



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИХТТМ СО РАН,
чл.-корр. РАН
А.П. Немудрый
_____ 2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения Российской академии наук (ИХТТМ СО РАН) 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.

Актуальность темы исследований

Лигноцеллюлозная биомасса является возобновляемым, массовым, дешевым ресурсом, с отрицательным углеродным балансом. С точки зрения химии, это композитный материал, одним из основных компонентов которого является целлюлоза, а элементарной единицей последней – глюкоза – универсальная молекула-платформа для синтеза множества производных. Поэтому в настоящее время лигноцеллюлозная биомасса рассматривается как возобновляемая альтернатива для промышленной химии и, безусловно, это сырьё с бесконечным потенциалом для биотехнологических производств.

Биосинтез лигноцеллюлозы идёт под действием энергии солнечного света, она накапливается ежегодно в огромных количествах, то есть сырьё соответствует критерию экологичности; при этом, это непищевое сырьё, то есть соответствует критерию экономичности; такое сырьё отлично хранится, то есть соответствует критерию технологичности, и в совокупности представляется как идеальный промышленный ресурс. Однако, в силу крайней устойчивости лигноцеллюлозной матрицы, образованной такими полимерами, как целлюлоза, гемицеллюлозы, лигнин с включением жировосковой фракции, зольных компонентов и иногда других минорных компонент, потенциал этого сырья используется всё ещё недостаточно. Примеров промышленной переработки не так уж много, особенно данный момент касается переработки недревесного целлюлозосодержащего сырья. А ведь именно недревесное сырьё, синтезируемое растениями в течение одного вегетативного периода, характеризуется максимальными скоростью роста и валовым производством.

Поэтому, работа Скибы Е.А., направленная на переработку легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты биотехнологического синтеза, **является актуальной.**

Характеристика содержания диссертационной работы

Диссертационная работа, представленная к рассмотрению, включает введение, обзор литературы, методологию проведения исследований, экспериментальную часть и обсуждение результатов из трех глав, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы (1118 наименований, из них 882 зарубежных), 9 приложений. Работа изложена на 492 страницах, содержит 71 рисунок и 57 таблиц.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности, приведены цель и задачи, отражена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, связь работы с научными программами, описаны основные положения, выносимые на защиту и личный вклад автора, приведены апробация результатов работы и полный список публикаций автора по теме исследования.

Аналитический обзор включает 8 разделов и посвящен состоянию и перспективам развития биотехнологических производств, базирующихся на целлюлозосодержащем сырье. Дана классификация целлюлозосодержащего сырья, приведён его химический состав и методы предварительной обработки, проведены обзор вариантов гидролиза и анализ перспектив использования целлюлозосодержащего сырья для производства продуктов микробиологического синтеза. Из множества имеющихся направлений переработки целлюлозосодержащего сырья выбрано два направления микробиологического синтеза: классическое производство биоэтанола и новейшее производство бактериальной наноцеллюлозы. Это представляется хорошо обоснованным, так как недревесное целлюлозосодержащее сырьё исторически позиционировалось как сырьё для топливного биоэтанола. В данный момент технический биоэтанол рассматривается более широко, как универсальный растворитель и прекурсор для технической химии, как сырьё для водородной энергетики. Бактериальная наноцеллюлоза благодаря ряду уникальных свойств позиционируется как самостоятельный материал для биомедицинского и технического применения, и как составляющая для создания новых композиционных материалов. В обзоре приведены свойства, сферы применения, продуценты биоэтанола и бактериальной наноцеллюлозы, основные технологические стадии получения, включая анализ узких мест и критических точек. Аналитический обзор содержательный, целостный, отражает мировые тренды и точку зрения автора, легко читается, заканчивается обоснованием выбора направления исследований.

