S., Chen L., Li D., Jönsson L.J., Hong F. Tolerance of the nanocellulose-producing bacterium *Gluconacetobacter xylinus* to lignocellulose-derived acids and aldehydes // *J. Agric. Food Chem.* – 2014 a. – № 62. – P. 9792–9799 <https://doi.org/10.1021/jf502623s>

1100 Zhang S., Winstrand S., Guo X., Chen L., Hong F., Jönsson L.J. Effects of aromatic compounds on the production of bacterial nanocellulose by

Gluconacetobacter xylinus // Microbial Cell Factories. – 2014 b. – № 13. – P. 62.
<http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/62>

1101 Zhang X. J., Wang A. P., Shi T. Y., Zhang J., Xu H., Wang D. Q., et al. The psychosocial adaptation of patients with skin disease: a scoping review // BMC Public Health. – 2019. – № 19. – P. 1404. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7775-0>

1102 Zhang Y., Oates L.G., Serate J., Xie D., Pohlmann E., Bukhman Y.V., Karlen S.D., Young M.K., Higbee A., Eilert D., Sanford G.R., Piotrowski J.S., Cavalier D., Ralph J., Coon J.J., Sato T.K., Ong R.G. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits // GCB Bioenergy. – 2018. – P. 1-16. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12533>

1103 Zhang Y., Yiran S. U. N., Fei Y. U. & Jie M. A. Research progress on the application of bacterial cellulose and its composites in environmental field [J] // Acta Materiae Compositae Sinica, 复合材料学报. – 2021. – № 38(8). – P. 2418-2427. <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20210402.002>

1104 Zhao X., Xiong L., Zhang M. & Bai F. Towards efficient bioethanol production from agricultural and forestry residues: exploration of unique natural microorganisms in combination with advanced strain engineering // Bioresource technology. – 2016. – P. 215. – P. 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.158>

1105 Zhao Y., Damgaard A., Liu S., et al. Bioethanol from corn stover – Integrated environmental impacts of alternative biotechnologies // Resources, Conservation and Recycling. – 2020. – Vol. 155, Issue 104652. – P. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104652>

1106 Zhong C., Zhang G. C., Liu M., Zheng X. T., Han P. P. and Jia S. R. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – № 97. – P. 6189–6199. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4908-8>

1107 Zhong C. Industrial-Scale production and applications of bacterial cellulose // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – Vol. 8, Issue 605374. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>

1108 Zhou L.L., Sun D.P., Hu L.Y., Li Y.W., Yang J.Z. Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* // Journal of industrial microbiology and biotechnology. – 2007. – No. 34. – P. 483-489. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0218-4>

1109 Zhu X., He B., Zhao C., Fan R., Zhang L., Wang G., et al. Net-immobilization of β -glucosidase on nonwoven fabrics to lower the cost of «cellulosic ethanol» and increase // Cell Convers Sci Rep. – 2016. – P. 6. <https://doi.org/10.1038/srep23437>

1110 Zoubiri F.Z., Rihani R., Bentahar F. Golden section algorithm to optimise the chemical pretreatment of agro-industrial waste for sugars extraction // Fuel. – 2020. – V. 266, Issue 117028. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117028>

1111 Zhu J., Luo X., Tian S., Gleisner R., Negrone J., Horn E. Efficient ethanol production from beetle-killed lodgepole pine using SPORL technology and *Saccharomyces cerevisiae* without detoxification // TAPPI J. – 2011. – № 10. – P. 9-18.

1112 Zhu Y., Lee Y., Elander R.T. Optimization of dilute-acid pretreatment of corn stover using a high-solids percolation reactor. In: Proceedings of the twenty-sixth symposium on biotechnology for fuels and chemicals / Springer. – 2005. – P. 1045–1054.

1113 Zogaj X., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W., Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix // Mol. Microbiol. – 2001. – V. 39. – P. 1452. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x>

1114 Zou X., Wu G., Stagge S., Chen L., Jönsson L.J., Hong F., Xiaozhou Zou, et al. Comparison of tolerance of four bacterial nanocellulose-producing strains to lignocellulose-derived inhibitors // Microb Cell Fact. – 2017. – № 16. – P. 229. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0846-y>

1115 Zou X., Zhang S., Chen L., Hu J., Hong F.F. Determination of live and dead *Komagataeibacter xylinus* cells and first attempt at precise control of inoculation in nanocellulose production // Microbial Biotechnology. – 2020. – № 13(2). – P. 458–469. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13494>

1116 Zoubiri F.Z., Rihani R., Bentahar F. Golden section algorithm to optimise the chemical pretreatment of agro-industrial waste for sugars extraction // Fuel. – 2020. – Vol. 266. – Issue 117028. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117028>

1117 Zugenmaier P. Crystalline Cellulose and Derivatives: Characterization and Structures, Springer Series in Wood Science. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. – 285 p.

1118 Zwer P., Wrigley C., Batey I., Miskelly D., et al. Oats: grain-quality characteristics and management of quality requirements // In: Wrigley C. Cereal Grains: Assessing and Managing Quality, second ed. – Cambridge: Woodhead Publishing, 2017. – P. 235–256. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100719-8.00010-3>

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № ТП-72
Экз. № 3



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИПХЭТ СО РАН,
профессор

С.В. Сысолятин
С.В. Сысолятин

« *15* » *мая* 2015 г.

**Технологическая пропись
получения технической целлюлозы
из плодовых оболочек овса комбинированным способом
ТП 10018691.01101.00070**

Заместитель директора по
научной работе, д.х.н.

С.Г. Ильясов
С.Г. Ильясов
« *07* » *мая* 2015 г.

Гл. специалист по ОТ и ЭБ, к.т.н.

А.Ю. Докучаев
А.Ю. Докучаев
« *07* » *мая* 2015 г.

РАЗРАБОТЧИКИ:

Заведующая лаб. № 8, к.х.н.

В.В. Будаева
В.В. Будаева
« *05* » *мая* 2015 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

В.Н. Золотухин
В.Н. Золотухин
« *05* » *мая* 2015 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8

О.В. Байбакова
О.В. Байбакова
« *05* » *мая* 2015 г.

Начальник ПСЛВ, к.т.н.

Ю.А. Крюков
Ю.А. Крюков
« *05* » *05* 2015 г.

Нормоконтролер, инженер ГИО

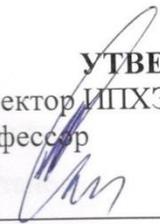
И.Д. Попова
И.Д. Попова
« *05* » *05* 2015 г.

Бийск 2015

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

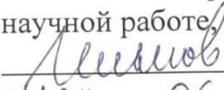
Инв. № ТП-73
Экз. № 3



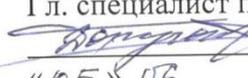
УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН,
профессор

С. В. Сысолятин
« 16 » июня 2015 г.

**Технологическая пропись
получения биоэтанола из мискантуса и плодовых оболочек овса
ТП 10018691.01101.00071**

Заместитель директора по
научной работе, д.х.н.


С.Г. Ильясов
« 10 » 06 2015 г.

Гл. специалист по ОТ и ЭБ, к.т.н.

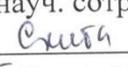

А.Ю. Докучаев
« 05 » 06 2015 г.

