Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»





На правах рукописи

Буденкова Екатерина Александровна

**Способ получения биоэтанола из мискантуса китайского с помощью
плесневого гриба** *Aspergillus niger* **и дрожжевого консорциума**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель: доктор технических наук, доцент Кригер Ольга Владимировна

Калининград

2023

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

[**ВВЕДЕНИЕ 3**](#bookmark1)

**ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 8**

1. [**Целлюлозосодержащее сырьё и способы предобработки 8**](#bookmark2)
2. [**Микроорганизмы-целлюлолитики и бродильщики 18**](#bookmark3)
3. [**Способы получения биоэтанола 25**](#bookmark4)
4. [**Заключение по обзору 28**](#bookmark5)

**ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 31**

1. **Организация выполнения работы 31**
2. [**Объекты исследований 33**](#bookmark9)
3. [**Оборудование 34**](#bookmark10)
4. [**Методы исследований 34**](#bookmark11)

[**ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 47**](#bookmark25)

1. **Анализ химического состава** *Miscanthus sinensis* **и определение параметров его**

**делигнификации 47**

1. [**Изучение целлюлолитической активности** *Aspergillus niger* **52**](#bookmark27)
2. **Подбор условий проведения физико-химического мутагенеза** *Aspergillus niger*

**и оптимизация параметров гидролиза целлюлозы мискантуса 58**

1. **Подбор эффективного дрожжевого консорциума и определение оптимальных**

**условий для проведения спиртового брожения 67**

[**3.6 Получение этанола в оптимальных условиях 74**](#bookmark30)

[**ГЛАВА 4 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 79**](#bookmark31)

* 1. [**Разработка технологической схемы производства биоэтанола 79**](#bookmark33)
	2. [**Характеристика биоэтанола 85**](#bookmark34)
	3. [**Расчет ожидаемой экономической эффективности биоэтанола 87**](#bookmark35)

[**ЗАКЛЮЧЕНИЕ 90**](#bookmark36)

[**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 92**](#bookmark37)

[**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 93**](#bookmark38)

**Приложение А - МАЛДИ-ТОФ МС щелочной делигнификации 111**

**Приложение Б - МАЛДИ-ТОФ МС кислотной делигнификации 112**

**Приложение В - Технологическая инструкция 113**

**Приложение Г - Акт промышленной апробации 114**

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

* Изучен химический состав трех сортов *Miscanthus sinensis, в* результате чего определено, что наименьшее количество лигнина содержится в *Miscanthus sinensis* сорта «Zebrinus». Содержание целлюлозы статистически значимо не отличается в трех исследуемых сортах *M. sinensis.* В пределах сорта «Zebrinus» наибольший выход целлюлозы отмечен в случае использования целого растения.

Выявлены оптимальные условия делигнификации биомассы: варка в присутствии пертрифторуксусной кислоты при 60 °С в течение 60 мин (кислотная делигнификация) или обработка гидроксидом натрия при температуре 80 °С в течение 180 мин (щелочная делигнификация).

* Наибольший выход редуцирующего вещества при проведении ферментативного гидролиза с использованием нативного *Aspergillus niger* F - 1270 составил 1,0 ± 0,2 г/л. Подобраны условия проведения физико­химического мутагенеза *A. niger* F-1270 с целью улучшения целлюлолитических свойств: споры 5-суточной культуры *A. niger* облучать УФ (253,7 нм) на расстоянии 60 см от лампы в течение 120 мин; чашку с суспензией инкубировались в темноте при 28 °С в течение ночи; суспензию спор смешать с раствором азид натрия/бромид этидия в соотношении 9:1 и инкубировать в течение 30 мин, трехкратно промыть суспензию спор буферным раствором и культивировать на чашке с питательной средой при 28 °С в течение двух недель.

В результате ненаправленного мутагенеза получены новые образцы *A. niger,* обладающие статистически значимо более высоким целлюлолитическим потенциалом.

* Подобраны условия для проведения ферментативного гидролиза с использованием штамма *A. niger* №2 (120 мин УФ облучения *A. niger):* кислотная делигнификация биомассы, цитратный буфер с рН 5,0, концентрация субстрата 50 г/л, температура 36 °С, без перемешивания. Условия для проведения ферментативного гидролиза с использованием штамма *A. niger* №3 (последовательное УФ облучение (120 мин) и обработка химическим мутагеном в течение 30 мин): щелочная делигнификация биомассы, цитратный буфер с рН 5,0, концентрация субстрата 200 г/л, температура 42 °С, постоянное перемешивание 75 об/мин.

Оптимизированный состав реакционной среды: NaNO3 - 3 г/л; KH2PO4 - 0,35 г/л; K2HPO4\*3H20 - 0,1 г/л; MgSO4\*7H2O - 0,5 г/л; KCl - 0,5 г/л; FeSO4\*7H2O - 5,0 мг/л; MnSO4\*7H2O - 1,6 мг/л; ZnSO4\*7H2O - 1,4 мг/л; CoCl2\*6H2O - 20 мг/л. Продолжительность культивирования 14 суток.

* Сформирован консорциум дрожжевых микроорганизмов *(Schefferomyces stipites Y-3263, Pachysolen tannophilus Y-3269, Saccharomyces cerevisiae Y-4242, Lanchancea thermotolerans Y-4532).* Оптимизирован солевой состав среды для проведения реакции спиртового брожения дрожжевым консорциумом с помощью полного факторного двухуровневого эксперимента: NaNO3 - 3 г/л; X2 - K2HPO4 - 3,50 г/л; X3 - NH4Q - 1,50 г/л; X4 - NaCl - 1 г/л; FeSO4\*7H2O - 5,0 мг/л; MnSO4\*7H2O - 1,6 мг/л; ZnSO4\*7H2O - 1,4 мг/л; CoCl2\*6H2O - 20 мг/л.
* Получен этанол-сырец с объемной долей этанола 96,4±4,8%. Анализ физико-химических свойств полученного биоэтанола показал его соответствие стандарту качества, установленного для технического этанола.
* Разработана технологическая схема и технологическая инструкция по получению этанола путем биоконверсии травянистого растения *Miscanthus sinensis* «Zebrinus» с использованием плесневого гриба *Aspergillus niger* и дрожжевого консорциума (ТИ 20.14.75-001-02068255-2023), апробированная в «Русэкстракт».
* Рассчитана экономическая эффективность производства биоэтанола согласно описываемой технологической схемы.