Во второй главе отражена организация выполнения работы: проекты, в рамках которых выполнены исследования (не только проекты базового бюджетного финансирования, но и интеграционные проекты РАН, гранты РФФИ и РНФ), структурно-методологическая схема проведения исследований. Также описаны материалы (легковозобновляемое целлюлозосодержащее сырьё, ферментные препараты, микроорганизмы) и используемое оборудование. Приведено подробное описание методов исследования на всех технологических этапах. Можно сделать вывод, что

исследования проведены общепринятыми способами, на современном оборудовании, **получены достоверные и воспроизводимые результаты.**

В третьей главе приводятся результаты экспериментальных исследований по разработке авторских способов предварительной обработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья для последующего ферментативного гидролиза и биотехнологической трансформации. Известно, что именно предобработка является критической стадией в технологии переработки целлюлозосодержащего сырья в продукты микробиологического синтеза. Все заявленные способы предобработки позволяют повысить реакционную способность сырья к ферментативному гидролизу в 5,4-7,3 раз, то есть являются эффективными. Основное внимание уделено авторскому способу предобработки сырья азотной кислотой, показана его высокая эффективность, выявлена критическая точка способа, показаны такие преимущества, как технологичность, экологичность, экономичность и безотходность, таким образом, представленный новый способ заслуживает внимания для промышленного внедрения.

В четвёртой главе исследована и разработана технология получения биоэтанола из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья. Установлено, что самый высокий выход биоэтанола обеспечивает предобработка сырья разбавленным раствором азотной кислоты, притом в одну стадию. Благодаря использованию ферментативного гидролиза получен безметанольный спирт из непищевого сырья, что, безусловно, является большим достижением и преимуществом разработанной технологии. Оптимизация и совмещение биокаталитических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения позволила дополнительно повысить выход биоэтанола и его качественные показатели. Применение метода фермент-субстратной подпитки привело к повышению концентрации спирта в бражке с 2,1 об. % до об. 5,4 %, то есть достигнута концентрация биоэтанола, при которой его производство считается рентабельным. Это очень важно, так как низкие концентрации биоэтанола объясняются низкой плотностью субстрата, данное ограничение физически сложно преодолеть. Технология получения биоэтанола как из шелухи овса, так и из мискантуса многократно апробирована в условиях опытно-промышленного производства, из полученных образцов биоэтанола в сторонней организации получен этилен.

В пятой главе исследована и разработана технология получения бактериальной наноцеллюлозы из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья. Исследованы условия биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы симбиотической культурой *Medusomyces gisevii* Sa-12; особенности биосинтеза в зависимости от способа предварительной обработки и вида сырья, представлена полная характеристика полученных образцов бактериальной наноцеллюлозы; показаны преимущества использования на гидролизных средах именно симбиотической культуры, а не индивидуальных штаммов. Разработанная технология масштабирована в условиях опытно-промышленного

производства. Применение бактериальной наноцеллюлозы в ветеринарии и медицине проведено в целом ряде сторонних организациях.

В конце работы представлены выводы, в которых в полной степени отражено решение поставленных задач. В разделе Благодарности автор благодарит соавторов и поясняет их вклад в представленную работу.

Научная новизна исследований

Впервые в мировой практике предложен азотнокислый способ предобработки целлюлозосодержащего сырья (на примере шелухи овса и биомассе сахароцветкового мискантуса) с целью получения ферментативных субстратов. Установлено, что наличие до 12,5 % кислотонерастворимого лигнина в продуктах азотнокислой обработки не снижает эффективности ферментативного гидролиза, в этом заключается основное фундаментальное отличие действия азотнокислой кислоты от действия других кислот на недревесное целлюлозосодержащее сырьё. Значительным преимуществом является установленная возможность использования отработанного раствора азотной кислоты в качестве комбинированного лигногуминового удобрения, что крайне важно в новых условиях регулирования выбросов углекислого газа и оксидов азота.

Представлен полный цикл технологии получения биоэтанола от сырья до готового продукта, при этом выход биоэтанола находится на одном уровне с мировыми лидерами.

Также представлен полный технологический цикл получения нового для Российской Федерации, но востребованного во всём мире продукта – бактериальной наноцеллюлозы. Полученная бактериальная наноцеллюлоза имеет стандартные структурные характеристики независимо от состава используемой питательной среды, при этом по таким показателям как степень кристалличности (на уровне 86-93 %), и содержание алломорфа I-альфа (96-98 %) она превышает все известные мировые аналоги, что объясняется использованием для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы устойчивой симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12.

Практическая значимость работы

Несомненной практической значимостью является успешное масштабирование разработанных технологий получения из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья биоэтанола и бактериальной наноцеллюлозы в условиях опытно-промышленного производства ИПХЭТ СО РАН. Новизна технических решений подтверждена 7 патентами РФ.

