

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора химических наук, профессора Сеницына Аркадия Пантелеймоновича на диссертационную работу Скибы Екатерины Анатольевны «Биотехнологическая трансформация легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты», представленную на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология

Возобновляемая растительная биомасса составляет большую часть органического материала на Земле и является практически неисчерпаемым источником сырья и энергии, основными её компонентами являются целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин. Общее количество возобновляемой растительной биомассы на земном шаре составляет более 1800 млрд.т. с ежегодным приростом около 200 млрд.т. Запасы невозобновляемых ископаемых источников суммарно сопоставимы с запасами биомассы, но они критически быстро расходуются и их полное исчерпание – только вопрос времени. Кроме того, переработка ископаемых видов сырья ведет к загрязнению окружающей среды и изменению климата из-за выбросов в атмосферу парниковых газов.

Использование возобновляемого растительного сырья позволит не только получать альтернативные виды топлива, такие как биоэтанол, биобутанол и биодизель, но и получать разнообразные химические соединения, традиционно извлекаемые из нефти, это привело к идеям перехода «от углеводов к углеводам» и от «нефтефабрики к биофабрике». Замена веществ, получаемых нефтехимическим синтезом, продуктами биотехнологии является важной частью современных стратегии биоэкономики. В этой связи, диссертационная работа Скибы Е.А. «Биотехнологическая трансформация легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты», является вполне **актуальной**.

**Цель диссертационной работы** заключалась в разработке фундаментальных основ биотехнологической трансформации возобновляемого растительного сырья (на примере массового отхода сельского хозяйства шелухи овса и энергетической злаковой культуры мискантуса) в ценные продукты микробиологического синтеза: биоэтанол и бактериальную наноцеллюлозу (БНЦ).

Для достижения поставленной цели были сформулированы **задачи** диссертационного исследования, которые состояли в следующем (в кратком изложении):

- разработать новые эффективные способы предварительной обработки целлюлозосодержащего сырья разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия в одну и две стадии;
- исследовать ферментативный гидролиз продуктов химической предобработки целлюлозосодержащего сырья;
- разработать научные основы энергоэффективной технологии биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья, направленной на получение высокого выхода целевого продукта;
- разработать промышленную технологию биоэтанола и масштабировать её в условиях опытно-промышленного производства;
- разработать научные основы технологии получения БНЦ из целлюлозосодержащего сырья;
- разработать промышленную технологию БНЦ.

**Структура и объём работы.** Диссертационная работа состоит из введения и пяти глав, изложенных на 492 страницах, заключения и 9 приложений. Список литературы включает 1118 наименований, из них 882 – работы зарубежных авторов.



**Первая глава** посвящена анализу состояния и перспективам переработки возобновляемого целлюлозосодержащего сырья в продукты с высокой добавленной стоимостью. Применяемые для этого подходы включают стадии выбора регионального вида сырья и его предварительной обработки, ферментативного гидролиза полисахаридов до С6 и С5 сахаров и их микробиологического превращения в биоэтанол, а также в БНЦ, очистку метаболитов и утилизацию отходов. Все необходимые разделы в полной мере представлены в обзоре, проведен анализ критических точек производства, приведены примеры действующих производств. К сожалению, в РФ нет примеров действующих заводов, на которых трансформация целлюлозосодержащего сырья была бы решена через стадию ферментативного гидролиза, но на основе анализа мирового опыта диссертантом предложены новые на мировом уровне подходы в предварительной обработке.

Аналитический обзор завершается обоснованием выбора:

- регионального сырья, это массовый отход сельского хозяйства, распространённый в РФ, шелуха овса и биомасса энергетической технической злаковой культуры мискантуса, промышленные плантации районированных сортов которого заложены в РФ за последние 5 лет;
- способа предобработки – химической обработки с помощью разбавленного раствора азотной кислоты;
- способа гидролиза сырья, а именно, ферментативного гидролиза;
- культур микроорганизмов – негенномодифицированных штаммов и симбиотической культуры коллекции ВКПМ.