РАЗРАБОТЧИКИ:

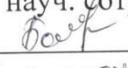
Заведующая лаб. № 8, к.х.н.


В.В. Будаева
« 5 » июня 2015 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.


Е.А. Скиба
« 5 » июня 2015 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8


О.В. Байбакова
« 5 » июня 2015 г.

Начальник ПСЛВ, к.т.н.


Ю.А. Крюков
« 05 » 06 2015 г.

Нормоконтролер, инженер ГИО


И.Д. Попова
« 05 » 06 2015 г.

Бийск 2015

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № ТП-132
Экз. № 3



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИПХЭТ СО РАН,
профессор

С. В. Сысолятин

« 11 » марта 2016 г.

**Технологическая пропись
получения биоэтанола из лигноцеллюлозного материала мискантуса
или плодовых оболочек овса
ТП 10018691.01101.00130**

Заместитель директора по
научной работе, д.х.н.
Ильясов С.Г. Ильясов
« 11 » марта 2016 г.

Гл. специалист по ОЭ и ЭБ, к.т.н.
Докучаев А.Ю. Докучаев
« 10 » марта 2016 г.

РАЗРАБОТЧИКИ:
Заведующая лаб. № 8, к.х.н.
Будаева В.В. Будаева
« 10 » марта 2016 г.

Начальник ПСЛВ, к.т.н.
Крюков Ю.А. Крюков
« 10 » марта 2016 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
Скиба Е.А. Скиба
« 10 » марта 2016 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8
Байбакова О.В. Байбакова
« 10 » марта 2016 г.

Нормоконтролер, инженер ГИО
Попова И.Д. Попова
« 10 » марта 2016 г.

Бийск 2016

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИКО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)

Инв. № ТП-138
Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН,
профессор

С. В. Сысолятин
«08» июня 2016 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОПИСЬ

Химическая обработка плодовых оболочек овса с целью получения субстратов
для биотехнологической переработки
ТП 10018691.02101.00136

Заместитель директора по
научной работе, д.х.н.

Ильясов С.Г. Ильясов
«07» июня 2016 г.

Гл. специалист по ОТ и ЭБ, к.т.н.

Докучаев А.Ю. Докучаев
«07» июня 2016 г.

РАЗРАБОТЧИКИ:

Заведующая лаб. № 8, к.х.н.

Будаева В.В. Будаева
«06» июня 2016 г.

Начальник ПСДВ, к.т.н.

Крюков Ю.А. Крюков
«06» июня 2016 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Павлов И.Н. Павлов
«06» июня 2016 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Скиба Е.А. Скиба
«06» июня 2016 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8

Байбакова О.В. Байбакова
«06» июня 2016 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Макарова Е.И. Макарова
«06» июня 2016 г.

Нормоконтролер, инженер ГИО

Попова И.Д. Попова
«07» июня 2016 г.

Бийск 2016

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИКО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)

Инв. № ТП-139
Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИПХЭТ СО РАН,
профессор

С. В. Сысолятин С. В. Сысолятин

«*07*» *июня* 2016 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОПИСЬ

**энзимного способа получения растворов глюкозы из плодовых оболочек овса на
установке комплексной переработки растительного сырья
в целлюлозосодержащие продукты и исходные компоненты
для химического синтеза и биотопливо
ТП 10018691.02101.00137**

Заместитель директора по
научной работе, д.х.н.

Ильясов С.Г. Ильясов
«*07*» *июня* 2016 г.

Гл. специалист по ОТ и ЭБ, к.т.н.

Докучаев А.Ю. Докучаев
«*07*» *июня* 2016 г.

РАЗРАБОТЧИКИ:

Заведующая лаб. № 8, к.х.н.

Будаева В.В. Будаева
«*22*» *июня* 2016 г.

Начальник ЦСЛВ, к.т.н.

Крюков Ю.А. Крюков
«*22*» *июня* 2016 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Скиба Е.А. Скиба
«*22*» *июня* 2016 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Павлов И.Н. Павлов
«*22*» *июня* 2016 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Макарова Е.И. Макарова
«*22*» *июня* 2016 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8

Байбакова О.В. Байбакова
«*22*» *июня* 2016 г.

Нормоконтролер, инженер ГИО

Попова И.Д. Попова
«*22*» *июня* 2016 г.

Бийск 2016

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИКО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)

Инв. № ТП-140
Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН,
профессор

С. В. Сысолятин

« 07 » июня 2016 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОПИСЬ

микробиологического синтеза биоэтанола на средах энзимных гидролизатов и
ректификации биоэтанола на установке комплексной переработки растительного сырья
в целлюлозосодержащие продукты и исходные компоненты для химического синтеза и
биотопливо

ТП 10018691.02101.00138

Заместитель директора по
научной работе, д.х.н.

Ильясов С.Г. С.Г. Ильясов

« 07 » июня 2016 г.

Гл. специалист по ОТ и ЭБ, к.т.н.

Докучаев А.Ю. А.Ю. Докучаев

« 07 » июня 2016 г.

РАЗРАБОТЧИКИ:

Заведующая лаб. № 8, к.х.н.

Будаева В.В. В.В. Будаева

« 06 » июня 2016 г.

Начальник ПСЛВ, к.т.н.

Крюков Ю.А. Ю.А. Крюков

« 06 » июня 2016 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Павлов И.Н. И.Н. Павлов

« 06 » июня 2016 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Скиба Е.А. Е.А. Скиба

« 06 » июня 2016 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8

Байбакова О.В. О.В. Байбакова

« 06 » июня 2016 г.

Мл. научн. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Макарова Е.И. Е.И. Макарова

« 06 » июня 2016 г.

Нормоконтролер, инженер ГИО

Попова И.Д. И.Д. Попова

« 07 » июня 2016 г.

Бийск 2016

Федеральное агентство научных организаций
 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
 ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИКО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
 Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)

Инв. № ТЗ- 178
 Экз. № 1

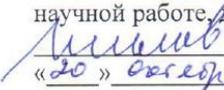
УТВЕРЖДАЮ
 Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор


 С.В. Сысолятин
 «20» августа 2016 г.

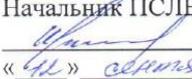
ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ НА ПРОЕКТИРОВАНИЕ

установки, основанной на блочных принципах, для проведения отдельных и совмещенных процессов с использованием химических реактивов и биотехнологических процедур
ТЗ 10018691.02101.00176

Заместитель директора по
 научной работе, д.х.н.


 С.Г. Ильясов
 «20» августа 2016 г.

Начальник ПСЛВ, к.т.н.


 Ю.А. Крюков
 «20» августа 2016 г.

Гл. специалист по ОТ и ЭБ, к.т.н.

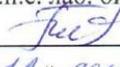

 А.Ю. Докучаев
 «12» сентября 2016 г.

РАЗРАБОТЧИКИ:

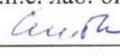
Заведующая лаб. биоконверсии, к.х.н.


 В.В. Будаева
 «12» сентября 2016 г.

С.н.с. лаб. биоконверсии, к.т.н.


 И.Н. Павлов
 «12» сентября 2016 г.

С.н.с. лаб. биоконверсии, к.т.н.


 Е.А. Скиба
 «12» сентября 2016 г.