Ряд экспериментов выполнен с привлечением математических приемов планирования и обработки экспериментальных данных, что позволило оптимизировать технологические стадии ферментативного гидролиза и спиртового брожения и повысить выход биоэтанола. Разработка эффективного метода фермент-субстратной подпитки позволила увеличить концентрацию биоэтанола до 5,4 об. % – концентрации, достижение которой делает

экономически целесообразным промышленный выпуск биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья.

На технологии получения из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья биоэтанола и бактериальной наноцеллюлозы разработана необходимая техническая документация: программы и методики экспериментальных исследований; технологические прописи; технические условия, технологический регламент.

Выполнены технико-экономические расчёты и показана возможность получения в РФ из дешевого целлюлозосодержащего сырья востребованных продуктов микробиологического синтеза по себестоимости, сопоставимой с мировыми аналогами.

Масштабирование технологий позволила наработать укрупненные партии биоэтанола, который был превращен в этилен в Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН.

Возможность применения бактериальной наноцеллюлозы в медицине установлена в двух организациях Минздрава РФ: ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» (г. Москва) и ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет (г. Барнаул). Установлено, что бактериальная наноцеллюлоза обладает самостоятельной гемостатической активностью и эффективна для лечения повреждения конечностей различного генеза. Это крайне важно для внедрения в РФ новой отрасли – производства бактериальной наноцеллюлозы и обеспечения страны современным эффективным раневым материалом собственного производства.

Полученные в работе научные результаты могут быть рекомендованы для изучения и внедрения в организациях и на предприятиях, где ведутся исследования и разработки в области переработки природного целлюлозосодержащего сырья в полупродукты и продукты органического синтеза, в том числе в Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Российском химико-технологическом университете имени Д.И. Менделеева, Казанском национальном исследовательском технологическом университете, Санкт-Петербургском государственном университете промышленных технологий и дизайна, Северном (Арктическом) федеральном университете имени М.В. Ломоносова и др.

Материалы диссертации **достаточно полно** изложены в публикациях: работа представлена в 156 публикациях, результаты работы широко обсуждались на всероссийских и международных конференциях, форумах и конгрессах. Получено 7 патентов РФ, опубликовано 72 статьи в журналах списка ВАК, из которых из них 48 – в журналах, индексируемых международными базами Web of Science и Scopus, из которых 19 – Q1 и Q2.

Научной специальности 1.5.6. Биотехнология соответствуют 38 статей, опубликованных в журналах, индексируемых в базах данных WoS и Scopus, согласно категориям журналов (Cellulose, Q1; Industrial Crops and Products, Q1; ACS Sustainable Chemistry & Engineering, Q1; Carbohydrate Polymers, Q1; Chemical Engineering Journal, Q1; Journal of Wood Chemistry and Technology,

Q1; BioResources, Q2; 3 Biotech, Q2; Biochemical Engineering Journal, Q2; Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology, Q4; Doklady Biochemistry and Biophysics, Q4; Catalysis in Industry, Q4; Russian Journal of Genetics: Applied Research, Q4; Russian Journal of Bioorganic Chemistry, Q4; Applied Biochemistry and Microbiology, Q4; Biotekhnologiya, Q4) и 2 статьи, опубликованных в российских журналах, не индексируемых в базах данных WoS и Scopus (Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова; Вестник ВГУИТ), итого 40 статей в журналах перечня ВАК.

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология, в части:

Пункт 2. Исследование и разработка требований к сырью (включая вопросы его предварительной обработки), биостимуляторам и другим элементам. Оптимизация процессов биосинтеза.

Пункт 3. Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения.

Пункт 4. Изучение и разработка процессов и аппаратов микробиологического синтеза ... Разработка теории моделирования, оптимизации и масштабирования процессов и аппаратов микробиологического синтеза.

Пункт 7. Разработка новых технологических процессов на основе микробиологического синтеза, ..., создание замкнутых технологических схем микробиологического производства, последние с учетом вопросов по охране окружающей среды.

Пункт 11. Биотехнология препаратов для животноводства и ветеринарии.

Соответствие работы технической отрасли наук обосновывается наличием 7 патентов РФ, 3 технических условий, 2 лабораторных технологических инструкций, 7 технологических прописей, 1 технологического регламента, 8 актов испытания, применения и внедрения.

Автореферат, изложенный на 38 страницах, по содержанию, объему и структуре соответствует установленным требованиям, в нём кратко и ёмко отражены все разделы научного исследования.