**Во второй главе** описаны условия и оборудование для проведения экспериментов. Представлена характеристика используемого в работе сырья, ферментных препаратов, микроорганизмов-продуцентов биоэтанола, БНЦ, кормового белка, описаны аналитические методы. При проведении исследований использовались общепринятые методы исследований; для БНЦ был уточнен и разработан ряд методик (испытаний на растяжение сухих и влажных образцов, определения степени полимеризации, лиофильной сушки образцов). Приведены характеристики используемых в работе сырья, ферментных препаратов, микроорганизмов. Для проведения исследований были использованы адекватные современные материалы и методы анализа, что позволило автору эффективно решать поставленные задачи.

**В третьей главе** представлены результаты экспериментальных исследований по поиску эффективных способов предварительной обработки сырья (шелуха овса, мискантус) и его последующего ферментативного гидролиза. Представлены способы химической предобработки сырья с помощью разбавленного раствора азотной кислоты, а в качестве своеобразного контроля использована делигнификация с помощью гидроксида натрия. Применялась обработка в одну или в две стадии с применением азотной кислоты и гидроксида натрия. Обработка в две стадии позволяла получать химически более чистый субстрат, который, соответственно, легче поддавался ферментативному гидролизу.

В работе установлено, что отработанный раствор азотной кислоты после обработки им мискантуса при высоких степенях разведения действует как стимулятор роста семян гороха посевного, наблюдается повышение энергии прорастания и всхожести, стимулируется рост корней. Основным веществом в образцах золы шелухи овса является диоксид кремния, состояние. Наиболее чистым является аморфный кремнезем в остатке, образующемся после ферментативного гидролиза. В работе показана возможность полного использования органических и минеральных компонентов при ферментативном гидролизе: жидкая фракция используется как основа питательных сред в



микробиологическом синтезе, а твердый остаток – для получения аморфного диоксида кремния.

В целом, установлено, что азотнокислый способ предобработки возобновляемого целлюлозосодержащего сырья соответствует большинству критериев «идеальной» предобработки, и, с учетом технологичности, высокой эффективности, унифицированности, экологичности, экономичности и безотходности может претендовать на промышленное внедрение.

С целью повышения эффективности ферментативного гидролиза предобработанного сырья проведена оптимизация состава мультиэнзимной композиции, для чего использовали отечественные и зарубежные коммерческие ферментные препараты Целлюлюкс-А, Брюзайм ВГХ и Ультрафло Коре, предложен состав мультиферментной композиции.

**Четвертая глава** содержит результаты разработки технологии биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья. Применён гибридный гидролиз и ферментация, что позволяет решить проблему несовместимости оптимальных условий гидролиза и ферментации с помощью сахаромицетов, ингибирования ферментов высокими концентрациями сахаров и ингибирования ферментации этанолом. Впервые предложена математическая модель, позволяющая определить оптимальный момент совмещения стадий. Использован метод фермент-субстратной подпитки, что позволило в два раза повысить концентрацию этанола в бражке и сделать процесс экономически целесообразным.

В представленной диссертационной работе получены интересные данные: во-первых, показано, что биоэтанол по разработанной технологии получается безметанольным; во-вторых, при гибридном гидролизе и ферментации качество биоэтанола повышается, что указывает на повышение селективности процесса; в-третьих, с наибольшим выходом биоэтанол получается из продукта одностадийной азотнокислой обработки, что упрощает технологию получения биоэтанола.

Биоэтанол успешно превращен в биоэтилен методом каталитической дегидратации. Обнаружено, что незначительные примеси сивушных масел позволяют повысить выход биоэтилена, это облегчает задачу очистки биоэтанола и позволяет эффективно использовать примеси. Наконец, получение конечного продукта – биоэтилена – позволила автору окончательно определиться со стратегией получения биоэтанола именно через стадию азотнокислой предобработки.

Барда, полученная после получения биоэтанола из предобработанных шелухи овса и мискантуса, была использована для получения биомассы кормовых дрожжей, рост которых осуществлялся за счёт утилизации оставшихся несброженными пентоз.