Бийск 2016

УТВЕРЖДАЮ

Директор
Института катализа СО РАН,
член-корр. РАН

В.И. Бухтияров

«30» октября 2015 г.



АКТ № 1

испытания экспериментальных образцов биоэтанола-сырца

В соответствии с п. 2 Соглашения о сотрудничестве между Институтом проблем химико-энергетических технологий СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск) и Институтом катализа СО РАН (ИК СО РАН, г. Новосибирск) при выполнении научно-исследовательской работы «Исследование возможности применения биоэтанола, получаемого из непищевого сырья, в процессах каталитической дегидратации биоэтанола в этилен» от 27 октября 2015 г. сотрудниками ИПХЭТ СО РАН заведующей лабораторией биоковерсии к.х.н. В.В. Будаевой, старшим научным сотрудником к.т.н. Скиба Е.А. и аспирантом, м.н.с. О.В. Байбаковой передано два экспериментальных образца биоэтанола-сырца из плодовых оболочек овса (ПОО) общим объемом около 2 л, в том числе:

– экспериментальный образец биоэтанола-сырца **ПОО-838** объемом 1000 мл с крепостью 57 об. %, наработанный 07.06.2015-11.06.2015 гг. из плодовых оболочек овса согласно технологическим прописям ТП 10018691.01101.00072 «Технологическая пропись получения технической целлюлозы из плодовых оболочек овса комбинированным способом» и ТП 10018691.01101.00071 «Технологическая пропись получения биоэтанола из мискантуса и плодовых оболочек овса» в соответствии с запатентованным способом (Скиба Е.А., Байбакова О.В., Будаева В.В., Сакович Г.В. Способ получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья – заявка на изобретение, регистрационный номер № 2015108958) и актом внедрения от 09.07.2015 г.

– экспериментальный образец биоэтанола-сырца **ПОО-830** объемом 1000 мл с крепостью 61 об. %, наработанный 15.06.2015-19.06.2015 гг. из плодовых оболочек овса согласно технологическим прописям ТП 10018691.01101.00072 «Технологическая пропись получения технической целлюлозы из плодовых оболочек овса комбинированным способом» в установке с роторно-пульсационным аппаратом и ТП 10018691.01101.00071 «Технологическая пропись получения биоэтанола из мискантуса и плодовых оболочек овса» в соответствии с запатентованным способом (Скиба Е.А., Байбакова О.В., Будаева В.В., Сакович Г.В. Способ получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья – заявка на изобретение, регистрационный номер № 2015108958) и актом внедрения от 09.07.2015 г.

В ИК СО РАН выполнены испытания образцов биоэтанола-сырца **ПОО-830** и **ПОО-838** и определен их качественный и количественный состав. Качественный состав образцов установлен методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Shimadzu GCMS2010 Ultra. Параметры анализа ГХ-МС и вид хроматограммы приведены в Приложении 1. Количественный анализ произведен методом газовой хроматографии на приборе Хромос ГХ-1000. Параметры анализа ГХ и вид хроматограмм приведены в Приложении 2. Результаты испытаний свойств образцов биоэтанола приведены в Таблице.

Таблица. Результаты анализа образцов биоэтанола-сырца ПОО-830 и ПОО-838

Наименование показателя	Шифр образца биоэтанола-сырца (ИПХЭТ СО РАН)	
	ПОО-830	ПОО-838
Плотность, г/мл	0,907	0,915
Содержание спирта в биоэтаноле-сырце, об, %	61	57
Состав биоэтанола-сырца в расчете на 100% этанол, %		
- Этанол	97,07	99,08
- Пропанол	2,06	0,18
- Ацетальдегид	0,43	0,42
- Метилбутанолы	0,25	0,13
- Изобутанол	0,14	0,10
- Этилацетат	0,05	0,09

Установлено, что помимо этанола и воды, в образцах содержится ацетальдегид, этилацетат, а также более тяжелые спирты – пропанол-1, изобутанол, 3-метилбутанол-1 и 3-метилбутанол-2. Количество этанола без учета воды (в расчете на 100 % этанол) в образцах **ПОО-830** и **ПОО-838** составило 97,1 % и 99,1%, соответственно. Более низкая концентрация этанола в образце **ПОО-830** объясняется повышенным содержанием пропанола (около 2,1 %) в сравнении с образцом **ПОО-838**.

Образцы биоэтанола-сырца **ПОО-830** и **ПОО-838** обладают достаточно высоким содержанием этанола для дальнейшей ректификации. После получения из образцов ПОО-830 и ПОО-838 биоэтанола с содержанием этанола не менее 94%, биоэтанол может быть применен в исследовании возможности его каталитической переработки в биоэтилен.

Приложения:

1. Отчет ГХМС: «Результат газовой хроматографии — масс-спектрометрии Shimadzu GCMS2010 Ultra экспериментальных образцов биоэтанола-сырца», 1 стр.
2. Отчет ГХ: «Результаты газовой хроматографии Хромос ГХ-1000 экспериментальных образцов биоэтанола-сырца», 2 стр.

Группа комплексных технологических проектов ИК СО РАН:

Руководитель группы
к.т.н.

 Чумаченко В.А.

« 2 » ноября 2015 г.

Старший научный сотрудник
к.т.н.

 Овчинникова Е.В.

Лаборатория каталитических процессов синтеза элементоорганических соединений ИК СО РАН:

Заведующий лабораторией
д.х.н.

 Адонин Н.Ю.

« 2 » ноября 2015 г.

Старший научный сотрудник
к.х.н.

 Приходько С.А.

УТВЕРЖДАЮ



Директор
Института катализа СО РАН,
член-корр. РАН

В.И. Бухтияров

«18» января 2016 г.

АКТ № 1

применения экспериментальных образцов биоэтанола-ректификата РБЭО-10 и РБЭО-11, полученных из экспериментальных образцов биоэтанола-сырца ПОО-830 и ПОО-838 (ИПХЭТ СО РАН)

В соответствии с п.5 Соглашения о сотрудничестве между Институтом проблем химико-энергетических технологий СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск) и Институтом катализа СО РАН (ИК СО РАН, г. Новосибирск) при выполнении научно-исследовательской работы «Исследование возможности применения биоэтанола, получаемого из непищевого сырья, в процессах каталитической дегидратации биоэтанола в этилен» от 27 октября 2015 г. на лабораторной установке ИК СО РАН проведены экспериментальные исследования синтеза этилена путем каталитической дегидратации биоэтанола.

В эксперименте исследовались образцы биоэтанола-ректификата **РБЭО-10** и **РБЭО-11** (Акт № 2 испытания экспериментальных образцов биоэтанола-ректификата от 15 декабря 2015 г.), полученные в ИК СО РАН из экспериментальных образцов биоэтанола-сырца **ПОО 830** и **ПОО 838** (Акт № 1 испытания экспериментальных образцов биоэтанола-сырца от 30 октября 2015 г.), наработанных в период с 07 июля по 19 июля 2015г. в ИПХЭТ СО РАН из плодовых оболочек овса согласно технологическим прописям ТП 10018691.01101.00072 и ТП 10018691.01101.00071 в соответствии с запатентованным способом (Заявка № 2015108958) и актом внедрения от 09.07.2015 г.