При обсуждении диссертационной работы возникли следующие вопросы и замечания:

1. Соискателем не раскрыта суть селективности антибактериальной активности мискантуса. Какая часть растительного сырья отвечает за селективность антибактериального воздействия на различные клеточные культуры – органическая или неорганическая?

2. Какие по мнению соискателя можно сформулировать общие требования к сырью, подходящему для получения биоэтанола? Возможно, это требование к химическому составу, к степени кристалличности целлюлозы, к наличию каких-то мешающих примесей.

3. Какой фактор растительного сырья как твёрдого тела, по мнению соискателя, сильнее всего влияет на эффективность гидролиза целлюлозы: удельная площадь поверхности или степень кристалличности?

4. Почему для предобработки использован именно 4 % мас. раствор азотной кислоты? Каким образом выбрана эта концентрация?

5. Вызывают сомнения технико-экономические расчеты. Автору следовало воспользоваться услугами сторонних организаций для расчета экономической выгоды технологических производств.

6. Известно существование минимум четырех способов обработки дифракционных картин. Каким образом проведён расчет индекса кристалличности целлюлозы в данной работе?

7. Какой из продуктов биотехнологической трансформации целлюлозосодержащего сырья по мнению соискателя будет наиболее востребован для производства?

Сделанные замечания не являются принципиальными, носят рекомендательный характер, они не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации и не снижают общую положительную оценку работы.

Заключение

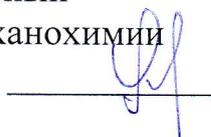
Диссертация Скибы Екатерины Анатольевны «Биотехнологическая трансформация легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты» является завершённой научно-квалификационной работой, в которой изложены новые научно-обоснованные технические и технологические решения по разработке фундаментальных основ трансформации легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в технический безметанольный биоэтанол, что вносит значительный вклад в новое развитие гидролизной отрасли в России; а также по биотехнологической трансформации сырья в бактериальную наноцеллюлозу, что закладывает научные основы новой для России, социально значимой отрасли продукта двойного назначения – бактериальной наноцеллюлозы. Диссертация выполнена на чрезвычайно актуальную тематику, очень мало освещаемую в российской научной литературе. Это логичное, системно взаимосвязанное, целостное исследование, выполненное на высоком научном уровне с применением современных методов исследований. Научные положения и выводы, сформулированные автором, теоретически обоснованы, оригинальны, достоверны, обладают научной новизной и практической значимостью.

Диссертационная работа Скибы Екатерины Анатольевны «Биотехнологическая трансформация легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в ценные продукты» полностью удовлетворяет

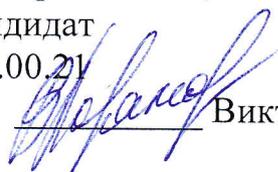
требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук и паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (пп. 2, 3, 4, 7, 11), а ее автор заслуживает присуждения учёной степени доктора технических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Диссертационная работа Скибы Е.А. и данный отзыв заслушаны, обсуждены и одобрены на объединённом заседании лабораторий механохимии, лаборатории механо-ферментативной конверсии твёрдых биополимеров, лаборатории материалов и технологий водородной энергетики и группы механохимии биологически активных веществ ИХТТМ СО РАН (протокол от 19 января 2023 года № 2023-001). Присутствовало на заседании 21 человек, в обсуждении приняло участие 8 человек. Результаты голосования: «за» – 21 (*двадцать один*), «против» – нет, «воздержались» – нет.

Доктор химических наук, специальность
02.00.21 – Химия твёрдого тела, главный
научный сотрудник лаборатории механохимии
ИХТТМ СО РАН


Олег Иванович Ломовский

Секретарь научных семинаров ИХТТМ СО РАН,
старший научный сотрудник лаборатории
химического материаловедения, кандидат
химических наук, специальность 02.00.21


Виктор Васильевич Лозанов

Подписи Ломовского О.И. и Лозанова В.В. удостоверяю:
Учёный секретарь ИХТТМ СО РАН,
д.х.н.

«19» января 2023 г.



 Т.П. Шахтшнейдер

м.п. (гербовая)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения Российской академии наук (ИХТТМ СО РАН)

1630128, г. Новосибирск, ул. Кутателадзе, 18;
+7(383) 332-40-02, факс. +7(383) 332-28-47;
root@solid.nsc.ru; lomovsky@solid.nsc.ru