**В пятой главе** приведены экспериментальные данные по разработке технологии БНЦ. Приведены подробные данные, характеризующие процесс биосинтеза БНЦ, изучены физико-химические и микробиологические параметры процесса. Изучены особенности биосинтеза БНЦ, обусловленные выбором способа предварительной химической обработки и вида сырья. Установлено, что выход БНЦ, степень её полимеризации и модуль Юнга зависят от указанных параметров, а такие фундаментальные структурные характеристики, как степень кристалличности и содержание алломорфа один-альфа – не зависят. Таким образом, симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 способна синтезировать целлюлозу со стандартными структурными характеристиками, независимо от состава питательной среды.



**В приложениях** приведены материалы, подтверждающие практическое внедрение результатов работы.

**Достоверность результатов, представленных в работе не вызывает сомнений.** Эксперименты выполнены на высоком уровне с использованием комплекса необходимых методов проведения экспериментов и методик их аналитического контроля. Результаты статистически обработаны общепринятыми методами. Полученные результаты многократно апробированы в условиях опытно-промышленного производства и получены воспроизводимые результаты.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на многочисленных научных конференциях, конгрессах, симпозиумах международного и всероссийского уровней. Работа представлена в 156 публикациях, в том числе 72 статьи в журналах списка ВАК, из которых из них 48 – в журналах, индексируемых международными базами Web of Science и Scopus, из них 19 – Q1 и Q2. Таким образом, работа соответствует мировому научному уровню.

**Научная новизна** исследований, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, очевидна и определяется следующим:

- предложен новый способ предобработки целлюлозосодержащего сырья для последующего ферментативного гидролиза – азотнокислая предобработка. На двух видах сырья (шелухе овса и мискантусе) показана высокая реакционная способность к ферментативному гидролизу полученных субстратов. Разработанный способ позволяет проводить процесс при атмосферном давлении в стандартном ёмкостном оборудовании, отработанный раствор кислоты может быть рециклизован десятикратно, после чего использован в качестве комбинированного лигноуминового удобрения;

- исследованы неорганические компоненты шелухи овса и продуктов её химической и ферментативной трансформации и впервые показано, что последний продукт является эффективным сырьём для получения биогенного диоксида кремния;

- найдены технологические режимы, позволяющие получать биоэтанол высокого качества (доля метанола не более 0,008 об. %) с высоким выходом: совмещены биокаталитические стадии ферментативного гидролиза и спиртового брожения, обоснованы режимы фермент-субстратной подпитки;

- разработана технология полного цикла получения БНЦ из целлюлозосодержащего сырья;

- научно обосновано использование в качестве продуцента БНЦ симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 и показаны её технологические преимущества по отношению к индивидуальным штаммам;

- методом рентгеноструктурного анализа подтверждено, что независимо от состава питательной среды и вида сырья, *Medusomyces gisevii* Sa-12 синтезирует БНЦ с очень высокими показателями по степени кристалличности (86-93 %) и доле один-альфа алломорфа (96-98 %).

**Практическая значимость работы несомненна.** Научно обоснованы и разработаны технологии получения биоэтанола и БНЦ из целлюлозосодержащего сырья. Новизна технических решений защищена 7 патентами РФ. Для обоих видов продуктов разработаны нормативные документы (программы и методики экспериментальных исследований, технические условия, технологические прописи, инструкции, регламенты), составлены аппаратурно-технологические схемы. Процессы реализованы в условиях опытно-промышленного производства ИПХЭТ СО РАН в стандартном ёмкостном оборудовании объемом от 250 л до 63 л.



Уделено большое внимание побочным продуктам производств, показано, что отработанный раствор азотной кислоты может быть использован в качестве комбинированного лигногуминового удобрения, послеспиртовая барда – как питательная среда для получения кормового белка; твердый остаток после ферментативного гидролиза – как источник аморфного кремнезёма.

Проведена технико-экономическая оценка и рассчитана проектная производственная калькуляция себестоимости биоэтанола при производительности завода 10 000 дал/сутки (3 млн дал/год) и БНЦ при производительности завода 50 т/год влажного продукта. Результаты хорошо согласуются с представленными мировыми данными.