Для сравнения использовался этанол производства ОАО «Кемеровская фармацевтическая фабрика» г. Кемерово: «Этиловый спирт. Этанол. Раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм 95%», ЛРС 000279/10, (ЭМ).

Состав газовой смеси до и после каталитического реактора определялся на хроматографе Shimadzu, оснащенный детекторами ПИД и ДТП. Результаты, полученные на разработанном в ИК СО РАН алюмооксидном катализаторе (Заявка на изобретение № 2015137678 от 03.09.2015г) в виде фракции 0,25-0,5 мм при температуре 400 °С и времени контакта 0,27с приведены в Таблице. Этилен и диэтиловый эфир рассматривались как «целевой продукт» процесса дегидратации этанола, поскольку диэтиловый эфир является промежуточным продуктом, который с повышением степени превращения этанола полностью расходуется на образование этилена.

Таблица. Результаты каталитической дегидратации биоэтанола-ректификата в этилен в лабораторном реакторе

Наименование показателя	Тип сырья для синтеза этилена		
	«Этанол медицинский»	Биоэтанол-ректификат	Биоэтанол-ректификат очищенный
	ЭМ	РБЭО-10	РБЭО-11
1. Содержание этанола в сырье, об.%	93	93	94
2. Массовая доля органических примесей в исходном сырье в пересчете на безводный спирт, г/дм ³	0,02	11	4

Продолжение Таблицы

Наименование показателя	ЭМ	РБЭО-10	РБЭО-11
3. Состав исходной газовой смеси, мол. %			
- Этанол : Н ₂ O	71,1 : 13,6	71,1 : 13,9	71,5 : 13,7
- Сивушное масло (в т.ч. пропанол)	---	0,57 (0,54)	0,24 (0,23)
- Сумма ацетальдегида и этилацетата	---	0,18	0,01
- Азот	15,3	14,3	14,6
4. Выход «целевого продукта», Y _{ЭЭ} , мол.%	87	78	79
5. Селективность по продуктам, S, мол.%,			
- целевому продукту, S _{ЭЭ}	96	91	94
- побочным: ацетальдегиду, С ₄ ⁺ , и др.	4	9	6
6. Общий расход этанола на проведение опыта в масштабе лабораторной установки, мл	500	500	500

Установлено, что применение содержащих 11-4 г/дм³ органических примесей образцов биоэтанола-ректификата **РБЭО-10** и **РБЭО-11** в реакции дегидратации на алюмооксидном катализаторе при 400°С и времени контакта 0,27с характеризуется величинами Y_{ЭЭ}=78-79мол.% при S_{ЭЭ}=91-94мол.%, что ниже получаемых при использовании «медицинского этанола» **ЭМ** величин Y_{ЭЭ} и S_{ЭЭ}, соответственно, на ~10% и ~4%. Для тестирования образцов биоэтанола в условиях лабораторной каталитической установки требуется не менее 500 мл биоэтанола-ректификата с содержанием этанола не менее 94 %.

В результате применения неочищенного биоэтанола-ректификата **РБЭО-10** снижается активность алюмооксидного катализатора в дегидратации этанола и выход «целевого продукта». Применение очищенного биоэтанола-ректификата **РБЭО-11** с более чем в два раза сниженным содержанием органических примесей, по сравнению с образцом **РБЭО-10**, мало влияет на активность катализатора и выход «целевого продукта», однако позволяет в 1,5 раза уменьшить образование побочных продуктов.

Возможными причинами снижения активности алюмооксидного катализатора могут быть: зауглероживание катализатора в результате дегидратации С3-С5 спиртов, содержащихся в биоэтаноле; нежелательное изменение кислотности катализатора в результате воздействия неорганических микропримесей, оставшихся в биоспирте. в частности, после стадии обработки биомассы гидроксидом натрия.

Экспериментальные образцы биоэтанола-сырца **ПОО-830** и **ПОО-838** (ИПХЭТ СО РАН) могут быть использованы для получения этилена каталитической дегидратацией биоэтанола после обязательных стадий очистки и тонкой ректификации, позволяющих получить биоэтанол-ректификат с содержанием микроколичеств органических и неорганических примесей не более 21 мг/дм³. Для определения интервала допустимых количеств микропримесей в биоэтаноле, направляемом в процесс каталитического синтеза биоэтилена, необходимо проведение дополнительных исследований.

Руководитель группы комплексных технологических проектов ИК СО РАН

 к.т.н. Чумаченко В.А.

Старший научный сотрудник

 к.т.н. Овчинникова Е.В.

Младший научный сотрудник

 Банзаракцаева С.И.

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.

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № ПМ-82
Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор


С.В. Сысолятин
«11» сентября 2017 г.

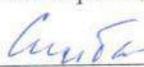
**ПРОГРАММА И МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ
НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ
ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ
ПМ 10018691.02100.00082**

Заведующая лабораторией биоконверсии,
к.х.н.


В.В. Будаева
«11» сентября 2017 г.

РАЗРАБОТЧИКИ

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.


Е.А. Скиба
«11» сентября 2017 г.

Научный сотрудник лаборатории биоконверсии,
к.т.н.


Е.И. Кашеева
«11» сентября 2017 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО


И.Д. Попова
«11» сентября 2017 г.

БИЙСК 2017

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № ПМ-83
Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор

С.В. Сысолятин

«11» сентября 2017 г.

**ПРОГРАММА И МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ К ФЕРМЕНТАТИВНОМУ
ГИДРОЛИЗУ СУБСТРАТОВ ИЗ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ
ПМ 10018691.02100.00083**

Заведующая лабораторией биоконверсии,
к.х.н.

В.В. Будаева В.В. Будаева
«11» сентября 2017 г.

РАЗРАБОТЧИКИ

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.

Е.А. Скиба Е.А. Скиба
«11» сентября 2017 г.

Научный сотрудник лаборатории биоконверсии,
к.т.н.

Е.И. Кашеева Е.И. Кашеева
«11» сентября 2017 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО

И.Д. Попова И.Д. Попова
«11» сентября 2017 г.

БИЙСК 2017

Федеральное агентство научных организаций

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № ПИМ-84

Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТУ СО РАН, профессор

С.В. Сысолятин

«11» сентября 2017 г.

**ПРОГРАММА И МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ВОДОРОДНЫХ ИОНОВ
В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТАХ, ПИТАТЕЛЬНЫХ И
КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ ИЗ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ**

ПМ 10018691.02100.00084

Заведующая лабораторией биоконверсии,
к.х.н.

В.В. Будаева В.В. Будаева
«11» сентября 2017 г.

РАЗРАБОТЧИКИ

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.

Е.А. Скиба Е.А. Скиба
« » 2017 г.

Научный сотрудник лаборатории биоконверсии,
к.т.н.

Е.И. Кашеева Е.И. Кашеева
«11» сентября 2017 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО

И.Д. Попова И.Д. Попова
«11» сентября 2017 г.

БИЙСК 2017

Федеральное агентство научных организаций

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № ПМ-85

Экз. № 1

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор


С.В. Сысолятин

«11» сентября 2017 г.

**ПРОГРАММА И МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РЕДУЦИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В
ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТАХ, ПИТАТЕЛЬНЫХ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ
СРЕДАХ ИЗ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО
СЫРЬЯ**

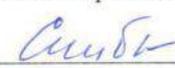
ПМ 10018691.02100.00085

Заведующая лабораторией биоконверсии,
к.х.н.


В.В. Будаева
«11» сентября 2017 г.

РАЗРАБОТЧИКИ

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.


Е.А. Скиба
«11» сентября 2017 г.

Научный сотрудник лаборатории биоконверсии,
к.т.н.


Е.И. Кашеева
«11» сентября 2017 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО


И.Д. Попова
«11» сентября 2017 г.

БИЙСК 2017

Федеральное агентство научных организаций

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № ПМ-86

Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор

С.В. Сысолятин

« 11 » сентября 2017 г.

ПРОГРАММА И МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ.
АНАЛИЗ САХАРОВ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТАХ, ПИТАТЕЛЬНЫХ
И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ ИЗ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ МЕТОДОМ ВЭЖХ
ПМ 10018691.02100.00086

Заведующая лабораторией биоконверсии,
к.х.н.

В.В. Будаева
« 11 » сентября 2017 г.

РАЗРАБОТЧИКИ

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.

Е.А. Скиба
« 11 » сентября 2017 г.

Научный сотрудник лаборатории биоконверсии,
к.т.н.

Е.И. Кашеева
« 11 » сентября 2017 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО

И.Д. Попова
« 11 » сентября 2017 г.

БИЙСК 2017

Федеральное агентство научных организаций

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № ПМ-87
Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор

С.В. Сысолятин

«11» сентября 2017 г.

**ПРОГРАММА И МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕНТОЗ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ
ГИДРОЛИЗАТАХ ИЗ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ ПОСЛЕ
ПОЛУЧЕНИЯ ТЕХНИЧЕСКОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
ПМ 10018691.02100.00087**

Заведующая лабораторией биоконверсии,
к.х.н.

В.В. Будаева В.В. Будаева
«11» сентября 2017 г.

РАЗРАБОТЧИКИ

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.

Е.А. Скиба Е.А. Скиба
«11» сентября 2017 г.

Научный сотрудник лаборатории биоконверсии,
к.т.н.

Е.И. Кашеева Е.И. Кашеева
«11» сентября 2017 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО

И.Д. Попова И.Д. Попова
«11» сентября 2017 г.

БИЙСК 2017

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № М-88
Экз. № 2



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор

С.В. Сысолятин

«15» 09 2017 г.

МЕТОДИКА.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ
ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗАТА ИЗ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ
ДЛЯ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ**

М 10018691.02100.00088

Заведующая лабораторией биоконверсии, к.х.н.

В.В. Будаева В.В. Будаева
«15» сентября 2017 г.

РАЗРАБОТЧИКИ

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.

Е.А. Скиба Е.А. Скиба
«15» сентября 2017 г.

Младший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии

Е.К. Гладышева Е.К. Гладышева
«15» сентября 2017 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО

И.Д. Попова И.Д. Попова
«15» сентября 2017 г.

БИЙСК 2017

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № М-89
Экз. № 2



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор

С.В. Сысолятин

«15» 09 2017 г.

МЕТОДИКА.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИНОКУЛЯТА СИМБИОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ

MEDUSOMYCES GISEVII SA-12

М 10018691.02100.00089

Заведующая лабораторией биоконверсии, к.х.н.

В.В. Будаева
«15» сентября 2017 г.

РАЗРАБОТЧИКИ

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.

Е.А. Скиба
«15» сентября 2017 г.

Младший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии

Е.К. Гладышева
«15» сентября 2017 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО

И.Д. Попова
«15» сентября 2017 г.

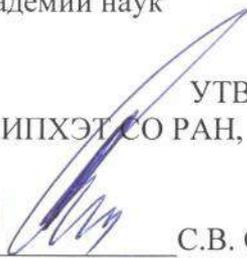
БИЙСК 2017

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № М-91
Экз. № 3



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор


С.В. Сысолятин
«15» 09 2017 г.

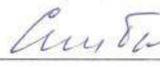
МЕТОДИКА.
ПРОМЫВКА ТЕХНИЧЕСКОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
М 10018691.02100.00091

Заведующая лабораторией биоконверсии, к.х.н.

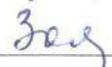

В.В. Будаева
«15» сентября 2017 г.

РАЗРАБОТЧИКИ

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.


Е.А. Скиба
«15» сентября 2017 г.

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.


В.Н. Золотухин
«15» сентября 2017 г.

Младший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии


Е.К. Гладышева
«15» сентября 2017 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО


И.Д. Попова
«15» сентября 2017 г.

БИЙСК 2017

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № М-99

Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИХЭТ СО РАН, профессор

С.В. Сысолятин

06 2018 г.

МЕТОДИКА
ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ГЕЛЬ-ПЛЁНОК БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
К РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ
М 10018691.02100.00099

Заведующая лабораторией биоконверсии, к.х.н.

В.В. Будаева

«09» июни 2018 г.

РАЗРАБОТЧИКИ

Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.

Е.А. Скиба

«09» июни 2018 г.

Научный сотрудник лаборатории физико-
химических основ создания энергетических
конденсированных систем

Н.В. Бычин

«09» июни 2018 г.

Лаборант лаборатории биоконверсии

Д.С. Голубев

«09» июни 2018 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО

И.Д. Попова

«09» 06 2018 г.

БИЙСК 2018

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № ПМ-100
Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор
С.В. Сысолятин

«09» 06 2018 г.

**ПРОГРАММА И МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ
ИСПЫТАНИЕ НА РАСТЯЖЕНИЕ СУХИХ ОБРАЗЦОВ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
ПМ 10018691.02100.00100**

Заведующая лабораторией биоконверсии, к.х.н.
В.В. Будаева
«09» июня 2018 г.

РАЗРАБОТЧИКИ
Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.
Е.А. Скиба
«09» июня 2018 г.

Научный сотрудник лаборатории физико-
химических основ создания энергетических
конденсированных систем
Н.В. Бычин
«09» июня 2018 г.

Лаборант лаборатории биоконверсии
Д.С. Голубев
«09» июня 2018 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО
И.Д. Попова
«09» 06 2018 г.

БИЙСК 2018

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук

Инв. № ПМ-101
Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН, профессор
[Signature] С.В. Сысолятин
«09» 06 2018 г.

**ПРОГРАММА И МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ.
ИСПЫТАНИЕ НА РАСТЯЖЕНИЕ ГЕЛЬ-ПЛЁНОК
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
ПМ 10018691.02100.00101**

Заведующая лабораторией биоконверсии, к.х.н.
[Signature] В.В. Будаева
«09» июня 2018 г.

РАЗРАБОТЧИКИ
Старший научный сотрудник лаборатории
биоконверсии, к.т.н.
[Signature] Е.А. Скиба
«09» июня 2018 г.

Научный сотрудник лаборатории физико-
химических основ создания энергетических
конденсированных систем
[Signature] Н.В. Бычин
«09» июня 2018 г.

Лаборант лаборатории биоконверсии
[Signature] Д.С. Голубев
«09» июня 2018 г.

Нормоконтролер, инженер ГИО
[Signature] И.Д. Попова
«09 06» 2018 г.

БИЙСК 2018

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

ОКПД 2 17.11.14.190

ОКС 85.043 (Группа К 51)

Инв. № ТУ-253

Экз. № _____



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН,
профессор

С.В. Сысолятин
С.В. Сысолятин

09» ноября 2018 г.