Оба микробиологических продукта применены в сторонних организациях, о чем имеют акты испытания и внедрения. Из биоэтанола получен биоэтилен в ИК им Г.К. Борескова СО РАН. БНЦ успешно испытана в организация Минздрава РФ: ФГБУ ГНЦ (г. Москва) и ФГБОУ ВО АГМУ (г. Барнаул), показана самостоятельная гемостатическая активность БНЦ.

Работа имеет **высокую значимость для науки и производства**. В Российской Федерации для опережающего развития необходимо создание собственной промышленности, базирующейся на возобновляемом растительном сырье. Это должны быть современные наукоёмкие производства, обеспечивающие экономические и социальные запросы страны, отвечающие глобальным вызовам. Технология целлюлозного биоэтанола является базовой для развития химических производств, водородной энергетики, электроники, получения экологичного топлива. Технология БНЦ необходима и для решения медицинских проблем для обеспечения страны в собственных современных раневых покрытиях. Поэтому обе технологии, представленные в данной работе, можно рекомендовать к полномасштабным опытно-конструкторским работам и последующему внедрению.

По материалам диссертации имеется несколько замечаний:

1. Было бы целесообразно объединить разделы Теоретическая значимость и Практическая значимость работы в один раздел Научно-практическая значимость.
2. Не очень понятна целесообразность совмещения (в разной последовательности) для процесса получения биоэтанола двух методов предобработки целлюлозосодержащего сырья – кислотной и щелочной, поскольку из литературных данных известно, что они практически одинаковы по эффективности.
3. Известно, что одним из критически важных ферментов для эффективной биоконверсии растительного сырья в глюкозу является целлобиаза ( $\beta$ -глюкозидаза). Тем не менее, используемые ферментные препараты с точки зрения этой активности не охарактеризованы, поэтому выбор для исследований ферментных препаратов, а также выбор состава мультиэнзимной композиции, не кажутся до конца обоснованными. Кроме того, было бы целесообразно привести состав каждого из ферментных препаратов (описать входящие в состав каждого из ферментных препаратов индивидуальные ферменты и их содержание).
4. Для любой модификации процесса получения биоэтанола (при совмещении биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения, с использованием режимов фермент-субстратной подпитки, и т.д.) концентрация этанола в бражке является недостаточно высокой (не более 5,4 об. %).
5. Было бы целесообразно обсудить причины снижения содержания метанола в биоэтаноле.



6. Было бы целесообразно привести характеристики ферментативных гидролизатов предобработанного целлюлозосодержащего сырья по качественному и количественному содержанию С6- и С5-сахаров (а также по содержанию этих сахаров в бражке после завершения процесса получения биоэтанола).

Указанные замечания по работе имеют не столько критический, сколько дискуссионный характер и не снижают общей высокой оценки работы.

Диссертация обладает внутренним единством и является законченной научно-квалификационной работой, имеющей существенную новизну и практическую значимость в области промышленной биотехнологии, внедрение технологии безметанольного биоэтанола и БНЦ возобновляемого целлюлозосодержащего сырья внесет значительный вклад в экономику и социальную сферу РФ.

По объему выполненных исследований, научному и методическому уровню их проведения, по актуальности, новизне, значимости для науки и производства полученных результатов диссертационная работа «Биотехнологическая трансформация легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты», представленная на официальное оппонирование, полностью удовлетворяет требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в редакции от 26.09.2022), предъявляемым ВАК Министерства науки и высшего образования РФ к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а ее автор – Скиба Екатерина Анатольевна – заслуживает присуждения учёной степени доктора технических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Официальный оппонент: заведующий лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доктор химических наук по специальности 02.00.15 –Химическая кинетика и катализ, профессор по специальности «Химическая кинетика»

Синицын Аркадий Пантелеймонович

23.01.2023



119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 8(495)939-5966; [apsinitsyn@gmail.com](mailto:apsinitsyn@gmail.com)