СУБСТРАТ ИЗ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА И МИСКАНТУСА ДЛЯ БИОСИНТЕЗА
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Технические условия

ТУ 17.11.14-237-10018691-2018

Дата введения «*09*» *ноября* 2018 г.

Заместитель директора по научной работе,
д-р хим. наук

С.Г. Ильясов
С.Г. Ильясов
«*09*» *ноября* 2018 г.

РАЗРАБОТАЛИ:

Заведующая лаб. № 8, к.х.н.

В.В. Будаева
В.В. Будаева
«*03*» *ноября* 2018 г.

Науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Ю.А. Гисматулина
Ю.А. Гисматулина
«*02*» *ноября* 2018 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Е.А. Скиба
Е.А. Скиба
«*03*» *ноября* 2018 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Е.К. Гладышева
Е.К. Гладышева
«*02*» *ноября* 2018 г.

Нормоконтролер, вед. инженер

И.Д. Попова
И.Д. Попова
«*09*» *ноября* 2018 г.

КАТАЛОЖНЫЙ ЛИСТ ПРОДУКЦИИ

ТУ 17.11.14-237-10018691-2018

ЗАРЕГИСТРИРОВАН
в ФБУ "Алтайский ЦСМ"

Регистрационный № 009016

от 29 октября 2018 г.

Алтайский край

г. Бийск

2018

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

ОКС 85.043 (Группа К 51)

ОКПД 2 17.11.14.190

Инв. № ТУ-254
Экз. № _____



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН,
профессор

С.В. Сысолятин
С.В. Сысолятин

09» ноября 2018 г.

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ГИДРОЛИЗАТЫ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА И МИСКАНТУСА**

Технические условия

ТУ 17.11.14-238-10018691-2018

Дата введения *«09» ноября* 2018 г.

Заместитель директора по научной работе,
д-р хим. наук

С.Г. Ильясов
С.Г. Ильясов
«09» ноября 2018 г.

РАЗРАБОТАЛИ:

Заведующая лаб. № 8, к.х.н.

В.В. Будаева
В.В. Будаева
«03» ноября 2018 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Е.И. Кашеева
Е.И. Кашеева
«02» ноября 2018.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Е.А. Скиба
Е.А. Скиба
«03» ноября 2018 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

Е.К. Гладышева
Е.К. Гладышева
«02» ноября 2018 г.

Нормоконтролер, вед. инженер

И.Д. Попова
И.Д. Попова
«03» ноября 2018 г.



Алтайский край

г. Бийск

2018

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

ОКПД 2 17.11.14.190

ОКС 85.040 (Группа К 51)

Инв. № ТУ-260
Экз. № _____



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПХЭТ СО РАН,
профессор

[Signature]
С.В. Сысолятин
«25» июня 2019 г.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЦЕЛЛЮЛОЗА ИЗ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА И МИСКАНТУСА

Технические условия

ТУ 17.11.14-244-10018691-2019

Дата введения «25» июня 2019 г.

Заместитель директора по научной работе,
д-р хим. наук

[Signature] С.Г. Ильясов
«25» июня 2019 г.

РАЗРАБОТАЛИ:

Заведующая лаб. № 8, к.х.н.
[Signature] В.В. Будаева
«25» июня 2019 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
[Signature] Е.И. Кашеева
«25» июня 2019 г.

Науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
[Signature] Ю.А. Гисматулина
«25» июня 2019 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
[Signature] Е.А. Скиба
«25» июня 2019 г.

Науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
[Signature] Е.К. Гладышева
«25» июня 2019 г.

Нормоконтролер, вед. инженер
[Signature] И.Д. Попова
«25» июня 2019 г.

Алтайский край

г. Бийск

2019



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
 ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИКО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
 Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)

Инв. № ТИ-124
 Экз. № _____



УТВЕРЖДАЮ
 Директор ИПХЭТ СО РАН,
 профессор

[Signature]
 С.В. Сысолятин
 «02» ноября 2018 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ
получения субстрата из плодовых оболочек овса и мискантуса
для биосинтеза бактериальной целлюлозы
ТИ 10018691.01101.00095

Заместитель директора по научной работе,
 д-р хим. наук
[Signature] С.Ф. Ильёсов
 «02» ноября 2018 г.

РАЗРАБОТАЛИ:
 Заведующая лаб. № 8, к.х.н.
[Signature] В.В. Будаева
 «02» ноября 2018 г.

Начальник ПСЛВ, к.т.н.
[Signature] Ю.А. Крюков
 «02» ноября 2018 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
[Signature] Е.А. Скиба
 «02» ноября 2018 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
[Signature] И.Н. Павлов
 «02» ноября 2018 г.

Науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
[Signature] Ю.А. Гисматулина
 «02» ноября 2018 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
[Signature] Е.К. Гладышева
 «02» ноября 2018 г.

Нормоконтролер, вед. инженер
[Signature] И.Д. Попова
 «02» ноября 2018 г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
 ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИКО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
 Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)

Инв. № ТИ-125

Экз. № ___



УТВЕРЖДАЮ
 Директор ИПХЭТ СО РАН,
 профессор

[Signature] С. В. Сысолятин

«02» ноября 2018 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ
получения ферментативных гидролизатов
плодовых оболочек овса и мискантуса
ТИ 10018691.01101.00096

Заместитель директора по
 научной работе /д.х.н.

[Signature] С.Г. Ильясов
 «02» ноября 2018 г.

РАЗРАБОТАЛИ:

Заведующая лаб. № 8, к.х.н.

[Signature] В.В. Будаева
 «02» ноября 2018 г.

Начальник ПСЛВ, к.т.н.

[Signature] Ю.А. Крюков
 «02» ноября 2018 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

[Signature] Е.И. Кашеева
 «02» ноября 2018 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

[Signature] Е.А. Скиба
 «02» ноября 2018 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.

[Signature] И.Н. Павлов
 «02» ноября 2018 г.

Мл. науч. сотр. лаб. № 8

[Signature] Е.К. Гладышева
 «02» ноября 2018 г.

Нормоконтролер, ведущий инженер

[Signature] И.Д. Попова
 «02» ноября 2018 г.

Бийск 2018

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИКО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)

Инв. № ТП-214
Экз. № 1



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИПХЭТ СО РАН,
профессор

С. В. Сысолятин
С. В. Сысолятин
«26» сентября 2017 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОПИСЬ
получения бактериальной целлюлозы из плодовых оболочек овса
ТП 10018691.02101.00212

Заместитель директора по
научной работе, д.х.н.
С. Г. Ильясов
С. Г. Ильясов
«26» сентября 2017 г.
Гл. специалист по ОТ и ЭБ, к.т.н.
А. Ю. Докучаев
А. Ю. Докучаев
«26» сентября 2017 г.

РАЗРАБОТЧИКИ:

Заведующая лаб. № 8, к.х.н.
В. В. Будаева
В. В. Будаева
«26» сентября 2017 г.
Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
Е. А. Скиба
Е. А. Скиба
«26» сентября 2017 г.
Мл. науч. сотр. лаб. № 8
Е. К. Гладышева
Е. К. Гладышева
«26» сентября 2017 г.
Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
И. Н. Павлов
И. Н. Павлов
«26» сентября 2017 г.
Науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
Е. И. Кащева
Е. И. Кащева
«26» сентября 2017 г.
Начальник ПСЛВ, к.т.н.
Ю. А. Крюков
Ю. А. Крюков
«26» сентября 2017 г.
Нормоконтролер, ведущий инженер ГИО
И. Д. Попова
И. Д. Попова
«26» сентября 2017 г.

Бийск 2017

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
 ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИКО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
 Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)

Инв. № ТП-232
 Экз. №

УТВЕРЖДАЮ
 Директор ИПХЭТ СО РАН,
 профессор

С.В. Сысоятин
 « 22 » _____ 2019 г.



ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ
получения бактериальной целлюлозы из плодовых оболочек овса
и мискантуса
ТР10018691.02101.00230

Заместитель директора по научной работе,
 д-р хим. наук
С.Г. Ильясов
 « 22 » _____ 2019 г.

РАЗРАБОТАЛИ:
 Заведующая лаб. № 8, к.х.н.
В.В. Будаева
 « 18 » _____ 2019 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
Е.А. Скиба
 « 18 » _____ 2019 г.

Науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
Е.К. Гладышева
 « 18 » _____ 2019 г.

Науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
Ю.А. Гисматулина
 « 18 » _____ 2019 г.

Ст. науч. сотр. лаб. № 8, к.т.н.
Е.И. Кашеева
 « 18 » _____ 2019 г.

Нормоконтролер, вед. инженер
И.Д. Попова
 « 18 » _____ 2019 г.

Бийск 2019



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ФГБУ ГНЦ Минздрава России,
академик РАН
В.Г. Савченко

2016 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ
экспериментального образца бактериальной целлюлозы,
предоставленного ИПХЭТ СО РАН**

В соответствии с Соглашением о сотрудничестве от 11 ноября 2015 г. между Институтом проблем химико-энергетических технологий СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г.Бийск) и Федеральным государственным бюджетным учреждением «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ ГНЦ Минздрава России, г. Москва) при выполнении научно-исследовательской работы «Раневые покрытия на основе бактериальной целлюлозы» в ФГБУ ГНЦ Минздрава России был поставлен образец бактериальной целлюлозы № 1 для создания на его основе различных фармакологических форм для использования их в качестве местного гемостатика.

Данный образец бактериальной целлюлозы синтезирован 01.06.2015-11.10.2015 гг. в соответствии с запатентованным способом (Будаева В.В., Гладышева Е.К., Скиба Е.А., Сакович Г.В. Способ получения бактериальной целлюлозы – заявка на изобретение. Регистрационный № 2015129304 от 16.07.2015) на среде ферментативного гидролизата технической целлюлозы. Техническая целлюлоза наработана из плодовых оболочек овса на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН азотнокислым способом. Масса образца бактериальной целлюлозы во влажном состоянии составила 2000 г, влажность – 99 %, степень полимеризации – 1450, зольность – 0,14 %, средняя толщина волокна – 30,0 нм.

В лаборатории патологии и фармакологии гемостаза ФГБУ ГНЦ Минздрава России было проведено исследование гемостатической эффективности полученных образцов бактериальной целлюлозы, гемостатическая активность которых определена по методике, утвержденной Фармкомитетом МЗ РФ для доклинической оценки гемостатического действия потенциальных лекарственных средств и описанной в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» Часть первая.-М.: Гриф иК, 2012, стр. 453-479. Установлено, что данные образцы обладали выраженной местной гемостатической активностью: время остановки кровотечения составляло 35 ± 8 с при контроле (марлевый тампон) $246,0 \pm 22,0$ с, объем (масса) кровопотери $0,527 \pm 0,162$ г при контроле $5,9 \pm 1,4$ г. Гемостатическая активность полученных образцов составила $85,81 \pm 11,16$ %. Отчет о выполнении научно-исследовательской работы по соглашению о сотрудничестве между ИПХЭТ СО РАН и ФГБУ ГНЦ Минздрава России по теме: «Раневые покрытия на основе бактериальной целлюлозы» предоставлен в ИПХЭТ СО РАН.

Ответственный исполнитель:
заведующая лабораторией патологии
и фармакологии гемостаза, д.м.н.

Г.Г. Белозерская

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
**НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
 ЦЕНТР ГЕМАТОЛОГИИ**
 МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

125167, Москва, Новый Зыковский проезд, дом 4
 E-mail: director@blood.ru
 тел +7 (495) 612-21-23
 факс +7 (495) 612-42-52
 Исх. № 2243-7 от 16.07.2019.
 На № _____ от _____

ИПХЭТ СО РАН,
 Зав.лабораторией биоконверсии,
 к.х.н. В.В.Будаевой
 г.Бийск Алтайского края, 659322,
 ул. Социалистическая, 1

АКТ ИСПЫТАНИЯ
экспериментальных образцов бактериальной целлюлозы,
предоставленных ИПХЭТ СО РАН

В соответствии с Соглашением о сотрудничестве от 31 января 2019 г. между Институтом проблем химико-энергетических технологий СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск) и Федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, г. Москва), при выполнении научно-исследовательской работы, в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России были поставлены образцы гель-пленок бактериальной наноцеллюлозы (серии № 2 и 3 с толщиной 1,0; 4,0 и 7,0 мм) с целью создания на их основе покрытий в форме губки и проведения сравнительной оценки гемостатической активности покрытий в форме губки от толщины исходных гель-пленок бактериальной наноцеллюлозы.

Образцы гель-пленки бактериальной наноцеллюлозы (серия № 2 массой 2005 г и серия № 3, массой 1000 г) синтезированы в соответствии с запатентованным способом (Пат. РФ № 2597291) на среде ферментативного гидролизата целлюлозы из плодовых оболочек овса, полученной на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН азотнокислым способом. Характеристики образцов гель-пленки бактериальной наноцеллюлозы: влажность – 99 %, степень кристалличности – 90 %, содержание фазы Ia – 100 %.

В лаборатории патологии и фармакологии гемостаза ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России было проведено исследование зависимости гемостатической активности покрытий в форме губки, изготовленных на основе образцов гель-пленок бактериальной наноцеллюлозы, от толщины образцов. Выявлена прямая зависимость гемостатической активности от толщины губки: при локальном применении образцов толщиной 1 мм гемостатическая активность составляла $25,6 \pm 3,6$ %, толщиной 4 мм – $48,8 \pm 6,7$ %, толщиной 7 мм – $89,1 \pm 6,9$ % при контроле $0,0 \pm 5,0$ % (марлевый тампон).

Генеральный директор федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России),
 академик РАН



В.Г.Савченко

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
**НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
 ЦЕНТР ГЕМАТОЛОГИИ**
 МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

125167, Москва, Новый Зыковский проезд, дом 4
 E-mail: director@blood.ru
 тел +7 (495) 612-21-23
 факс +7 (495) 612-42-52
 Исх. № 2934-7 от 04.09.19₂
 На № _____ от _____

ИПХЭТ СО РАН,
 Зав.лабораторией биоконверсии,
 к.х.н. В.В.Будаевой
 г.Бийск Алтайского края, 659322,
 ул. Социалистическая, 1

АКТ ИСПЫТАНИЯ
экспериментальных образцов бактериальной целлюлозы,
предоставленных ИПХЭТ СО РАН

В соответствии с Соглашением о сотрудничестве от 31 января 2019 г. между Институтом проблем химико-энергетических технологий СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск) и Федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, г. Москва) при выполнении научно-исследовательской работы, в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России были поставлены образцы гелевых пленок бактериальной наноцеллюлозы (серии № 2 и 3 с толщиной 1,0-7,0 мм) с целью создания на их основе покрытий в форме губки и проведения сравнительной оценки гемостатической активности с отечественными и зарубежными препаратами.

Образцы гелевых пленок бактериальной наноцеллюлозы (серия № 2 массой 2005 г и серия № 3, массой 1000 г) синтезированы в соответствии с запатентованным способом (Пат. РФ № 2597291), полученной на опытно-производстве ИПХЭТ СО РАН. Характеристики образцов гелевой пленки бактериальной наноцеллюлозы: влажность – 99 %, степень кристалличности – 90 %, содержание фазы Ia – 100 %.

В лаборатории патологии и фармакологии гемостаза ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России была проведена сравнительная оценка гемостатической активности образцов покрытий в форме губки на основе бактериальной наноцеллюлозы с отечественными и зарубежными препаратами. Анализ полученных данных показал, что гемостатическая активность образцов покрытий в форме губки на основе бактериальной наноцеллюлозы – $92,84 \pm 13,93$ % не уступает действию препаратов ChitoGauze – $79,01 \pm 8,83$ % и QuikClotCombat Gauze LE – $76,85 \pm 4,01$ % и опытных образцов покрытий на основе альгината натрия – $73,19 \pm 7,86$ % и каппа-каррагинана – $83,50 \pm 6,68$ %.

Результаты исследований опубликованы в журнале «Клиническая физиология кровообращения» 2019.16 (1).

Генеральный директор федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России),
 академик РАН


 В.Г.Савченко



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

(ФГБОУ ВО АГМУ
Минздрава России)

656038, г.Барнаул, пр. Ленина, 40.
Тел.(3852)368848, факс (3852) 366091
E-mail: rector@agmu.ru; <http://www.agmu.ru>
ОКПО 01962853, ОГРН 1022201762164;
ИНН 2225003156, КПП 222501001



Ректор
ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор
И.П. Салдан
_____ 2017 г.

АКТ ИСПЫТАНИЯ

экспериментального образца бактериальной целлюлозы

В соответствии с сопроводительным письмом исх. № 15365-208- 2115 от 24.10.2016 в Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России), на кафедру факультетской хирургии им. И.И. Неймарка и госпитальной хирургии с курсом ДПО был поставлен образец бактериальной целлюлозы для исследований.

Образец бактериальной целлюлозы влажностью 99 % синтезирован в ИПХЭТ СО РАН 03-11 сентября 2016 гг. по патенту РФ № 2597291.

На кафедре факультетской хирургии им. И.И. Неймарка и госпитальной хирургии с курсом ДПО ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России и на базе Краевого государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Краевая клиническая больница» экспериментально и морфологически исследована возможность применения БЦ в абдоминальной хирургии (герниология, герметизация кишечного шва, хирургический гемостаз).

Достигнуты положительные результаты: при микробиологическом исследовании с условно-патогенной архивной культурой E.Coli бактериальная целлюлоза проявляет антибактериальную активность; после ее фиксации на апоневрозе передней брюшной стенки и на ране тонкой кишке инфицирования материала не происходит; спустя 14 суток представленные образцы способствуют разрастанию грануляционной ткани, закрывающей как кишечный, так и апоневротический шовный материал, бактериальная целлюлоза обладает гемостатическим эффектом.

Профессор кафедры факультетской
хирургии им. И.И. Неймарка и
госпитальной хирургии с курсом ДПО,
д.м.н., профессор

В.Г. Лубянский

Профессор кафедры факультетской
хирургии им. И.И. Неймарка и
госпитальной хирургии с курсом ДПО,
д.м.н., доцент

А.Н. Жариков



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
(ФГБОУ ВО АГМУ Минздрав России)

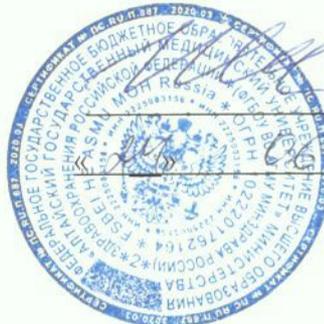
пр. Ленина, 40, г. Барнаул, 656038
Тел. (3852) 368848, факс (3852) 366091
E-mail: rector@agmu.ru; <http://www.asmu.ru>
ОКПО 01962853, ОГРН 1022201762164;
ИНН 2225003156, КПП 222501001

№ 11-44/3682
« 24 » 06 2022 г.

УТВЕРЖДАЮ

Ректор
ФГБОУ ВО АГМУ
Минздрава России,
д.м.н., профессор
И.И. Шереметьева

2022 г.



АКТ ИСПЫТАНИЯ

экспериментальных образцов бактериальной наноцеллюлозы,
предоставленных ИПХЭТ СО РАН

В соответствии с Соглашениями о научном сотрудничестве № 144 от 24 марта 2020 г. и № 108-22 от 06 июня 2022 между Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России, г. Барнаул) и Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институтом проблем химико-энергетических технологий» Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск) на кафедру госпитальной хирургии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России из лаборатории биоконверсии ИПХЭТ СО РАН были предоставлены две партии бактериальной наноцеллюлозы массой нетто 0,7 кг (сопроводительное письмо исх. № 15365-208-2115 от 25.03.2022 года) и 4,4 кг (сопроводительное письмо исх. № 15365-208-2115 от 16.05.2022 года). Образцы бактериальной наноцеллюлозы, синтезированные в соответствии пат. РФ № 2597291, представляли собой гель-плёнки толщиной от 1 мм до 3 мм, площадью от 48 см² до 1296 см², 72 шт., поштучно стерильно упакованные в стеклянные или пластиковые ёмкости.

В г. Барнауле, на кафедре госпитальной хирургии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России, на базе КГБУЗ «Краевая клиническая больница» (отделение гнойной хирургии, отделение сосудистой хирургии) на основании решения комитета по этике при ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России № 4 от 29 апреля 2022 года проведены исследования эффективности применения бактериальной наноцеллюлозы для лечения обширных ран кожи и мягких тканей различного генеза. Установлена значительная эффективность регенерации и заживления ран мягких тканей верхних, нижних конечностей различного генеза (атеросклеротические, диабетические, воспалительные, послеоперационные) с помощью раневого покрытия на основе бактериальной целлюлозы в сравнении с традиционными повязками на основе 1% хлоргексидина, мази «Левомеколь».

Заведующий кафедрой госпитальной хирургии
ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России, д.м.н.,
профессор

А.Н. Жариков

Заведующий отделением гнойной хирургии
КГБУЗ «Краевая клиническая больница»

К.Е. Власов

Заведующий отделением сосудистой хирургии
КГБУЗ «Краевая клиническая больница», к.м.н.

А.В. Козлов

ИПХЭТ СО РАН	Дата регистрации
Кол-во листов	01.07.2022
Входящий №	208-2/15
	1 л.